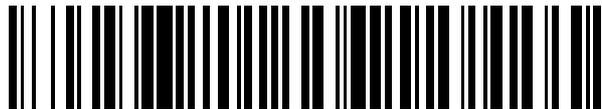


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 526**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 14/475 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.12.2006 E 06840724 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015 EP 1981525**

54 Título: **Liberación extendida de neurregulina para mejorar la función cardíaca**

30 Prioridad:

30.12.2005 US 755124 P

13.01.2006 US 758626 P

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

03.03.2015

73 Titular/es:

**ZENSUN (SHANGHAI) SCIENCE AND
TECHNOLOGY LIMITED (100.0%)
NO. 68 JU LI ROAD, ZHANGJIANG HI-TECH
PARK
SHANGHAI 201203, CN**

72 Inventor/es:

ZHOU, MINGDONG

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 530 526 T3

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

DESCRIPCIÓN

Liberación extendida de neurregulina para mejorar la función cardíaca

Campo de la invención

5 La invención se refiere, en general, a composiciones y métodos para prevenir, tratar o retrasar diversas enfermedades o trastornos cardíacos mediante la liberación extendida de neurregulina a un mamífero.

Antecedentes de la invención

10 La hipertrofia cardíaca (ventricular) es una importante respuesta fisiológica adaptativa a un aumento en el estrés o la demanda de trabajo cardíaco. Uno de los cambios celulares tempranos que se producen después de un estímulo para la hipertrofia es la síntesis de mitocondrias y la expansión de la masa miofibrilar (espesamiento de la pared), con un aumento proporcional en el tamaño de las células individuales, pero sin aumento (o un aumento mínimo) en el número de células.

15 Cuando el ventrículo se somete a un estrés, la respuesta inicial es un aumento en la longitud de los sarcómeros. A esto le sigue un aumento en la masa muscular total. Cuando la sobrecarga es grave, la contractilidad miocárdica disminuye. En su forma más suave, esta disminución se manifiesta por una reducción en la velocidad de acortamiento del miocardio no cargado, o por una reducción en la tasa de desarrollo de fuerza durante la contracción isométrica. A medida que la contractilidad miocárdica se reduce cada vez más, aparece una reducción más generalizada en la velocidad de acortamiento del miocardio no cargado, ahora acompañada de una disminución en el desarrollo de la fuerza isométrica y el acortamiento. En este punto, aún puede lograrse la compensación circulatoria por dilatación cardíaca y un aumento en la masa muscular, que tienden a mantener la tensión de la pared a niveles normales. A medida que la contractilidad disminuye aún más, sobreviene una insuficiencia cardíaca congestiva abierta, reflejada por una disminución del trabajo y gasto cardíaco y/o un aumento de la presión y el volumen diastólico final ventricular en reposo.

25 La transición desde la hipertrofia a la insuficiencia cardíaca se caracteriza por varias alteraciones en la organización celular. Por ejemplo, las células hipertróficas normales tienen un tamaño grande con más unidades contráctiles bien organizadas, así como unas adhesiones fuertes entre células. Por contraste, las células patológicamente hipertróficas, que también tienen un gran tamaño y acumulación de proteínas, muestran una desorganización de las proteínas contráctiles (desorganización de las estructuras sarcoméricas) y pocas adhesiones entre células (desorganización de las miofibras). Así, en la hipertrofia patológica, el mayor tamaño y acumulación de proteínas contráctiles están asociados con el ensamblaje desorganizado de las estructuras sarcoméricas y la falta de interacciones robustas entre células.

35 La insuficiencia cardíaca afecta a aproximadamente cinco millones de estadounidenses, y se diagnostican más de 550.000 pacientes nuevos cada año con este trastorno. La terapia con fármacos actual para la insuficiencia cardíaca se dirige principalmente a los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), que son vasodilatadores que provocan que los vasos sanguíneos se expandan, disminuyen la presión sanguínea y reducen la carga de trabajo del corazón. Aunque el porcentaje de reducción en la mortalidad ha sido significativo, la reducción real de la mortalidad con inhibidores de ACE tiene un promedio de solo 3-4%, y existen varios efectos secundarios potenciales.

40 Los inhibidores de ACE también se han administrado en combinación con otros fármacos, tales como digitalis, que aumenta la fuerza de las contracciones del corazón y/o un diurético, que ayuda a aliviar la carga de trabajo del corazón haciendo que los riñones eliminen más agua y sodio de la corriente sanguínea. Sin embargo, al menos un estudio demuestra que no existe diferencia en la supervivencia asociada con el uso de digitalis, comparado con el placebo, en pacientes con insuficiencia cardíaca de clase II-III. Además, los diuréticos pueden mejorar algunos síntomas de la insuficiencia cardíaca pero no son adecuados como tratamiento único.

45 Existen otras limitaciones asociadas con otras opciones para prevenir o tratar la insuficiencia cardíaca. Por ejemplo, el trasplante de corazón es claramente más caro e invasivo que el tratamiento con fármacos, y también está limitado por la disponibilidad de donantes de corazón. El uso de dispositivos mecánicos, tales como marcapasos biventriculares, también es caro e invasivo. Por tanto, son necesarias nuevas terapias, dadas las deficiencias de las terapias actuales.

50 Una nueva terapia prometedora implica la administración de neurregulina (denominada en lo sucesivo "NRG") a un paciente que padece o que está en riesgo de desarrollar una insuficiencia cardíaca. Las NRG comprenden una familia de factores del crecimiento y de la diferenciación relacionados desde el punto de vista estructural que incluyen NRG1, NRG2, NRG3 y NRG4 y sus isoformas. Por ejemplo, se han identificado más de 15 isoformas diferenciadas de NRG1 y se dividen en dos grandes grupos, conocidos como tipos α y β , basándose en diferencias en la secuencia de sus dominios similares al factor del crecimiento epidérmico (EGF) esenciales.

55 Las NRG se unen a la familia de receptores de EGF, que comprenden EGFR, ErbB2, ErbB3 y ErbB4, cada uno de los cuales desempeña un papel importante en múltiples funciones celulares, que incluyen el crecimiento, la

diferenciación y la supervivencia celular. Son receptores de proteína tirosina quinasas, que consisten en un dominio de unión al ligando extracelular, un dominio transmembrana y un dominio de tirosina quinasa citoplásmico. Después de que NRG se una al dominio extracelular de ErbB3 o ErbB4, induce un cambio conformacional que conduce a la formación de heterodímeros entre ErbB3, ErbB4 y ErbB2, o a la formación de homodímeros de ErbB4 consigo mismo, lo cual produce la fosforilación del dominio C-terminal del receptor dentro de la membrana celular. El dominio intracelular fosforilado entonces se une a otras proteínas señal dentro de la célula, activando la correspondiente vía de señalización de AKT o ERK corriente abajo, e induciendo una serie de reacciones celulares, tales como la estimulación o la represión de la proliferación celular, la diferenciación celular, la apoptosis celular, la migración celular o la adhesión celular. Entre estos receptores, en el corazón se expresan principalmente ErbB2 y ErbB4.

Se ha demostrado que los dominios de tipo EGF de NRG1, que varían en tamaño de 50 a 64 aminoácidos, son suficientes para unirse y activar estos receptores. Estudios previos han demostrado que la neuregulina-1 β (NRG-1 β) puede unirse directamente a ErbB3 y ErbB4 con alta afinidad. El receptor huérfano, ErbB2, puede formar un heterodímero con ErbB3 o ErbB4 con mayor afinidad que los homodímeros de ErbB3 o ErbB4. La investigación en el desarrollo neural ha indicado que la formación del sistema nervioso simpático requiere un sistema de señalización de NRG-1 β , ErbB2 y ErbB3 intacto. La alteración dirigida de NRG-1 β , ErbB2 o ErbB4 conduce a la letalidad embrionaria debida a defectos en el desarrollo cardíaco. Estudios recientes también han resaltado el papel de NRG-1 β , ErbB2 y ErbB4 en el desarrollo cardiovascular, así como en el mantenimiento de la función cardíaca normal adulta. Se ha demostrado que NRG-1 β potencia la organización de los sarcómeros en los cardiomiocitos adultos. La administración a corto plazo de un dominio similar a EGF de NRG-1 β recombinante mejora significativamente o protege contra el deterioro en la actuación miocárdica en tres modelos animales diferenciados de insuficiencia cardíaca. De forma más importante, NRG-1 β prolonga significativamente la supervivencia de animales con insuficiencia cardíaca (véase el documento WO 00/37095). Estos efectos hacen que la NRG-1 β sea prometedora como producto terapéutico de amplio espectro o compuesto de partida para la insuficiencia cardíaca debida a una diversidad de enfermedades comunes. Sin embargo, siguen siendo necesarios métodos más eficaces para utilizar la NRG, que puedan emplearse en un entorno clínico para la prevención, el tratamiento o el retraso de la insuficiencia cardíaca y/o la hipertrofia cardíaca.

Sumario de la invención

La liberación extendida de NRG mejora en gran medida el efecto de la NRG en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca y la hipertrofia cardíaca, comparado con NRG administrada por otros métodos. La liberación extendida de NRG también tiene la ventaja de reducir los efectos secundarios adversos de la NRG, comparado con la NRG administrada por otros métodos.

La invención proporcionar NRG1, o uno de sus fragmentos funcionales, para su uso en un método para prevenir, tratar o retrasar la insuficiencia cardíaca en un mamífero, comprendiendo dicho método la liberación extendida de NRG en un mamífero que lo necesite a lo largo de un periodo de tiempo de entre 4 horas y 12 horas diarias por medio de una bomba osmótica o una bomba de jeringa.

En una realización del método para prevenir, tratar o retrasar la insuficiencia cardíaca en un mamífero, la liberación extendida de NRG en un mamífero conduce a la activación sostenida de la vía de señalización de ERK en células cardíacas.

En otra realización del método para prevenir, tratar o retrasar la insuficiencia cardíaca en un mamífero que lo necesite, la liberación extendida de NRG en un mamífero produce la activación sostenida de la vía de señalización de AKT en células cardíacas.

En otra realización del método para prevenir, tratar o retrasar la insuficiencia cardíaca en un mamífero que lo necesite, la liberación extendida de NRG en un mamífero potencia los valores de EF y/o FS del ventrículo izquierdo de un mamífero.

En otra realización del método para prevenir, tratar o retrasar la insuficiencia cardíaca en un mamífero que lo necesite, la liberación extendida de NRG en un mamífero evita la hipertrofia cardíaca.

La liberación extendida de NRG puede utilizarse para reducir el diámetro interior del ventrículo izquierdo. En un aspecto, la liberación extendida de NRG en un mamífero reduce el valor de LVEDD en más de aproximadamente 2%. Más preferiblemente, la liberación extendida de NRG en un mamífero reduce el valor de LVEDD en más de aproximadamente 5%. Aún más preferiblemente, la liberación extendida de NRG en un mamífero reduce el valor de LVEDD en más de aproximadamente 10%. Mas preferiblemente, la liberación extendida de NRG en un mamífero reduce el valor de LVEDD en más de aproximadamente 15%. Lo más preferiblemente, la liberación extendida de NRG en un mamífero reduce el valor de LVEDD en más de aproximadamente 20%.

En otra realización preferida, la liberación extendida de NRG en un mamífero reduce el valor de LVESD en más de aproximadamente 2%. Más preferiblemente, la liberación extendida de NRG en un mamífero reduce el valor de LVESD en más de aproximadamente 5%. Aún más preferiblemente, la liberación extendida de NRG en un mamífero reduce el valor de LVESD en más de aproximadamente 10%. Aún más preferiblemente, la liberación extendida de

NRG en un mamífero reduce el valor de LVESD en más de aproximadamente 15%. Lo más preferiblemente, la liberación extendida de NRG en un mamífero reduce el valor de LVESD en más de aproximadamente 20%.

5 La liberación extendida de NRG también puede usarse para provocar el crecimiento y/o la diferenciación de los cardiomiocitos, en el que la liberación extendida de NRG en un mamífero que lo necesite activa la vía de MAP quinasa en las células cardíacas y provoca el crecimiento y/o la diferenciación de los cardiomiocitos.

La liberación extendida de NRG también puede usarse para inducir la remodelación de las estructuras sarcoméricas y del citoesqueleto de células musculares, o las adhesiones entre células, en el que la liberación extendida de NRG en un mamífero que lo necesite activa la vía de MAP quinasa en las células cardíacas y provoca la remodelación de las estructuras celulares o las adhesiones entre células.

10 La liberación extendida de NRG también puede usarse para tratar o prevenir la disociación de la adhesión entre células del músculo cardíaco y/o la desorganización de las estructuras sarcoméricas en un mamífero que lo necesite.

Además, debido a que la interacción de NRG con los receptores ErbB se ha implicado en otras enfermedades y trastornos, la liberación extendida de NRG también puede mejorar en gran medida el efecto de la NRG en el tratamiento de estas otras enfermedades y trastornos, comparado con la NRG administrada por otro métodos. Por tanto, la presente descripción se refiere también a composiciones y métodos para prevenir, tratar o retrasar diversas enfermedades o trastornos en mamíferos, en particular en seres humanos, extendiendo la liberación de una proteína de NRG, o uno de sus fragmentos funcionales, o un ácido nucleico que codifica una proteína de NRG, o uno de sus fragmentos funcionales, o un agente que potencie la producción y/o la función de dicha NRG. Estas enfermedades y trastornos incluyen, en general, aquellos del sistema nervioso central y periférico. Los ejemplos de otras enfermedades y trastornos incluyen diversas enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedad del sistema neural y/o enfermedades musculares, que incluyen distrofia muscular (por ejemplo, Duchenne, distrofia muscular de cinturas) y esclerosis múltiple, lesión espinal, enfermedades del ojo y el oído, diabetes, esquizofrenia y enfermedad de Alzheimer.

25 La invención también se refiere al uso de una composición o formulación de liberación extendida de NRG en un método para prevenir, tratar o retrasar la insuficiencia cardíaca en un mamífero. En una realización, la composición o la formulación apoya la activación de la vía de señalización de ERK en células cardíacas. En otra realización, la composición o la formulación apoya la actividad de la vía de señalización de AKT en células cardíacas. En otra realización, la composición o la formulación potencia los valores de EF y/o FS del mamífero. En otra realización, la composición o la formulación previene la hipertrofia cardíaca.

35 La solicitud también describe un kit que comprende una composición o formulación de NRG y una tecnología de liberación extendida conocida en la técnica que incluye, pero no se limita a una bomba osmótica o bomba de jeringa, acoplamiento con polietilenglicol (PEG) y/o encapsulación en liposomas o microesferas. El kit puede comprender también instrucciones para emplear la composición o la formulación de NRG y/o la tecnología de liberación extendida para prevenir, tratar o retrasar la insuficiencia cardíaca en un mamífero; prevenir, tratar o retrasar la hipertrofia cardíaca en un mamífero; o reducir el diámetro interior del ventrículo izquierdo en un mamífero.

Estos y otros aspectos, objetos, ventajas y características de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica después de leer la descripción de la invención, tal como se describe más a fondo a continuación.

Breve descripción de los dibujos

40 La figura 1 muestra la fosforilación de AKT y ERK en el ventrículo izquierdo de ratas a lo largo del tiempo después de que NRG fuera infundida mediante inyección intramuscular, inyección intravenosa e infusión de ensayo de tolerancia a la glucosa intravenosa. "P-AKT", "P-EFK" y "NRG" significan AKT fosforilada, ERK fosforilada y neuregulina. "im", "iv" e "ivgtt" significan inyección intramuscular, inyección intravenosa y ensayo de tolerancia a la glucosa intravenosa, respectivamente.

45 La figura 2 muestra un gel teñido con Bal₂ para detectar PEG. En la figura, "mezcla" significa la disolución de la mezcla de PEG y NRG después de su reacción. "M", "pico 1", "pico 2" y "pico 3" significan el marcador de proteínas y la fracción del pico de elución 1, 2 y 3 de la mezcla procedente de la columna S100. "NRG-mono-PEG", "NRG-di-PEG" y "NRG-poli-PEG" significan NRG acoplada con un PEG, dos PEG y múltiples (al menos 3) PEG, respectivamente.

50 La figura 3 muestra un gel teñido con Coomassie para detectar la proteína de NRG. Las abreviaturas son las mismas que en la figura 2. En el carril M, el peso molecular para cada banda (de abajo a arriba) es de 14,4 kD, 20,1 kD, 31,0 kD, 43,0 kD, 66,2 kD y 97,4 kD, respectivamente.

Descripción detallada de la invención

55 La presente invención proporciona métodos para tratar o prevenir la insuficiencia cardíaca en un mamífero mediante la liberación extendida de una cantidad sostenida o variada de NRG a lo largo de un periodo de tiempo de entre 4

horas y 12 horas diarias por medio de una bomba osmótica o una bomba de jeringa. Preferiblemente, el mamífero es un paciente humano que padece o que está en riesgo de desarrollar una insuficiencia cardíaca.

Para otorgar claridad a la descripción, y no como limitación, la descripción detallada de la invención que aparece a continuación se divide en las siguientes subsecciones.

5 A. Definiciones

A menos que se indique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos empleados en la presente tienen el mismo significado que el que entienden habitualmente los expertos en la técnica a la cual pertenece esta invención. Si una definición indicada en esta sección es contraria o incoherente de otra forma con una definición indicada en las patentes, solicitudes, solicitudes publicadas y otras publicaciones citadas en la presente, la definición indicada en esta sección prevalece sobre la definición en esa referencia.

Tal como se emplean en la presente, las formas en singular “un/una” y “el/la” significan “al menos un/una” o “uno/una o más”, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Tal como se emplea en la presente, la “neurregulina” o “NRG” empleada en la presente invención, se refiere a proteínas o péptidos que pueden unirse y activar a ErbB2, ErbB3, ErbB4 o sus combinaciones, que incluyen, pero no se limitan a todas las isoformas de neurregulina, el dominio EGF de neurregulina solo, polipéptidos que comprenden el dominio similar a EGF de neurregulina, mutantes o derivados de neurregulina, y cualquier tipo de producto génico similar a neurregulina que también active a los anteriores receptores, tal como se describe en detalle a continuación. En realizaciones preferidas, la neurregulina empleada en la presente invención se une y activa los heterodímeros ErbB2/ErbB4 o ErbB2/ErbB3. La neurregulina también incluyen proteínas de NRG-1, NRG-2, NRG-3 y NRG-4, péptidos, fragmentos y compuestos que imitan las actividades de la neurregulina. La neurregulina empleada en la presente invención puede activar los anteriores receptores ErbB y modular sus reacciones biológicas, por ejemplo, estimular la diferenciación de células de cáncer de mama y la secreción de proteínas de la leche; inducir la diferenciación de células de la cresta neural en células de Schwann; estimular la síntesis del receptor de acetilcolina en células de músculo esquelético; y/o mejorar la diferenciación, la supervivencia y la síntesis de ADN de cardiocitos. La neurregulina también incluye los variantes con sustituciones de aminoácidos conservadoras que no alteran sustancialmente su actividad biológica. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos adecuadas son conocidas por los expertos en la técnica y pueden realizarse sin alterar en general la actividad biológica de la molécula resultante. Los expertos en la técnica reconocerán que, en general, las sustituciones de un único aminoácido en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (véase, por ejemplo, Watson et al., *Molecular Biology of the Gene*, 4ª edición, 1987, The Bejacmin/Cummings Pub. Co., p. 224).

La proteína de neurregulina incluye la proteína y el péptido de neurregulina. El ácido nucleico de neurregulina incluye el ácido nucleico de neurregulina y el oligonucleótido de neurregulina.

Tal como se emplea en la presente, un “dominio similar al factor del crecimiento epidérmico” o “dominio similar a EGF” se refiere a un motivo polipeptídico codificado por el gen de neurregulina que se une y activa a ErbB2, ErbB3, ErbB4 o sus combinaciones, y presenta una similitud estructural con el dominio de unión al receptor de EGF, según se describe en el documento WO 00/64400; Holmes et al., *Science*, 256:1205- 1210 (1992); patentes de EEUU n.ºs 5.530.109 y 5.716.930; Hijazi et al., *Int. J. Oncol.*, 13:1061-1067 (1998); Chang et al., *Nature*, 387:509-512 (1997); Carraway et al., *Nature*, 387:512-516 (1997); Higashiyama et al., *J. Biochem.*, 122:675-680 (1997); y el documento WO 97/09425. En ciertas realizaciones, el dominio similar a EGF se une y activa los heterodímeros ErbB2/ErbB4 o ErbB2/ErbB3. En ciertas realizaciones, el dominio similar a EGF comprende la secuencia de aminoácidos del dominio de unión al receptor de NRG-1. En ciertas realizaciones, el dominio similar a EGF comprende la secuencia de aminoácidos que se corresponde con los restos aminoácidos 177-226, 177-237, o 177-240 de NRG-1. En ciertas realizaciones, el dominio similar a EGF comprende la secuencia de aminoácidos del dominio de unión al receptor de NRG-2. En ciertas realizaciones, el dominio similar a EGF comprende la secuencia de aminoácidos del dominio de unión al receptor de NRG-3. En ciertas realizaciones, el dominio similar a EGF comprende la secuencia de aminoácidos del dominio de unión al receptor de NRG-4. En ciertas realizaciones, el dominio similar a EGF comprende la secuencia de aminoácidos Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro, según se describe en la patente de EEUU n.º 5.834.229.

Tal como se emplea en la presente, una “cantidad eficaz” de un agente activo para tratar una enfermedad concreta es una cantidad que es suficiente para mejorar, o de alguna manera reducir, los síntomas asociados con la enfermedad. La cantidad puede curar la enfermedad pero, generalmente, se administra para mejorar los síntomas de la enfermedad.

Tal como se emplea en la presente, un “agente activo” significa cualquier sustancia prevista para el diagnóstico, la cura, la mitigación, el tratamiento o la prevención de una enfermedad en seres humanos y otros animales, o para potenciar de otra forma el bienestar físico y mental.

Tal como se emplea en la presente, una “mejora” de los síntomas de un trastorno concreto mediante la administración de un agente activo concreto se refiere a cualquier disminución, tanto permanente como temporal, duradera o transitoria, que puede atribuirse o asociarse con la administración del agente.

Tal como se emplea en la presente, “tratar” y “tratamiento” se refieren a cualquier manera en la que los síntomas de un trastorno, afección o enfermedad se mejoran, o se alteran de forma beneficiosa de otra manera. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente una enfermedad o sus síntomas y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa para una enfermedad y/o un efecto adverso atribuible a la enfermedad. El tratamiento también incluye cualquier uso farmacéutico de las composiciones de la presente.

Tal como se emplea en la presente, un “vector (o plásmido)” se refiere a elementos discretos que se emplean para introducir ADN heterólogo en células para su expresión o replicación. La selección y el uso de estos vehículos es muy conocido por los expertos en la técnica. Un vector de expresión incluye vectores capaces de expresar ADN que están unidos operativamente con secuencias reguladoras, tales como regiones de promotores, que son capaces de llevar a cabo la expresión de dichos fragmentos de ADN. Así, un vector de expresión se refiere a una construcción de ARN o ADN recombinante, tal como un plásmido, un fago, un virus recombinante u otro vector que, tras su introducción en una célula hospedante apropiada, provoca la expresión del ADN clonado. Los vectores de expresión apropiados son muy conocidos por los expertos en la técnica, e incluyen los que pueden replicarse en células eucariotas y/o células procariotas, y los que permanecen episómicos o los que se integran en el genoma de la célula hospedante.

Tal como se emplea en la presente, la “diferenciación de las células del músculo cardíaco” significa un trastorno caracterizado por una disminución en la síntesis de ADN en más del 10%, una inhibición de la síntesis de ADN estimulada por otros factores en más del 10%, unas estructuras sarcoméricas y adhesiones entre células bien organizadas, la activación sostenida de MAP quinasas, y la mayor expresión de p21^{C1P1}. Se proporciona un análisis más a fondo en el documento WO 00/37095.

Tal como se emplea en la presente, la “fracción de eyección” o “EF” significa la porción de la sangre que se bombea hacia afuera de un ventrículo lleno como resultado de un latido cardíaco. Puede definirse mediante la siguiente fórmula: $(LV \text{ volumen diastólico} - LV \text{ volumen sistólico}) / LV \text{ volumen diastólico}$.

Tal como se emplea en la presente, el “acortamiento fraccional” o “FS” significa la proporción del cambio en el diámetro del ventrículo izquierdo entre los estados contraído y relajado. Puede definirse mediante la siguiente fórmula: $(LV \text{ diámetro diastólico final} - LV \text{ diámetro sistólico final}) / LV \text{ diámetro diastólico final}$.

Tal como se emplea en la presente, una “insuficiencia cardíaca” significa una anomalía de la función cardíaca en la que el corazón no bombea sangre con la velocidad necesaria para las necesidades de los tejidos metabolizantes. La insuficiencia cardíaca incluye una amplia gama de estados de enfermedad, tales como insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio, taquiarritmia, cardiomiopatía hipertrófica familiar, enfermedad cardíaca isquémica, cardiomiopatía dilatada idiopática, miocarditis y similares. La insuficiencia cardíaca puede ser provocada por una serie de factores que incluyen, sin limitación, formas isquémicas, congénitas, reumáticas o idiopáticas. La hipertrofia cardíaca crónica es un estado significativamente enfermo que es precursor de una insuficiencia cardíaca congestiva y parada cardíaca.

Tal como se emplea en la presente, un “infarto de miocardio” se refiere al bloqueo de una arteria coronaria o la interrupción del flujo sanguíneo que conduce a una necrosis focal de parte del miocardio provocada por una isquemia grave y persistente.

Tal como se emplea en la presente, la “liberación extendida” se refiere a proporcionar un nivel terapéutico continuo de un agente activo (por ejemplo, neurregulina) a lo largo de un periodo de tiempo. La liberación extendida incluye, sin limitación, diversas formas de liberación, tales como la liberación continua, liberación controlada, liberación retrasada, depot, liberación gradual, liberación a largo plazo, liberación programada, liberación prolongada, liberación proporcional, liberación alargada, depósito, liberación retrasada, liberación lenta, liberación espaciada, liberación sostenida, revestimiento de liberación en el tiempo, liberación programada, acción retrasada, acción extendida, acción en diferentes momentos, acción larga, acción prolongada, acción repetida, acción lenta, acción sostenida, medicaciones de acción sostenida y liberación controlada. La capacidad para obtener una liberación extendida, liberación controlada, liberación programada, liberación sostenida, liberación retrasada, acción a largo plazo, administración pulsátil o liberación inmediata se realiza utilizando procedimientos y técnicas muy conocidas disponibles para los expertos en la técnica.

La cantidad de tiempo a lo largo del cual el agente activo continúa siendo liberado depende de las características del agente activo y la tecnología o tecnologías de liberación extendida empleadas, pero en todos los casos es mayor que la de la administración del agente activo sin la tecnología o tecnologías de liberación extendida.

Tal como se emplea en la presente, una “microesfera” es sinónimo de “micropartícula”, “microcápsula”, “nanoesfera”, “nanopartícula” y “nanocápsula”, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Tal como se emplea en la presente, “pegilar” significa unir al menos una molécula de polietilenglicol o al menos un derivado de polietilenglicol a un agente activo u otra molécula.

Tal como se emplea en la presente, “sarcómeros o estructuras sarcoméricas organizados, o con mayor organización” significa un estado caracterizado por la disposición ordenada de las proteínas contráctiles, revelada

por una tinción inmunofluorescente de α -actinina en las células del músculo cardíaco. La disposición ordenada de las proteínas de α -actinina en las células puede distinguirse al microscopio y en las fotografías que puedan hacerse con este. Tal como se emplea en la presente, “sarcómeros o estructuras sarcoméricas desorganizados” significa lo contrario de “sarcómeros o estructuras sarcoméricas organizados, o con mayor organización”.

5 Tal como se emplea en la presente, “estructuras del citoesqueleto organizadas, o con mayor organización” significa un estado caracterizado por fibras de actina organizadas que se revela mediante tinción con faloidina de las células musculares cardíacas. Las fibras de actina organizadas en las células pueden distinguirse al microscopio y en las fotografías que puedan hacerse con este, tal como se ejemplifica en las figuras de esta memoria descriptiva. Tal como se emplea en la presente, “estructuras del citoesqueleto desorganizadas” significa lo contrario de “estructuras del citoesqueleto organizadas, o con mayor organización”.

10 Tal como se emplea en la presente, una “proteína” es sinónimo de “polipéptido” o “péptido”, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

15 Tal como se emplea en la presente, la “activación sostenida de MAP quinasas” significa que el estado fosforilado de las MAP quinasas, p42/44, se mantiene durante al menos 21 hr en las células. Se proporciona un análisis más a fondo en el documento WO 00/37095.

20 El término “sinérgico”, la expresión “efecto sinérgico” y similares se emplean en la presente para describir los efectos de un tratamiento mejorados obtenidos combinando uno o más agentes terapéuticos con uno o más compuestos de ácido retinoico. Aunque, en algunos campos, un efecto sinérgico significa un efecto que es más que aditivo (por ejemplo, $1 + 1 = 3$), en el campo de la terapia médica, un efecto aditivo ($1 + 1 = 2$) o menos que aditivo ($1 + 1 = 1,6$) puede ser sinérgico. Por ejemplo, si cada uno de dos fármacos inhiben el desarrollo de la hipertrofia de células musculares ventriculares en 50% cuando se administran de modo individual, no se espera que los dos fármacos combinados detengan completamente el desarrollo de la hipertrofia de células musculares ventriculares. En muchos casos, debido a efectos secundarios inaceptables, los dos fármacos no pueden administrarse juntos. En otros casos, los fármacos se contrarrestan entre sí y frenan el desarrollo de la hipertrofia de las células musculares ventriculares en menos del 50% cuando se administran juntos. Así, se dice que se obtiene un efecto sinérgico si los dos fármacos frenan el desarrollo de la hipertrofia de células musculares ventriculares en más del 50% y, al mismo tiempo, no provocan un aumento inaceptable en los efectos secundarios adversos.

25 Tal como se emplea en la presente, la “hipertrofia cardíaca” significa un trastorno caracterizado por un aumento en el tamaño de las células musculares ventriculares individuales, siendo este aumento en el tamaño de las células suficiente para producir un diagnóstico clínico del paciente, o suficiente para que se determine que las células son más grandes (por ejemplo, 2 veces o más grandes que las células no hipertróficas). Esto puede venir acompañado de la acumulación de proteínas contráctiles dentro de las células cardíacas individuales y la activación de la expresión de genes embrionarios.

30 Los métodos *in vitro* e *in vivo* para determinar la presencia de una hipertrofia de células musculares ventriculares son conocidos. Los ensayos *in vitro* para la hipertrofia de células musculares ventriculares incluyen los métodos descritos en el documento WO 00/37095, por ejemplo, un aumento en el tamaño de las células y un aumento en la expresión del factor natriurético atrial (ANP). Se emplean los cambios en el tamaño de las células en un sistema de puntuación para determinar el grado de la hipertrofia. Estos cambios pueden visualizarse con un microscopio de fase invertida, y el grado de hipertrofia se puntúa con una escala arbitraria de 7 a 0, siendo 7 = células totalmente hipertrofiadas y 3 = células no estimuladas. Los estados 3 y 7 pueden observarse en Simpson et al. (1982), *Circulation Res.*, 51:787-801, figura 2, A y B, respectivamente. Se ha determinado que la correlación entre la puntuación de hipertrofia y la superficie específica de la célula (μm^2) es lineal (coeficiente de correlación = 0,99). En la hipertrofia inducida por fenilefrina, las células no expuestas (normales) tienen una puntuación de hipertrofia de 3 y una superficie específica/célula de $581 \mu\text{m}^2$, y las células totalmente hipertrofiadas tienen una puntuación de hipertrofia de 7 y una superficie específica/célula de $1811 \mu\text{m}^2$, o aproximadamente 200% de la normal. Las células con una puntuación de hipertrofia de 4 tienen una superficie específica/célula de $771 \mu\text{m}^2$, o un tamaño aproximadamente 30% mayor que las células no expuestas; las células con una puntuación de hipertrofia de 5 tienen una superficie específica/célula de $1109 \mu\text{m}^2$, o un tamaño aproximadamente 90% mayor que las células no expuestas; y las células con una puntuación de hipertrofia de 6 tienen una superficie específica/célula de $1366 \mu\text{m}^2$, o un tamaño aproximadamente 135% mayor que las células no expuestas. La presencia de una hipertrofia de células musculares ventriculares preferiblemente incluye células que muestran un mayor tamaño de aproximadamente 15% (puntuación de hipertrofia de 3,5) o mayor. Los inductores de la hipertrofia varían en su capacidad para inducir una respuesta hipertrófica máxima, según se puntúa mediante el ensayo descrito anteriormente. Por ejemplo, el aumento máximo en el tamaño de las células inducido por endotelina es una puntuación de hipertrofia de aproximadamente 5.

50 Tal como se emplea en la presente, la “supresión de la hipertrofia cardíaca” significa una reducción en uno de los parámetros que indican hipertrofia con relación al estado hipertrófico, o la prevención de un aumento en uno de los parámetros que indican hipertrofia con relación al estado normal. Por ejemplo, la supresión de la hipertrofia de células musculares ventriculares puede medirse como una reducción en el tamaño de las células con relación al estado hipertrófico. La supresión de la hipertrofia de células musculares ventriculares significa una disminución en el

tamaño de las células del 10% o mayor con relación al que se observa en el estado hipertrófico. Más preferiblemente, la supresión de la hipertrofia significa una disminución en el tamaño de las células del 30% o mayor; lo más preferiblemente, la supresión de la hipertrofia significa una disminución en el tamaño de las células del 50% o mayor. Con relación al ensayo de puntuación de la hipertrofia cuando se emplea fenilefrina como agente inductor, estas disminuciones se correlacionan con una puntuación de hipertrofia de aproximadamente 6,5 o menor, 5,0-5,5 y 4,0-5,0, respectivamente. Cuando se emplea un agente diferente como agente inductor, la supresión se examina con relación al tamaño máximo de las células (o puntuación hipertrófica) medido en presencia de ese inductor.

La prevención de la hipertrofia de células musculares ventriculares se determina evitando un aumento en el tamaño de las células con relación a las células normales, en presencia de una concentración de inductor suficiente para inducir totalmente la hipertrofia. Por ejemplo, la prevención de la hipertrofia significa un aumento en el tamaño de las células menor que 200% mayor que las células no inducidas en presencia de una concentración máximamente estimulante de inductor. Más preferiblemente, la prevención de la hipertrofia significa un aumento en el tamaño de las células menor que 135% mayor que las células no inducidas; y lo más preferiblemente, la prevención de la hipertrofia significa un aumento en el tamaño de las células menor que 90% mayor que las células no inducidas. Con relación al ensayo de puntuación de la hipertrofia cuando se emplea fenilefrina como agente inductor, la prevención de la hipertrofia en presencia de una concentración máximamente estimulante de fenilefrina significa una puntuación hipertrófica de aproximadamente 6,0-6,5, 5,0-5,5 y 4,0-4,5, respectivamente.

La determinación *in vivo* de la hipertrofia puede incluir la medición de parámetros cardiovasculares, tales como presión sanguínea, frecuencia cardíaca, resistencia vascular sistémica, contractilidad, fuerza del latido cardíaco, hipertrofia concéntrica o dilatada, presión sistólica ventricular izquierda, presión media ventricular izquierda, presión diastólica final ventricular izquierda, gasto cardíaco, índice de accidente cerebrovascular, parámetros histológicos, y espesor de la pared y tamaño ventricular. Los modelos animales disponibles para la determinación del desarrollo y la supresión de la hipertrofia de células musculares ventriculares *in vivo* incluyen el modelo de ratón de sobrecarga de presión, el modelo disfuncional murino RV, el modelo de ratón transgénico, y el modelo de rata tras un infarto de miocardio. Se conocen métodos médicos para evaluar la presencia, el desarrollo y la supresión de la hipertrofia de células musculares ventriculares en pacientes humanos e incluyen, por ejemplo, mediciones de los parámetros diastólicos y sistólicos, cálculos de masa ventricular y flujo de venas pulmonares.

La hipertrofia puede surgir por cualquier causa que responda al ácido retinoico, que incluye causas miotróficas, cardiotróficas, idiopáticas o víricas congénitas, o como resultado de una isquemia o de ataques isquémicos, tales como un infarto de miocardio. Generalmente, el tratamiento se realiza para detener o frenar el avance de la hipertrofia, en especial después de que se hayan producido daños en el corazón, tales como los producidos por una isquemia. Preferiblemente, para el tratamiento de los infartos de miocardio, el agente o agentes se administran inmediatamente después del infarto de miocardio para prevenir o disminuir la hipertrofia.

Tal como se emplea en la presente, una "unidad de actividad" o "IU" significa la cantidad de producto patrón que puede inducir una reacción máxima al 50%. En otras palabras, para determinar la unidad de actividad para un agente activo concreto, debe medirse la EC50, por ejemplo, si la EC50 para un lote de producto es de 0,067 µg/ml, entonces esto constituye una unidad. Además, si se emplea 1 µg de ese producto, entonces se están usando 14,93 U (1/0,067). La EC50 puede determinarse mediante cualquier método conocido en la técnica, que incluye el método empleado por los inventores en los siguientes ejemplos. La determinación de esta unidad de actividad es importante para el control de calidad de productos genéticamente modificados y de fármacos empleados en la clínica, y permite cuantificar, con criterios uniformes, el producto procedente de diferentes compuestos farmacéuticos y/o diferentes números de lote.

En ciertas realizaciones, la unidad de neurregulina se determina midiendo la actividad de la neurregulina mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas de activación del receptor de quinasas (KIRA-ELISA), según se describe en detalle en el siguiente ejemplo 6 y en el documento WO 03/099300, y en Sadick et al., 1996, *Analytical Biochemistry*, 235:207-214, cuyo contenido se incorpora como referencia en su totalidad. Brevemente, el ensayo mide la activación y fosforilación de ErbB2 inducida por neurregulina en la línea celular de carcinoma de mama adherente MCF-7. Las proteínas de membrana se solubilizan mediante una lisis con Triton X-100, y el receptor se captura en pocillos de ELISA revestidos con anticuerpos específicos de ErbB2 (por ejemplo, H4) que no presentan reactividad cruzada con ErbB3 ni ErbB4. Después se cuantifica el grado de fosforilación del receptor mediante UN ELISA antifosfotirosina.

B. Neurregulina

La presente invención proporciona NRG para tratar o prevenir la insuficiencia cardíaca en un mamífero mediante la liberación extendida de una cantidad sostenida o variada de NRG, según se define en las reivindicaciones. Puede utilizarse cualquier proteína, péptido o fragmento de NRG (por ejemplo, NRG-1, NRG-2, NRG-3 y NRG-4 y sus isoformas) en la práctica de esta invención.

La neurregulina o NRG se refiere a proteínas o péptidos que pueden unirse y activar a ErbB2, ErbB3, ErbB4 o sus combinaciones, que incluyen, pero no se limitan a todas las isoformas de neurregulina, el dominio EGF de neurregulina solo, polipéptidos que comprenden el dominio similar a EGF de neurregulina, mutantes o derivados de

neurregulina, y cualquier tipo de producto génico similar a neurregulina que también active a los anteriores receptores, tal como se describe en detalle a continuación. En realizaciones preferidas, la neurregulina empleada en la presente invención se une y activa los heterodímeros ErbB2/ErbB4 o ErbB2/ErbB3. La neurregulina empleada en la presente invención puede activar los anteriores receptores ErbB y modular sus reacciones biológicas, por ejemplo, estimular la diferenciación de células de cáncer de mama y la secreción de proteínas de la leche; inducir la diferenciación de células de la cresta neural en células de Schwann; estimular la síntesis del receptor de acetilcolina en células de músculo esquelético; y/o mejorar la diferenciación, la supervivencia y la síntesis de ADN de cardiocitos. Los ensayos para medir la actividad de unión al receptor son conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden emplearse células transfectadas con el receptor ErbB2 y ErbB4. Después de incubar las células que expresan el receptor con una cantidad en exceso de neurregulina radiomarcada, las células se sedimentan y la disolución que contiene la neurregulina radiomarcada no unida se retira antes de añadir una disolución de neurregulina no marcada para competir con la neurregulina radiomarcada. Se mide la EC50 mediante métodos conocidos en la técnica. La EC50 es la concentración de ligandos que puede competir para retirar 50% de los ligandos radiomarcados unidos del complejo del receptor. Cuanto mayor sea el valor de la EC50, menor será la afinidad de unión al receptor.

La neurregulina incluye cualquier neurregulina y sus isoformas conocidas en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a todas las isoformas de neurregulina-1 ("NRG-1"), neurregulina-2 ("NRG-2"), neurregulina-3 ("NRG-3") y neurregulina-4 ("NRG-4"). La NRG-1 se describe, por ejemplo, en las patentes de EEUU n.ºs 5.530.109, 5.716.930, y 7.037.888; Lemke, Mol. Cell. Neurosci., 1996, 7:247-262; Peles y Yarden, 1993, BioEssays, 15:815-824, 1993; Peles et al., 1992, Cell, 69, 205-216; Wen et al., 1992, Cell, 69, 559-572; Holmes et al., 1992, Science, 256:1205-1210; Falls et al., 1993, Cell, 72:801-815; Marchionni et al., 1993, Nature, 362:312-318. La NRG-2 se describe, por ejemplo, en Chang et al., 1997, Nature, 387:509-512; Carraway et al., 1997, Nature, 387:512-516; Higashiyama et al., 1997, J. Biochem., 122:675-680; Busfield et al., 1997, Mol. Cell. Biol., 17:4007-4014; y la publicación de patente internacional n.º WO 97/09425). La NRG-3 se describe, por ejemplo, en Hijazi et al., 1998, Int. J. Oncol., 13:1061-1067. La NRG-4 se describe, por ejemplo, en Harari et al., 1999, Oncogene, 18:2681-2689.

La neurregulina también incluye el dominio EGF de neurregulina solo, polipéptidos que comprenden el dominio EGF de neurregulina, o productos génicos similares a neurregulina que imitan las actividades de la neurregulina y se unen y activan ErbB2, ErbB3, ErbB4 o sus combinaciones. Tal como se emplea en la presente, un "dominio similar al factor del crecimiento epidérmico" o "dominio similar a EGF" se refiere a un motivo polipeptídico codificado por el gen de neurregulina que se une y activa a ErbB2, ErbB3, ErbB4 o sus combinaciones, y presenta una similitud estructural con el dominio de unión al receptor de EGF, según se describe en el documento WO 00/64400; Holmes et al., Science, 256:1205-1210 (1992); patentes de EEUU n.ºs 5.530.109 y 5.716.930; Hijazi et al., Int. J. Oncol., 13:1061-1067 (1998); Chang et al., Nature, 387:509-512 (1997); Carraway et al., Nature, 387:512-516 (1997); Higashiyama et al., J. Biochem., 122:675-680 (1997); y el documento WO 97/09425.

La neurregulina empleada en la presente invención comprende el dominio similar a EGF codificado por NRG-1. En algunas realizaciones, el dominio similar a EGF comprende la secuencia de aminoácidos del dominio de unión al receptor de NRG-1. En algunas realizaciones, el dominio similar a EGF comprende la secuencia de aminoácidos que se corresponde con los restos aminoácidos 177-226, 177-237, o 177-240 of NRG-1.

En realizaciones preferidas, la neurregulina empleada en la presente invención comprende la secuencia de aminoácidos:

Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr Gln (SEQ ID NO:1), que se corresponde con los aminoácidos 177-237 de la NRG-1 humana. La secuencia de ácido nucleico humana que codifica el fragmento es:

agccatcttg taaaatgtgc ggagaaggag aaaactttct gtgtgaatgg aggggagtg tcatgggtga aagaccttc aaaccctcg agatacttg gcaagtgcc aaatgagttt actggtgatc gctgccaaaa ctacgtaatg gcgagcttct acaaggcgga ggagctgtac cag (SEQ ID NO:2).

Se describe una neurregulina que comprende el dominio similar a EGF codificado por NRG-2, o el dominio similar a EGF codificado por NRG-3, o el dominio similar a EGF codificado por NRG-4, o la secuencia de aminoácidos de Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro, según se describe en la patente de EEUU n.º 5.834.229.

C. La tecnología de liberación extendida en general

La presente invención proporciona composiciones para su uso en la liberación extendida de neurregulina para prevenir, tratar o retrasar la insuficiencia cardíaca. La liberación extendida de neurregulina permite simplificar el programa de administración, mejora la eficacia clínica y atenúa los acontecimientos adversos, por ejemplo, relacionados con un alto nivel en sangre de neurregulina. Se contempla que la liberación extendida de neurregulina a lo largo de un periodo de tiempo concreto induzca o mantenga la expresión de ciertos genes para el crecimiento y/o la diferenciación de cardiomiocitos, la remodelación de las estructuras sarcoméricas y del citoesqueleto de células musculares, o las adhesiones entre células.

La liberación extendida de neurregulina puede administrarse por cualquier vía, según el criterio de los expertos en la técnica, que incluye, pero no se limita a la vía oral, inhalatoria, parenteral (por ejemplo, intravenosa, intramuscular, subcutánea o intradérmica). En ciertas realizaciones, la neurregulina se administra por vía oral. En ciertas realizaciones, la neurregulina se administra por vía intravenosa. En ciertas realizaciones, la neurregulina se administra por vía intramuscular. En realizaciones preferidas, la neurregulina se libera de forma extendida a la corriente sanguínea de un mamífero.

Se describe que la neurregulina puede administrarse mediante cualquier medio de liberación extendida, o mediante cualquier dispositivo de administración conocido por los expertos en la técnica. De forma específica, puede utilizarse cualquier medio extendido o dispositivo de administración para administrar péptidos descrito en las patentes de EEUU n.ºs 3.845.770; 3.916.899; 3.536.809; 3.598.123; y 4.008.719, 5.674.533, 5.059.595, 5.591.767, 5.120.548, 5.073.543, 5.639.476, 5.354.556, 5.639.480, 5.733.566, 5.739.108, 5.891.474, 5.922.356, 5.972.891, 5.980.945, 5.993.855, 6.045.830, 6.087.324, 6.113.943, 6.197.350, 6.248.363, 6.264.970, 6.267.981, 6.376.461, 6.419.961, 6.589.548, 6.613.358, 6.699.500, 6.740.634, 6.838.076, 6.866.866, y 7.087.246. Estas formas de dosificación pueden emplearse para proporcionar la liberación extendida de neurregulina empleando, por ejemplo, hidroxipropilcelulosa, otras matrices poliméricas, geles, membranas permeables, sistemas osmóticos, revestimientos de múltiples capas, micropartículas, liposomas, microesferas, o sus combinaciones para proporcionar el perfil de liberación deseado en proporciones variables. También se describen formas de dosificación unitaria individuales para la administración oral, tales como, pero sin limitarse a comprimidos, cápsulas, cápsulas de gelatina y comprimidos oblongos que están adaptados para la liberación controlada.

Las formas de liberación extendida de neurregulina proporcionan un nivel terapéutico continuo de neurregulina a lo largo de un periodo de tiempo. Por ejemplo, la neurregulina puede liberarse a lo largo de un periodo de 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas, 10 horas, 12 horas, 14 horas, 16 horas, 20 horas, 24 horas o más. Como alternativa, la neurregulina puede liberarse a lo largo de un periodo de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días o más. Como alternativa, la neurregulina puede liberarse a lo largo de un periodo de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas o más. Como alternativa, la neurregulina puede liberarse a lo largo de un periodo de un mes, 2 meses, 4 meses, 8 meses, 12 meses o más. Por ejemplo, la neurregulina puede liberarse a lo largo de un periodo de 1 año, 2 años, 3 años, 4 años o más. Como alternativa, la neurregulina se libera a lo largo de un periodo de entre 1 hora y 2 semanas, entre 2 horas y 2 semanas, entre 4 horas a 24 horas, o entre 4 días y 10 días. La cantidad de tiempo a lo largo del cual se libera la neurregulina puede depender de diversos factores, tales como la tecnología o tecnologías de liberación extendida utilizadas. Según la invención, la neurregulina se libera a lo largo de un periodo de tiempo de entre 4 horas y 12 horas diarias por medio de una bomba osmótica o una bomba de jeringa.

La liberación extendida de neurregulina mantiene la neurregulina en la sangre dentro de un intervalo deseable, en particular a un nivel que es o está por encima del nivel terapéutico eficaz mínimo y que es menor que el nivel tóxico mínimo a lo largo de un periodo de tiempo. La concentración en suero de neurregulina en pacientes que han recibido una composición de neurregulina de liberación extendida puede compararse con las concentraciones en suero de pacientes que han recibido una composición de neurregulina de liberación no extendida (por ejemplo, administración intravenosa) en el momento en que se produce la máxima concentración del nivel sanguíneo (C_{max}). En una realización preferida, los pacientes que reciben una composición de neurregulina de liberación extendida tienen una concentración en suero máxima menor (C_{max}) de neurregulina que los pacientes que reciben una composición de neurregulina no extendida. Preferiblemente, los pacientes que reciben una composición de neurregulina de liberación extendida tienen una C_{max} menor que aproximadamente 90%, 80%, 70% o 60% de la C_{max} en pacientes que recibe una composición de neurregulina de liberación no extendida. Más preferiblemente, los pacientes que reciben una composición de neurregulina de liberación extendida tienen una C_{max} menor que aproximadamente 50%, 40% o 30% de la C_{max} en pacientes que recibe una composición de neurregulina de liberación no extendida. Lo más preferiblemente, los pacientes que reciben una composición de neurregulina de liberación extendida tienen una C_{max} menor que aproximadamente 20%, 10% o menor que la C_{max} en pacientes que recibe una composición de neurregulina de liberación no extendida. Los métodos para medir la concentración de neurregulina en el suero son conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden emplearse células que expresan los receptores ErbB2 y ErbB3, tales como la línea de células de cáncer de mama SKBR-3. Se añaden 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,312, 0,156, 0,078, 0,039, 0,019 y 0,0079 ng de neurregulina a diferentes tubos que contienen células por separado en hielo, y después se añade neurregulina radiomarcada (50.000 cpm). Se mezcla la disolución de muestra y se deja a 4 °C durante la noche. A la mañana siguiente, las células se sedimentan, y el sobrenadante se aspira antes de contar la radiactividad. Se dibuja una curva patrón de radiactividad frente a la cantidad de neurregulina no marcada. Cuando se mide la concentración de neurregulina en el suero, se añade cierta cantidad de suero a un tubo que contiene células en hielo, después se añade neurregulina radiomarcada (50.000 cpm), y se mezcla la disolución de muestra y se deja a 4 °C durante la noche. A la mañana siguiente, las células se sedimentan, y el sobrenadante se aspira antes de contar la radiactividad. Se cuenta la radiactividad y después puede calcularse la cantidad de neurregulina en el suero según la curva patrón.

Pueden proporcionarse diversos perfiles de liberación extendida según la presente invención. Un "perfil de liberación extendida" significa un perfil de liberación en el que menos del 50% de la liberación total de neurregulina que se produce a lo largo de la implantación/inserción, u otro método de administrar neurregulina en el cuerpo, se produce dentro de las primeras 24 horas de la administración. En una realización preferida de la presente invención, el perfil

de liberación extendida se selecciona del grupo que consiste en: (a) el punto de liberación del 50% se produce en un momento entre 24 y 48 horas después de la implantación/inserción, u otro método de administración; (b) el punto de liberación del 50% se produce en un momento entre 48 y 96 horas después de la implantación/inserción, u otro método de administración; (c) el punto de liberación del 50% se produce en un momento entre 96 y 168 horas (1 semana) después de la implantación/inserción, u otro método de administración; (d) el punto de liberación del 50% se produce en un momento entre 1 y 2 semanas después de la implantación/inserción, u otro método de administración; (e) el punto de liberación del 50% se produce en un momento entre 2 y 4 semanas después de la implantación/inserción, u otro método de administración; (f) el punto de liberación del 50% se produce en un momento entre 4 y 8 semanas después de la implantación/inserción, u otro método de administración; (g) el punto de liberación del 50% se produce en un momento entre 8 y 16 semanas después de la implantación/inserción, u otro método de administración; (h) el punto de liberación del 50% se produce en un momento entre 16 y 52 semanas (1 año) después de la implantación/inserción, u otro método de administración; y (i) el punto de liberación del 50% se produce en un momento entre 52 y 104 semanas después de la implantación/inserción, u otro método de administración.

Además, el uso de la presente invención puede reducir el grado de fluctuación (“DFL”) de la concentración plasmática de un agente. El DFL es una medición de la variación de los niveles plasmáticos de un fármaco a lo largo de un intervalo de dosificación. Cuando más cerca de cero (0) esté el DFL, menos varianza existe a lo largo del periodo de dosificación. Así, un DFL reducida significa que la diferencia en los niveles plasmáticos pico y valle se ha reducido. Preferiblemente, los pacientes que reciben una composición de liberación extendida tienen un DFL de aproximadamente 90%, 80%, 70% o 60% del DFL en pacientes que reciben una composición de liberación no extendida. Más preferiblemente, los pacientes que reciben una composición de liberación extendida tienen un DFL de aproximadamente 50%, 40% o 30% del DFL en pacientes que reciben una composición de liberación no extendida. Lo más preferiblemente, los pacientes que reciben una composición de neurregulina de liberación extendida tienen un DFL de aproximadamente 20%, 10% o menor que el DFL en pacientes que reciben una composición de liberación no extendida.

En general, el tamaño y la frecuencia de la dosificación vienen determinadas por las propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas del agente activo. Cuanto más lenta sea la velocidad de absorción, menos fluctuarán las concentraciones sanguíneas dentro de un intervalo de dosificación. Esto permite administrar dosis mayores con menos frecuencia. Sin embargo, muchos agentes activos que pueden solubilizarse con facilidad en el cuerpo normalmente son absorbidos con rapidez y proporcionan un estallido repentino del fármaco disponible. Un ejemplo son los pacientes con hipotensión que toman productos de nifedipina de liberación rápida. El uso de un producto de liberación extendida evita las altas concentraciones sanguíneas iniciales que provocan la reducción brusca en la presión sanguínea y otros cambios hemodinámicos significativos, tales como la taquicardia refleja.

Además, algunos agentes activos son captados y eliminados o destruidos por el cuerpo, por ejemplo, sistema inmunológico, proteasas. Los fármacos con semividas cortas, por esta y por otras razones, a menudo deben administrar el agente activo a intervalos frecuentes para mantener las concentraciones sanguíneas dentro del intervalo terapéutico. Existe una correlación inversa entre la frecuencia de dosificación y el cumplimiento del paciente. Para agentes con semividas relativamente cortas, el uso de productos de liberación extendida puede mantener las concentraciones terapéuticas a lo largo de periodos prolongados. Así, una reducción en el número de dosis diarias que ofrecen los productos de liberación extendida tiene el potencial de mejorar el cumplimiento. Aunque en la presente se describen tecnologías de liberación extendida específicas, la invención es más general que cualquier tecnología de liberación extendida específica. Esto incluye el descubrimiento de que la liberación extendida de NRG a dosis bajas mejora, de forma inesperada, la función del corazón infartado. Además, en la técnica actual se conocen numerosas tecnologías de administración de fármacos de liberación extendida. A continuación se analizan varias en general como tecnologías de liberación extendida preferidas, pero se ofrecen solo con fines de ilustración y no limitación. Muchas otras tecnologías relacionadas y no relacionadas son muy conocidas en la técnica y pueden emplearse en la práctica de la invención descrita en la presente. Además, pueden emplearse combinaciones de las tecnologías de liberación extendida analizadas en la presente y/u otras tecnologías de liberación extendida conocidas en la técnica, en la práctica de esta invención. Por ejemplo, muchas empresas con experiencia específica en las tecnologías de administración de fármacos de liberación extendida (por ejemplo, Alza Corp., Durect Corp., Gilead Sciences, Baxter Pharmaceuticals, Brookwood Pharmaceuticals y OctoPlus) ofrecen productos y servicios que pueden emplearse en la práctica de esta invención. Además, una búsqueda de patentes, solicitudes de patente publicadas y publicaciones relacionadas proporcionará a los expertos en la técnica que lean esta memoria descriptiva posibles tecnologías de liberación extendida significativas. Así, los expertos en la técnica serán capaces de seleccionar la tecnología o tecnologías de liberación extendida deseadas para su uso en la práctica de esta invención.

C.1. Bombas osmóticas

En una realización de la presente invención, la liberación extendida de NRG en la sangre comprende el uso de una bomba osmótica. Los dispositivos osmóticos han demostrado utilidad para transportar agentes activos beneficiosos a un área diana de una manera controlada a lo largo de periodos de tiempo prolongados. Los dispositivos conocidos incluyen comprimidos, píldoras, cápsulas y dispositivos implantables. Los comprimidos y las píldoras pueden tomarse por vía oral, mientras que otras bombas se implantan de forma subcutánea o intraperitoneal, o se unen a un

catéter para la infusión intravenosa, intracerebral o intraarterial.

En general, en un sistema de bomba osmótica, un núcleo se rodea con una membrana semipermeable que tiene al menos un orificio. La membrana semipermeable es permeable al agua, pero impermeable al agente activo. Cuando el sistema se expone a los fluidos corporales, el agua penetra a través de la membrana semipermeable hacia el núcleo que contiene excipientes osmóticos y el agente activo. La presión osmótica aumenta dentro del núcleo y el agente se desplaza a través del orificio a una velocidad predeterminada controlada.

En muchas bombas osmóticas, el núcleo contiene más de un compartimento interno. Por ejemplo, un primer compartimento puede contener el agente activo. Un segundo compartimento contiene un agente osmótico y/o un "miembro conductor". Véase, por ejemplo, la patente de EEUU n.º 5.573.776, cuyos contenidos se incorporan en la presente como referencia. Este compartimento puede tener una alta osmolalidad, que provoca que el agua fluya hacia la bomba a través de la membrana semipermeable. El flujo de agua comprime el primer compartimento. Esto puede lograrse, por ejemplo, empleando un polímero en el segundo compartimento, que se hincha en contacto con el fluido. Por consiguiente, el agente se desplaza a una velocidad predeterminada.

En otras realizaciones, la bomba osmótica puede comprender más de un compartimento que contiene un agente activo, y cada compartimento puede contener el mismo agente o un agente diferentes. Las concentraciones del agente en cada compartimento, así como la velocidad de liberación, también pueden ser iguales o diferentes.

La velocidad de administración en general es controlada por la permeabilidad al agua de la membrana semipermeable. Así, el perfil de administración de la bomba es independiente del agente dispensado, y el peso molecular de un agente, o sus propiedades físicas y químicas, en general no influyen en su velocidad de administración. Un mayor análisis con relación al principio de funcionamiento, los criterios de diseño, y la velocidad de administración para bombas osmóticas se proporciona en Theeuwes y Yum, *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 4, n.º 4 (1976); y Urquhart et. al, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 24:199-236 (1984).

Las bombas osmóticas son muy conocidas en la técnica y están fácilmente disponibles para los expertos en la técnica en empresas con experiencia en proporcionar bombas osmóticas para la administración de fármacos de liberación extendida. Por ejemplo, la tecnología DUROS® de ALZA es un sistema implantable, no biodegradable y que funciona por ósmosis que permite la administración de fármacos pequeños, péptidos, proteínas, ADN y otras macromoléculas bioactivas durante hasta un año; la tecnología OROS® de ALZA incluye comprimidos que emplean la ósmosis para proporcionar una administración del fármaco precisa y controlada durante hasta 24 horas; el sistema Osmodex® de Osmotica Pharmaceutical incluye un comprimido, que puede tener más de un capa del fármaco o fármacos con unos perfiles de liberación idénticos o diferentes; el sistema EnSoTrol® de Shire Laboratories solubiliza fármacos dentro del núcleo y transporta el fármaco solubilizado a través de un orificio abierto con láser por ósmosis; y las bombas Alzet® Osmotic son bombas en miniatura implantables empleadas para la investigación en ratones, ratas y otros animales de laboratorio.

Una búsqueda de patentes, solicitudes de patente publicadas y publicaciones relacionadas también proporcionará a los expertos en la técnica que lean esta memoria descriptiva posibles tecnologías de bombas osmóticas significativas. Por ejemplo, las patentes de EEUU n.ºs 6.890.918; 6.838.093; 6.814.979; 6.713.086; 6.534.090; 6.514.532; 6.361.796; 6.352.721; 6.294.201; 6.284.276; 6.110.498; 5.573.776; 4.200.0984; y 4.088.864, describen bombas osmóticas y métodos para su fabricación. Los expertos en la técnica, considerando la descripción de esta invención y las descripciones de estas otras patentes, pueden producir una bomba osmótica para la liberación extendida de NRG.

Los materiales típicos para la membrana semipermeable incluyen polímeros semipermeables conocidos en la técnica como membranas de ósmosis y de ósmosis inversa, tales como acilato de celulosa, diacilato de celulosa, triacilato de celulosa, acetato de celulosa, diacetato de celulosa, triacetato de celulosa, acetato de agar, triacetato de amilasa, acetato de beta-glucano, acetato de dimetil acetaldehído, carbamato de etilo-acetato de celulosa, poliamidas, poliuretanos, polietirenos sulfonados, ftalato acetato de celulosa, carbamato de metilo-acetato de celulosa, succinato acetato de celulosa, aminoacetato de dimetilo-acetato de cellosa, carbamato de etilo-acetato de celulosa, cloracetato acetato de celulosa, dipalmitato de celulosa, dioctanoato de celulosa, dicaprilato de celulosa, dipentanolato de celulosa, valerato acetato de celulosa, succinato acetato de celulosa, propionato de celulosa, succinato, metilcelulosa, sulfonato de p-tolueno-acetato de celulosa, butirato acetato de celulosa, polímeros semipermeables selectivamente reticulados formados por la coprecipitación de un polianión y un policatión, polímeros semipermeables, derivados de poliestireno ligeramente reticulados, poli(estirensulfonato de sodio) reticulado, poli(cloruro de vinilbenciltrimetilamonio), acetato de celulosa que tiene un grado de sustitución de hasta 1 y un contenido en acetilo de hasta 50%, diacetato de celulosa que tiene un grado de sustitución de 1 a 2 y un contenido en acetilo del 21% al 35%, triacetato de celulosa que tiene un grado de sustitución de 2 a 3 y un contenido en acetilo del 35% al 44,8%, según se describe en la patente de EEUU n.º 6.713.086.

El agente o agentes osmóticos presentes en la bomba pueden comprender cualquier compuesto o compuestos osmóticamente eficaces que muestren un gradiente de presión osmótica a través de la pared semipermeable frente al fluido exterior. Los agentes eficaces incluyen, sin limitación, sulfato de magnesio, sulfato de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de sodio, cloruro de litio, sulfato de potasio, carbonato de sodio, sulfito de sodio, sulfato de litio,

cloruro de potasio, sulfato de sodio, d-manitol, urea, sorbitol, inositol, rafinosa, sacarosa, flucosa, polímeros hidrófilos, tales como polímeros de celulosa, sus mezclas y similares, según se describe en la patente de EEUU n.º 6.713.086.

5 El "miembro conductor" generalmente es un polímero hidrófilo que interacciona con fluidos biológicos y se hincha o expande. El polímero muestra la capacidad de hincharse en agua y conservar una porción significativa del agua embebida dentro de la estructura polimérica. Los polímeros se hinchan o expanden hasta un grado muy alto, y habitualmente muestran un aumento de volumen en 2 a 50 veces. Los polímeros pueden estar o no reticulados. Los polímeros hidrófilos adecuados para el presente objetivo son muy conocidos en la técnica.

10 El orificio puede comprender cualquier medio y método adecuado para liberar el agente activo del sistema. La bomba osmótica puede incluir una o más aberturas u orificios que se han abierto a través de la membrana semipermeable por medio de procedimientos mecánicos conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan al uso de láseres, tal como se describe en la patente de EEUU n.º 4.088.864. Como alternativa, pueden formarse mediante la incorporación de un elemento erosionable, tal como un tapón de gelatina, en la membrana semipermeable.

15 Aunque anteriormente se han analizado realizaciones específicas de las bombas osmóticas, la invención es más general que cualquier tecnología de liberación extendida específica. Esto incluye el descubrimiento de que la liberación extendida de NRG mejora la función del corazón infartado y reduce el diámetro interior del ventrículo izquierdo. Existen numerosas variaciones y diferentes tipos de bombas osmóticas que se conocen en la técnica en la actualidad y que pueden emplearse en la práctica de la invención descrita en la presente.

20 C.2. Acoplamiento de polietilenglicol

Se describe que la liberación extendida de NRG en la sangre comprende el acoplamiento del agente activo a un polímero, tal como polietilenglicol (denominado en lo sucesivo "PEG"). El acoplamiento de PEG a agentes biológicamente activos ha demostrado utilidad para transportar agentes activos hasta un área diana de una manera controlada a lo largo de periodos de tiempo prolongados. En particular, la modificación de proteínas con PEG se ha
25 utilizado mucho dentro de la industria de la biotecnología para reducir la antigenicidad de los agentes terapéuticamente activos y para aumentar su disponibilidad *in vivo*. Por ejemplo, el acoplamiento de PEG a adenosina desaminasa bovina empleando cloruro cianúrico da como resultado la pérdida de inmunogenicidad. De forma similar, el aducto de PEG de la hormona del crecimiento humana y L-asparaginasa de *E. coli* ha demostrado tener una mayor semivida circulatoria.

30 El acoplamiento de PEG a un agente activo u otras moléculas, por ejemplo, la superficie externa de liposomas, puede mejorar la eficacia y semivida del agente activo u otra molécula, y también reducir su toxicidad. En particular, en un medio acuoso, la molécula de PEG se hidrata con un movimiento rápido. Este movimiento rápido provoca que el PEG mueva un gran volumen y evita el acercamiento y la interferencia de otras moléculas, por ejemplo, células inmunológicas o proteasas. Así, cuando se acopla a PEG, las cadenas poliméricas de PEG pueden proteger a la
35 molécula unida frente a la respuesta inmunológica y otros mecanismos de eliminación, manteniendo la disponibilidad del agente activo.

En general, las moléculas de polietilenglicol están conectadas a la proteína a través de un grupo reactivo que se encuentra sobre la proteína. Habitualmente, se emplean grupos amino, tales como los que se encuentra sobre los restos lisina o en el N-terminal, para la unión. Las patentes de EEUU n.ºs 5.824.784 y 4.002.531 describen este tipo
40 de métodos para unir PEG a una enzima mediante alquilación reductora. Los restos lisina pueden sustituirse estratégicamente por otros aminoácidos o insertarse en una secuencia polipeptídica para proporcionar otros puntos de unión, según se describe en la patente de EEUU n.º 4.904.584. Otros métodos conocidos en la técnica para unir derivados de PEG ramificados o de "múltiples ramas" a proteínas se describen en la patente de EEUU n.º 5.932.462. Existen muchos otros métodos de unión conocidos en la técnica para unir polímeros a restos cisteína, grupos
45 carboxi, carbohidratos y otros restos. Por ejemplo, la patente de EEUU n.º 5.900.461 describe derivados de PEG y otros polímeros que tienen un o más restos sulfona activados que son muy selectivos para el acoplamiento con los restos tiol, en lugar de los restos amino, sobre las moléculas.

Los PEG también pueden emplearse para unir macromoléculas a un resto o ligando de transporte dirigido, que dirige
50 las macromoléculas hacia áreas de interés particulares. La patente de EEUU n.º 6.436.386 describe conjugados de polímero-agente activo unidos a un resto de transporte dirigido de hidroxiapatito para el transporte del agente activo, tal como factores del crecimiento óseo, a superficies de hidroxiapatito, tales como el hueso.

Está disponible una amplia variedad de derivados de PEG que son adecuados para su uso en las preparación de conjugados de PEG. Por ejemplo, la serie SUNBRIGHT® de NOF Corp. proporciona numerosos derivados de PEG,
55 que incluyen metoxipolietilenglicoles y derivados de PEG activados, tales como metoxi-PEG amins, maleimidadas y ácidos carboxílicos, para el acoplamiento, mediante diversos métodos, a fármacos; enzimas, fosfolípidos y otros biomateriales y la PEGilación Advanced de Nektar Therapeutics también ofrece diversas tecnologías de acoplamiento de PEG para mejorar la seguridad y la eficacia de los productos terapéuticos.

Una búsqueda de patentes, solicitudes de patente publicadas y publicaciones relacionadas también proporcionará a

los expertos en la técnica que lean esta memoria descriptiva posibles tecnologías de acoplamiento de PEG y derivados de PEG significativas. Por ejemplo, las patentes de EEUU n.ºs 6.436.386; 5.932.462; 5.900.461; 5.824.784; 4.904.584 y 4.002.531, describen estas tecnologías y derivados, y métodos para su fabricación. Así, los expertos en la técnica, considerando la descripción de esta invención y las descripciones de estas otras patentes, pueden acoplar PEG, un derivado de PEG o algún otro polímero a NRG para su liberación extendida.

El PEG es un polímero muy conocido que tiene las propiedades de ser soluble en agua y en muchos disolventes orgánicos, no tiene toxicidad, no tiene inmunogenicidad, y también es transparente, incoloro, inodoro y estable. Un uso de PEG es para unir covalentemente el polímero a moléculas insolubles para hacer que el conjugado de PEG-molécula resultante sea soluble. Por estas y otras razones, el PEG se ha seleccionado como el polímero preferido para la unión, pero se ha empleado solo con objetivos de ilustración y no de limitación. Pueden obtenerse productos similares con otros polímeros hidrosolubles, que incluyen, sin limitación, poli(alcohol vinílico), otros poli(óxidos de alquileno), tales como polipropilenglicol y similares, poli(polioles oxietilados), tales como poli(glicerol oxietilado) y similares, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, etileno/anhidrido maleico, y poliaminoácidos. Los expertos en la técnica serán capaces de seleccionar el polímero deseado basándose en la dosificación deseada, el tiempo de circulación, la resistencia a la proteólisis y otras consideraciones.

C.3. Encapsulación de liposomas

Se describe que la liberación extendida de NRG en la sangre comprende encapsular la NRG en un liposoma, que ha demostrado utilidad para transportar agentes activos beneficiosos de una manera controlada a lo largo de periodos de tiempo prolongados. Los liposomas son membranas de bicapas lipídicas completamente cerradas que contienen un volumen acuoso atrapado. Los liposomas pueden ser vesículas unilaminares que poseen una única bicapa de membrana, o vesículas multilaminares con múltiples bicapas de membrana, cada una separada de la siguiente por una capa acuosa. La estructura de la bicapa de membrana resultante es tal que las colas hidrófobas (no polares) del lípido se orientan hacia el centro de la bicapa, mientras que las cabezas hidrófilas (polares) se orientan hacia la fase acuosa.

En general, en un sistema de administración de fármacos con liposomas, el agente activo se atrapa en el liposoma y después se administra al paciente que se va a tratar. Sin embargo, si el agente activo es lipófilo, puede asociarse con la bicapa lipídica.

El sistema inmunológico puede reconocer a los liposomas convencionales como cuerpos extraños y destruirlos antes de que cantidades significativas del agente activo alcancen el sitio de enfermedad previsto. Así, en una realización, los liposomas pueden revestirse con un polímero hidrosoluble flexible que evite la captación por los órganos del sistema de fagocitos mononucleares, principalmente en el hígado y bazo. Los polímeros hidrófilos adecuados para rodear a los liposomas incluyen, sin limitación, PEG, polivinilpirrolidona, poli(vinil metil éter), polimetiloxazolona, polietiloxazolona, polihidroxipropiloxazolona, polihidroxipropilmetacrilamida, polimetacrilamida, polidimetilacrilamida, poli(metacrilato de hidroxipropilo), poli(acrilato de hidroxetilo), hidroximetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, polietilenglicol, poliaspartamida y secuencias peptídicas hidrófilas según se describe en las patentes de EEUU n.ºs 6.316.024; 6.126.966; 6.056.973; 6.043.094.

Los liposomas pueden estar formados por cualquier lípido o combinación de lípidos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los lípidos formadores de vesículas pueden ser lípidos naturales o sintéticos, que incluyen fosfolípidos, tales como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, ácido fosfatídico, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol y esfingomielina, tal como se describe en las patentes de EEUU n.ºs 6.056.973 y 5.874.104. Los lípidos formadores de vesículas también pueden ser glicolípidos, cerebrosidos o lípidos catiónicos, tales como 1,2-dioleiloxi-3-(trimetilamino)propano (DOTAP); bromuro de N-[1-(2,3,-ditetradeciloxi)propil]-N,N-dimetil-N-hidroxiethylamonio (DMRIE); bromuro de N-[1-[(2,3,-dioleiloxi)propil]-N,N-dimetil-N-hidroxiethylamonio (DORIE); cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA); 3 [N-(N',N'-dimetilaminoetan)carbamoil]colesterol (DC-Choi); o dimetildioctadecilamonio (DDAB), también como se describe en la patente de EEUU n.º 6.056.973. El colesterol también puede estar presente en el intervalo apropiado para impartir estabilidad a las vesículas, según se describe en las patentes de EEUU n.ºs 5.916.588 y 5.874.104.

El liposoma puede dirigirse a sitios específicos dentro del cuerpo de un mamífero mediante la unión de un resto o ligando de transporte dirigido. Se cree que los ligandos de transporte dirigido son reconocidos por los receptores u otros compuestos sobre la superficie de las células diana. Los ligandos diana típicos incluyen anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, ligandos de receptores celulares, lectinas y similares. Para un análisis más a fondo, véanse las patentes de EEUU n.ºs 6.316.024 y 6.294.191.

Estos ligandos de transporte dirigido pueden unirse a los liposomas por cualquier medio conocido en la técnica para unión covalente o no covalente de dichos ligandos a liposomas. Por ejemplo, se han modificado liposomas revestidos con polímeros para lograr el transporte dirigido específico de sitio de agentes activos, uniendo un ligando de transporte dirigido a los restos del grupo de cabeza polar de los componentes lipídicos del liposoma, o los extremos libres de las cadenas poliméricas que forman el revestimiento de superficie de los liposomas, según se describe en las patentes de EEUU n.ºs 6.316.024 y 6.043.094. Estas uniones pueden lograrse, por ejemplo,

mediante el acoplamiento de las proteínas a los liposomas empleando un agente reticulante que tenga al menos un grupo maleimido y una función amina reductora, según se describe en la patente de EEUU n.º 5.399.331; uniendo las proteínas a los liposomas mediante el uso de la glicoproteína estreptavidina, según se describe en las patentes de EEUU n.ºs 4.885.172; 5.059.421 y 5.171.578; el revestimiento de los liposomas de transporte dirigido con polisacáridos; o un lípido formador de vesículas puede derivatizarse con una cadena polimérica hidrófila, cuyo extremo está funcionalizado para el acoplamiento de anticuerpos mediante el uso de un grupo hidrazida o hidrazina que sea reactivo hacia grupos aldehído, según se describe en la patente de EEUU n.º 6.126.966. El grupo del extremo funcionalizado también puede ser 2-piridinditiopropionamida, para el acoplamiento de un anticuerpo u otra molécula al liposoma a través de un enlace disulfuro.

Los liposomas pueden fabricarse mediante técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, en una realización, tal como se describe en la patente de EEUU n.º 5.916.588, se prepara una disolución tamponada del agente activo. Después, un lípido adecuado, tal como fosfatidilcolina de soja hidrogenada, y colesterol, ambos en forma de polvo, se disuelven en cloroformo o similares, y se secan mediante evaporación rotatoria. La película lipídica así formada se resuspende en éter dietílico o similar, se coloca en un matraz y se sonica en un baño de agua durante la adición de la disolución tamponada del agente activo. Cuando el éter se ha evaporado se detiene la sonicación y se aplica una corriente de nitrógeno hasta que se elimina el éter residual. Otros procedimientos de fabricaciones convencionales se describen en las patentes de EEUU n.ºs 6.352.716; 6.294.191; 6.126.966; 6.056.973; 5.965.156; y 5.874.104. Los liposomas pueden producirse mediante cualquier método generalmente aceptado en la técnica para fabricar liposomas que incluye, pero no se limita a los métodos de los documentos citados anteriormente.

Los liposomas también son muy conocidos en la técnica y pueden adquirirse con facilidad en empresas con experiencia en proporcionar liposomas para la administración de fármacos de liberación extendida. Por ejemplo, la tecnología liposómica STEALTH® de ALZA (antes Sequus Pharmaceuticals) para la administración intravenosa de fármacos emplea un revestimiento de polietilenglicol sobre los liposomas para evitar el reconocimiento por el sistema inmunológico; la tecnología liposómica de Gilead Sciences (antes Nexstar) se incorpora en AmBisome®, y un tratamiento aprobado por FDA para infecciones fúngicas; y NOF Corp. ofrece una amplia variedad de fosfolípidos, derivados de fosfolípidos y PEG-fosfolípidos de calidad GMP con los nombres comerciales COATSOME® y SUNBRIGHT®.

Una búsqueda de patentes, solicitudes de patente publicadas y publicaciones relacionadas también proporcionará a los expertos en la técnica que lean esta memoria descriptiva posibles tecnologías liposómicas significativas. Las patentes de EEUU n.ºs 6.759.057; 6.406.713; 6.352.716; 6.316.024; 6.294.191; 6.126.966; 6.056.973; 6.043.094; 5.965.156; 5.916.588; 5.874.104; 5.215.680; y 4.684.479, describen liposomas y microburbujas revestidas con lípidos, y métodos para su fabricación.

C.4. Encapsulación de microesferas

Se describe que la liberación extendida de NRG en la sangre comprende encapsular la NRG en una microesfera. Las microesferas han demostrado utilidad para transportar agentes activos beneficiosos de una manera controlada a lo largo de periodos de tiempo prolongados. Las microesferas en general son biodegradables y pueden utilizarse para la administración subcutánea, intramuscular e intravenosa.

En general, cada microesfera está compuesta por un agente activo y moléculas poliméricas. Tal como se describe en la patente de EEUU n.º 6.268.053, el agente activo puede estar localizado en una posición central dentro de una membrana formada por las moléculas poliméricas o, como alternativa, estar dispersado a través de la microesfera porque la estructura interna comprende una matriz del agente activo y un excipiente polimérico. Generalmente, la superficie externa de la microesfera es permeable al agua, lo cual permite a los fluidos acuosos entrar en la microesfera, así como permite que el agente activo solubilizado y el polímero salgan de la microesfera.

La membrana polimérica puede comprender polímeros reticulados, tal como se describe en la patente de EEUU n.º 6.395.302. Cuando el tamaño de los poros del polímero reticulado es igual o menor que el diámetro hidrodinámico del agente activo, el agente activo se libera fundamentalmente cuando el polímero se degrada. Por otra parte, si el tamaño de poro de los polímeros reticulados es mayor que el tamaño del agente activo, el agente activo se libera al menos parcialmente por difusión.

Se conocen otros métodos para fabricar membranas de microesferas y se emplean en la técnica. Los materiales típicos para la membrana externa incluyen las siguientes categorías de polímeros: (1) polímeros con una base de carbohidratos, tales como metilcelulosa, polímeros basados en carboximetilcelulosa, dextrano, polidextrosa, quitinas, quitosano y almidón (incluido hetaalmidón) y sus derivados; (2) alcoholes polialifáticos, tales como poli(óxido de etileno) y sus derivados, que incluyen polietilenglicol (PEG), PEG-acrilatos, polietilenimina, poli(acetato de vinilo) y sus derivados; (3) polímeros de polivinilo, tales como poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli(fosfato de vinilo), poli(ácido vinilfosfónico) y sus derivados; (4) poli(ácidos acrílicos) y sus derivados; (5) poli(ácidos orgánicos), tales como poli(ácido maleico) y sus derivados, (6) poliaminoácidos, tales como polilisina y poliiminoácidos, tales como poliiminotirosina y sus derivados; (7) copolímeros y copolímeros en bloque, tales como poloxámero 407 o polímero Pluronic L-101™ y sus derivados; (8) terc-polímeros y sus derivados; (9) poliéteres, tales como poli(tetrametilen éter

glicol) y sus derivados; (10) polímeros naturales, tales como zeína, quitosano y pululano, y sus derivados; (11) poliimidias, tales como poli(metacrilato de n-tris(hidroximetil)metilo) y sus derivados; (12) tensioactivos, tales como polioxi-etilensorbitano y sus derivados; (13) poliésteres, tales como poli(etilenglicol) (n)monometil éter mono(succinimidil succinato)éster y sus derivados; (14) polímeros ramificados y ciclopolímeros, tales como PEG ramificado y ciclodextrinas, y sus derivados; y (15) polialdehídos, tales como poli(óxido de perfluoropropileno-b-perfluoroformaldehído) y sus derivados, según se describe en la patente de EEUU n.º 6.268.053. Otros polímeros típicos conocidos por los expertos en la técnica incluyen poli(lactida-co-glicólido), homopolímero de polilactida; homopolímero de poliglicólido; policaprolactona; copolímero de polihidroxibutirato-poli-hidroxivalerato; poli(lactida-co-caprolactona); poliesteramidas; poliortoésteres; poli(ácido 13-hidroxibutírico); y polianhídridos, según se describe en la patente de EEUU n.º 6.517.859.

En una realización, las microesferas se unen o están revestidas con otras moléculas. Estas moléculas pueden facilitar el transporte dirigido, potenciar la mediación de los receptores y proporcionar la huida de la endocitosis o la destrucción. Las moléculas típicas incluyen fosfolípidos, receptores, anticuerpos, hormonas y polisacáridos. Además, una o más moléculas escindibles pueden unirse a la superficie externa de las microesferas para dirigirlas a un sitio predeterminado. Después, bajo las condiciones biológicas apropiadas, la moléculas se escinde provocando la liberación de la microesfera de la diana.

Las microesferas se fabrican mediante técnicas convencionales. Por ejemplo, en una realización, se realiza una exclusión de volumen mezclando el ingrediente activo en disolución con un polímero o mezcla de polímeros en disolución en presencia de una fuente de energía durante un tiempo suficiente para que se formen partículas, tal como se describe en la patente de EEUU n.º 6.268.053. El pH de la disolución se ajusta a un pH cercano al punto isoeléctrico (pI) de la macromolécula. Después, la disolución se expone a una fuente de energía, tal como calor, radiación o ionización, sola o en combinación con sonicación, mezclado en vórtice, mezclado o agitación, para formar las micropartículas. Las micropartículas resultantes después se separan de cualquier componente no incorporado presente en la disolución por medio de métodos de separación física muy conocidos por los expertos en la técnica, y después pueden lavarse. Se describen otros procedimientos de fabricación convencionales en las patentes de EEUU n.º 6.669.961; 6.517.859; 6.458.387; 6.395.302; 6.303.148; 6.268.053; 6.090.925; 6.024.983; 5.942.252; 5.981.719; 5.578.709; 5.554.730; 5.407.609; 4.897.268; y 4.542.025.

Las microesferas son muy conocidas y los expertos en la técnica pueden adquirirlas con facilidad en empresas con experiencia en proporcionar estas tecnologías para el transporte de fármacos de liberación extendida. Por ejemplo, Epic Therapeutics, una división de Baxter Healthcare Corp., ha desarrollado PROMAXX®, un sistema de transporte de fármacos de matriz de proteínas que produce microesferas de proteínas bioerosionables en un proceso totalmente basado en agua; OctoPlus ha desarrollado OctoDEX®, microesferas de dextrano reticulado que liberan los ingredientes activos basándose en la degradación en masa de la matriz, en lugar de basarse en la erosión de la superficie; y Brookwood Pharmaceuticals publicita la disponibilidad de sus tecnologías de micropartículas para la administración de fármacos.

Una búsqueda de patentes, solicitudes de patente publicadas y publicaciones relacionadas también proporcionará a los expertos en la técnica que lean esta memoria descriptiva posibles tecnologías de microesferas significativas. Por ejemplo, las patentes de EEUU n.ºs 6.669.961; 6.517.859; 6.458.387; 6.395.302; 6.303.148; 6.268.053; 6.090.925; 6.024.983; 5.942.252; 5.981.719; 5.578.709; 5.554.730; 5.407.609; 4.897.268; y 4.542.025, describen microesferas y métodos para su fabricación.

D. Dosificación y frecuencia de la administración

La cantidad de neurregulina empleada en la presente invención variará según la naturaleza y la gravedad de la enfermedad o el trastorno, y la vía mediante la cual se administra el ingrediente activo. La frecuencia y la dosificación también variarán según factores específicos para cada paciente que dependen de la terapia específica (por ejemplo, agentes terapéuticos o profilácticos) administrada, la gravedad del trastorno, enfermedad o afección, la vía de administración, así como la edad, el peso corporal, la respuesta, y la historia médica pasada del paciente. Las dosis eficaces pueden extrapolarse de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de ensayo de modelos animales o *in vitro*.

Los ejemplos de dosis de neurregulina incluyen cantidades de miligramos o microgramos de neurregulina por kilogramo de sujeto o peso de la muestra (por ejemplo, de aproximadamente 1 microgramo por kilogramo a aproximadamente 500 miligramos por kilogramo, de aproximadamente 100 microgramos por kilogramo a aproximadamente 5 miligramos por kilogramo, o de aproximadamente 1 microgramo por kilogramo a aproximadamente 50 miligramos por kilogramo). Para la liberación extendida de la neurregulina empleada en la invención, la dosificación administrada a un paciente es generalmente de 0,001 mg/kg a 15 mg/kg de peso corporal del paciente, basado en el peso del péptido activo. Preferiblemente, la dosificación administrada a un paciente es entre 0,001 mg/kg y 15 mg/kg, 0,005 mg/kg y 10 mg/kg, 0,01 mg/kg y 5 mg/kg, 0,001 mg/kg y 4 mg/kg, 0,005 mg/kg y 3 mg/kg, 0,01 mg/kg y 2 mg/kg, 0,001 mg/kg y 1 mg/kg, 0,005 mg/kg y 0,5 mg/kg, 0,010 mg/kg y 0,2 mg/kg, 0,005 mg/kg y 0,050 mg/kg del peso corporal del paciente.

Los ejemplos de dosis de neurregulina también incluyen unidades (U) o cantidades unitarias de neurregulina por

kilogramo del sujeto o peso de la muestra (por ejemplo, de aproximadamente 1 U por kilogramo a aproximadamente 5000 U por kilogramo, de aproximadamente 10 U por kilogramo a aproximadamente 1000 U por kilogramo, o de aproximadamente 100 U por kilogramo a aproximadamente 500 U por kilogramo). Para la liberación extendida de la neurregulina empleada en la invención, la dosificación administrada a un paciente es generalmente de 10 U/kg a 1000 U/kg del peso corporal del paciente, basándose en el peso del péptido activo. Preferiblemente, la dosificación administrada a un paciente es entre 1 U/kg y 10.000 U/kg, 1 U/kg y 5000 U/kg, 10 U/kg y 5000 U/kg, 10 U/kg y 1000 U/kg, 50 U/kg y 2000 U/kg, 50 U/kg y 1000 U/kg, 50 U/kg y 500 U/kg, 100 U/kg y 1000 U/kg, 100 U/kg y 500 U/kg, 100 U/kg y 200 U/kg del peso corporal del paciente.

En general, el intervalo de dosis diaria recomendada de neurregulina en los métodos de la invención para los trastornos descritos en la presente se encuentra en el intervalo de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 1000 mg diarios. De forma específica, un intervalo de dosis diaria total debe estar entre 0,001 mg diarios y 15 mg diarios, 0,005 mg diarios y 10 mg diarios, 0,01 mg diarios y 5 mg diarios, 0,001 mg diarios y 4 mg diarios, 0,005 mg diarios y 3 mg diarios, 0,01 mg diarios y 2 mg diarios, 0,001 mg diarios y 1 mg diarios, 0,005 mg diarios y 0,5 mg diarios, 0,010 mg diarios y 0,2 mg diarios. En la gestión del paciente, la terapia puede iniciarse a una dosis más baja, quizá de aproximadamente 0,1 µg a aproximadamente 1 µg, y aumentarse si es necesario hasta aproximadamente 20 µg mg a aproximadamente 100 µg diarios, como una única dosis o en dosis divididas, dependiendo de la respuesta global del paciente. Puede ser necesario emplear dosificaciones del ingrediente activo fuera de los intervalos descritos en la presente en algunos casos, tal como será evidente para los expertos en la técnica. Además, debe advertirse que el médico encargado sabrá cómo y cuándo interrumpir, ajustar o terminar la terapia en conjunción con la respuesta del paciente individual. En ciertas realizaciones, la neurregulina se administra en una cantidad de aproximadamente 1 U/día a aproximadamente 10.000 U/día. En algunas realizaciones, se administra en una cantidad de aproximadamente 1 U/día a aproximadamente 5000 U/día. En algunas realizaciones, se administra en una cantidad de aproximadamente 10 U/día a aproximadamente 2000 U/día. En algunas realizaciones, se administra en una cantidad de aproximadamente 10 U/día a aproximadamente 1000 U/día. En algunas realizaciones, se administra en una cantidad de aproximadamente 100 U/día a aproximadamente 200 U/día.

La neurregulina también puede administrarse con un programa de dosificación o "ciclo terapéutico". La dosificación diaria de neurregulina en el ciclo terapéutico se ha descrito en detalle anteriormente. El ciclo terapéutico puede durar 2 días, 5 días, 7 días, 10 días, dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, cinco semanas o seis semanas.

En ciertas realizaciones, la neurregulina se administra a diario cada día del ciclo terapéutico. En ciertas realizaciones, la neurregulina se administra consecutivamente durante tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce días en un ciclo terapéutico.

En ciertas realizaciones, en un ciclo terapéutico, la neurregulina se administra en el día 1 del ciclo, y el ciclo concluye con uno o más días de no administración de neurregulina. En algunas realizaciones, la neurregulina se administra a diario durante 3, 5, 7 o 10 días, seguido de un periodo de descanso en un ciclo terapéutico.

E. *Terapa de combinación*

En una realización, la presente invención es útil para prevenir la insuficiencia cardíaca en pacientes que están siendo tratados con un fármaco que provoca hipertrofia cardíaca o insuficiencia cardíaca, por ejemplo, acetato de fludrocortisona o herceptina. La NRG puede administrarse antes, de forma simultánea, o después de un fármaco que provoca estas enfermedades cardíacas.

En otra realización de la invención, la NRG se administra en combinación con una cantidad eficaz de un compuesto que actúa para suprimir una vía de inducción de la hipertrofia diferente a la NRG. En una realización alternativa, la NRG se administra con dichos supresores de la hipertrofia y/u otros componentes que pueden ser, sin limitación, un inhibidor cardiotorfófico, tal como un antagonista de Ct-1 (cardiotrofina-1), un inhibidor de ACE, tal como captoprilo (Capoten®) y/o la hormona del crecimiento humana y/o IGF-1 (factor del crecimiento similar a la insulina I) en el caso de la insuficiencia cardíaca congestiva, o con otro factor antihipertrófico, miocardiotorfófico, antiaritmico o inotrópico en el caso de otros tipos de insuficiencia cardíaca o trastorno cardíaco.

En otra realización de la invención, la NRG se administra en combinación con estrategias terapéuticas actuales para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca que incluyen, sin limitación, inhibidores de ACE y otros vasodilatadores, diuréticos, preparaciones de digitalis, beta-bloqueantes, antiespesantes de la sangre, bloqueantes del receptor de angiotensina II, bloqueantes del canal de calcio o potasio.

Los inhibidores de ACE, que evitan la conversión de angiotensina I en angiotensina II, son vasodilatadores que hacen que los vasos sanguíneos se expandan, disminuyen la presión sanguínea y reducen la carga de trabajo del corazón. Los vasodilatadores adecuados para su uso en las realizaciones de la presente invención incluyen, sin limitación, los siguientes fármacos: quinaprilo (Accupril®), ramiprilo (Altace®), captoprilo (Capoten®), benazeprilo (Lotensin®), fosinoprilo (Monopril®), lisinoprilo (Prinivil® o Zestril®), enalaprilo (Vasotec®), moexiprilo (Univasc®), trandolaprilo, y perindoprilo. Otros vasodilatadores útiles en la presente invención incluyen, sin limitación, dinitrato de isosorbida (Isordil®), nesiritida (Natreacor®), hidralazina (Apresoline®), nitratos y minoxidilo.

Los diuréticos hacen que los riñones eliminen el sodio y el agua de la corriente sanguínea, reduciendo la carga de trabajo del corazón, e incluyen, sin limitación, los siguientes fármacos: hidroclorotiazida (HydroDIURIL®), clorotiazida (Diuril®), furosemida (Lasix®), bumetanida (Bumex®), espironolactona (Aldactone®), triamtereno (Dyrenium®), metolazona (Zaroxolyn®), torsemida, indapamida, politiazida, amilorida, y agentes de combinación (Dyazide®).

- 5 Las preparaciones de digitalis aumentan la fuerza de las contracciones del corazón e incluyen, sin limitación, digoxina (Lanoxin®) y digitoxina.

Los beta-bloqueantes reducen la tendencia del corazón a latir más rápido e incluyen, sin limitación, los siguientes fármacos: carvedilol (Coreg®) metoprolol (Lopressor® o Toprol XL®), atenolol, bisoprolol, labetalol, propranolol, sotalol, pindolol, penbutolol, acebutolol, timolol, nadolol, y betaxolol.

- 10 Los antiestresantes de la sangre para su uso en las realizaciones de la presente invención incluyen, sin limitación, warfarina (Coumadin®) y heparina.

- 15 Las realizaciones de la presente invención también pueden utilizar bloqueantes del receptor de angiotensina II que, en lugar de disminuir los niveles de angiotensina II (tal como hacen los inhibidores de ACE), evitan que la angiotensina II afecte al corazón y los vasos sanguíneos. Los bloqueantes del receptor de angiotensina II adecuados para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación, iosartano (Cozaar®), valsartano (Diovan®), irbesartano (Avapro®), candesartano, eprosartano, telmisartano, y olmesartano.

Los bloqueantes del canal de calcio se emplean en general para tratar la presión sanguínea alta que a menudo está asociada con la insuficiencia cardíaca. Los bloqueantes del canal de calcio adecuados para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación, amlodipina (Norvasc®).

- 20 En realizaciones alternativas de la presente invención, la liberación extendida de NRG también puede combinarse con la administración de terapias de fármacos para el tratamiento de enfermedades cardíacas, tales como la hipertensión. Por ejemplo, la NRG puede administrarse con antagonistas del receptor de endotelina, tales como anticuerpos contra el receptor de endotelina, y péptidos u otros antagonistas de molécula pequeña similares; antagonistas del 3-adrenorreceptor, tales como carvedilol; antagonistas del α_1 -adrenorreceptor; antioxidantes; compuestos que tienen múltiples actividades (por ejemplo, 3-bloqueante/a-bloqueante/antioxidante); compuestos similares al carvedilol, o combinaciones de compuestos que proporcionan las múltiples funciones que se encuentran en el carvedilol; hormona del crecimiento, etc.

- 30 Los agonistas de neuregulina solos o en combinación con otros agonistas de la vía de supresores de la hipertrofia o con moléculas que antagonizan vías de inducción de la hipertrofia conocidas, son útiles como fármacos para el tratamiento *in vivo* de mamíferos que han sufrido una insuficiencia cardíaca, para prevenir o disminuir los efectos de la insuficiencia cardíaca.

- 35 Las formulaciones terapéuticas de un agonista o agonistas para tratar trastornos cardíacos se preparan para la conservación mezclando el agonista o agonistas que tienen el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Oslo, A., ed., 1980), en forma de una torta liofilizada o disoluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y las concentraciones empleadas, e incluyen tampones, tales como tampón fosfato, citrato y de otros ácidos orgánicos; antioxidantes, que incluye ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menor que aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes de azúcares, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos, tales como Tween, Pluronic, o polietilenglicol (PEG). El antagonista o antagonistas también pueden estar unidos de forma adecuada a uno de una diversidad de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol o polialquilenos, de la manera que se indica en las patentes de EEUU n.ºs 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337. La cantidad de vehículo empleado en la formulación puede variar de aproximadamente 1% al 99%, preferiblemente de aproximadamente 80% al 99%, opcionalmente entre 90% y 99% en peso.

- 50 El agonista o agonistas que se van a utilizar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra con facilidad mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles, antes o después de la liofilización y la reconstitución. El agonista o agonistas normalmente se conservarán en una forma liofilizada o en disolución.

- 55 Las composiciones de agonistas terapéuticas generalmente se colocan en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tenga un tapón que pueda ser atravesado por una aguja de inyección hipodérmica. La administración del agonista o agonistas se realiza solo de forma crónica, por ejemplo, mediante una de las siguientes vías: inyección o infusión por vía intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial o intralesional, por vía oral o empleando sistemas de liberación sostenida, tal como se indicó anteriormente.

Tal como se analizó anteriormente, los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen la proteína, estando estas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), según se describe en Langer et al. (1981), J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277, y Langer (1982), Chem. Tech., 12:98-105, o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de EEUU n.º 3.773.919, documento EP 58.481), copolímeros del ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato (Sidman et al. (1983), Biopolymers, 22: 547-556), etileno-acetato de vinilo no degradable (Langer et al. (1981), *supra*), copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como Lupron Depot™ (microesferas inyectables compuestas por copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y poli(ácido D-(-)-3-hidroxibutírico) (documento EP 133.988).

El agonista o agonistas también pueden estar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial (por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina, y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente), en sistema de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Estas técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, *supra*.

Aunque los polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas a lo largo de 100 días, ciertos hidrogeles liberan moléculas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando las moléculas encapsuladas permanecen en el cuerpo durante largo tiempo pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a la humedad a 37 °C, dando como resultado una pérdida en la actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden diseñarse estrategias lógicas para la estabilización, dependiendo del mecanismo implicado, por ejemplo, empleando los aditivos apropiados, y desarrollando composiciones de matrices de polímeros específicas.

Las composiciones de agonista o agonistas de liberación sostenida también incluyen un agonista o agonistas atrapados en liposomas. Los liposomas que contienen un agonista o agonistas se preparan mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, los descritos en el documento DE 3.218.121; Epstein et al. (1985), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688-3692; Hwang et al. (1980), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4030-4034; documento EP 52.322; documento EP 36.676; documento EP 88.046; documento EP 143.949; documento EP 142.641; solicitud de patente japonesa 83-118008; patentes de EEUU n.ºs 4.485.045 y 4.544.545; y documento EP 102.324. Un ejemplo específico de una formulación de liberación sostenida adecuada se encuentra en el documento EP 647.449.

En otra realización de la presente invención, la NRG se combina o se administra con otros agentes para tratar la insuficiencia cardíaca congestiva, que incluyen inhibidores de ACE (tal como se analizó anteriormente), inhibidores de CT-1, hormona del crecimiento humana y/o IGF-1. Las cantidades eficaces de estos agentes, si se emplean, seguirán el criterio del médico. La administración y el ajuste de la dosificación se determinan mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica para lograr la mejor gestión de la insuficiencia cardíaca congestiva y, de modo ideal, se toma en consideración el uso de diuréticos o digitalis, y los trastornos tales como hipotensión o deterioro renal. La dosis dependerá también de factores tales como el tipo de fármaco empleado y el paciente específico que se está tratando. Generalmente, la cantidad empleada será la misma dosis que la empleada si el fármaco se fuera a administrar sin agonista; sin embargo, pueden emplearse unas dosis menores dependiendo de factores tales como la presencia de efectos secundarios, el trastorno que se está tratando, el tipo de paciente, y el tipo de agonistas y fármaco, con la condición de que la cantidad total de agente proporcione una dosis eficaz para el trastorno que se está tratando.

F. Kits

La solicitud se refiere a kits para realizar los regímenes terapéuticos de la invención. Estos kits comprenden, en uno o más recipientes, cantidades terapéuticamente eficaces de la NRG descrita en la presente, sola o en combinación con otros agentes, en una forma farmacéuticamente aceptable y en combinación con una tecnología de liberación extendida, según se describe en la presente. Opcionalmente se incluyen instrucciones para la administración de la composición de NRG de liberación extendida por un médico o por el paciente.

G. Ejemplos

Tal como se muestra en los ejemplos, la invención reside en el descubrimiento de que la liberación extendida de NRG activa la vía de señalización de AKT o ERK de una forma tan eficaz como la NRG administrada por otros métodos, y mejora la función del corazón infartado mucho más que la NRG administrada por otros métodos. Sin embargo, las interacciones de NRG con los receptores ErbB se han implicado en otras enfermedades y trastornos, por ejemplo, enfermedades del sistema nervioso central y periférico. Los ejemplos de otras enfermedades y trastornos incluyen diversas enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedad del sistema neural y/o enfermedades musculares, que incluyen distrofia muscular (por ejemplo, Duchenne, distrofia muscular de cinturas) y esclerosis múltiple, lesión espinal, enfermedades del ojo y el oído, diabetes, esquizofrenia y enfermedad de Alzheimer.

La invención se ilustrará más a fondo haciendo referencia a los siguientes ejemplos no limitantes. Se ha intentado

asegurar la precisión con respecto a los números empleados, pero deben tomarse en cuenta algunos errores experimentales y desviaciones.

Ejemplo 1: Fosforilación de AKT y ERK en el ventrículo izquierdo de ratas normales después de infundir NRG mediante diferentes métodos

5 Para comparar el efecto de NRG con diversos métodos de tratamiento sobre la transducción de señales dentro de miocitos cardíacos en el ventrículo izquierdo, los inventores infundieron NRG por vía intravenosa (denominada en lo sucesivo "IV"), intramuscular (denominada en lo sucesivo "IM") y con un ensayo de tolerancia a la glucosa IV (denominado en lo sucesivo "IVGTT").

10 Ratas Wistar macho (Shanghai Animal Center of Chinese Academy of Science), que pesaban 180 ± 20 gramos, fueron numeradas, pesadas, y se dividieron en grupos. Cada grupo contenía tres ratas. Un grupo recibió una inyección IV de 4 ml/kg (volumen/peso corporal) de vehículo ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 10 mM, NaCl 150 mM, albúmina de suero humana (HSA) al 0,2%, manitol al 5%, pH 6,0) como control. Otros cuatro grupos de ratas recibieron una inyección IM de 4 ml/kg (volumen/peso corporal) de NRG (fragmento de NRG humana recombinante 37,3 U/ml (secuencia desde el aminoácido 177 al 237 de NRG1 β 2 humana producida por Zensun Science & Technology, n.º de lote 200503002)) disuelta en vehículo (tal como se describió anteriormente). Otros cuatro grupos de ratas recibieron una inyección IV de 4 ml/kg (volumen/peso corporal) de NRG (tal como se describió anteriormente). Otros cinco grupos de ratas recibieron 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ de infusión de ensayo de tolerancia a la glucosa de NRG (tal como se describió anteriormente) mediante una inyección IV (IVGTT) durante dos horas. Así, la cantidad total de NRG administrada a cada rat (excepto para el grupo con vehículo) fue de 149,3 U/kg de peso corporal.

20 Las ratas se sacrificaron por separado a los 20 min, 1 hr, 2 hr, 4 hr y 6 hr. Los ventrículos izquierdos de cada grupo de ratas se cortaron en pedazos en tampón de lisis frío (Tris 50 mM, pH 7,4, EDTA 5 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1%, Na_2VO_4 2 mM, NaF 50 mM, PMSF 2 mM, cóctel de inhibidores de proteasas (sin EDTA, Roche)), después se reunieron, y se lavaron con PBS frío. Los ventrículos después se homogeneizaron en agua helada y se centrifugaron (Kendro Biofuge) a 12.000 rpm durante 5 min a 4 °C en tubos Eppendorf de 1,5 ml. El sobrenadante se recogió y se centrifugó una vez más, y después se conservó a -80 °C. Las muestras se descongelaron y se volvieron a centrifugar antes de usarse. La concentración de proteínas de cada muestra se determinó mediante un ensayo de proteínas BCA (kit de ensayo de proteínas BCA de Pierce). Una cierta cantidad de cada muestra se mezcló con 2x tampón de muestra (Tris 0,125 M, pH 6,8, glicerol al 20%, SDS al 4%, DTT 0,2 M, azul de bromofenol al 0,012%) y se hirvió para la electroforesis antes de una transferencia a una membrana de PVDF (Millipore). Se detectó la fosforilación de AKT y ERK, así como la cantidad de AKT y ERK en cada muestra con anticuerpos (anticuerpo de ERK y anticuerpo de ERK fosforilado (Santa Cruz Biotechnology); anticuerpo de AKT y anticuerpo de AKT fosforilado (Cell Signaling)).

35 El desarrollo en el tiempo de la fosforilación de AKT y ERK en el ventrículo izquierdo de ratas normales cuando se infunde NRG mediante cada uno de estos métodos diferentes se muestra en la figura 1. Comparado con el vehículo, la NRG infundida mediante IM, IV e IVGTT activa la fosforilación sostenida de ERK. La fosforilación de AKT inducida por cada método alcanza un pico a los 20 min y disminuye en 1 hr, pero vuelve a aumentar de nuevo a las 2 hr, en donde se mantiene a un nivel alto de 4 hr a 6 hr. Así, no existe una diferencia obvia entre los diferentes métodos de inyectar NRG con respecto a su capacidad para sostener la fosforilación de ERK y AKT. Esto indica que la NRG infundida constantemente es tan eficaz como una inyección de NRG. Pro tanto, la infusión de IVGTT es un método potencial para tratar unas malas condiciones cardíacas.

Ejemplo 2: Función del corazón de rata con la arteria coronaria del ventrículo izquierdo ligada después de un tratamiento con neurregulina mediante diferentes métodos

45 Una bomba osmótica es una manera de administrar constantemente NRG (como IVGTT), y los inventores estudiaron si la NRG infundida mediante una bomba osmótica es tan eficaz como una inyección IV convencional para restablecer la función de un corazón con infarto de miocardio (MI).

A. Ligadura de la arteria coronaria del ventrículo izquierdo de rata y ecocardiografía

50 Ratas Wistar macho (Shanghai Animal Center of Chinese Academy of Science), que pesaban 200 ± 20 gramos, fueron anestesiadas mediante una inyección intraperitoneal de 100 mg/kg (fármaco/peso corporal) de ketamina. El cuello y el pecho fueron depilados y desinfectados. Se realizó una incisión en la mitad frontal del cuello para exponer la tráquea. Se insertó un catéter sobre aguja introductora 18G en la tráquea entre el 3^{er} y el 5^o cartilago de la tráquea. Después de extraer la aguja, una cánula de plástico se introdujo en la tráquea 1-2 cm y se fijó para conectar el ventilador Rodent Ventilator (ventilador SAR-830/P, caudal inspiratorio, 1 ml/100 g/respiración; velocidad respiratoria, 60 respiraciones/min). Se realizó otra incisión en el pecho frontal izquierdo. La piel se sometió a una disección roma para exponer la cuarta y quinta costilla, y después la cuarta costilla se cortó con un fórceps de mosquito con codo. El ventilador (tal como se describió anteriormente) se conectó a la cánula y se encendió, y el corazón se expuso para comprobar el estado del pulmón y del corazón. El pericardio se hendió para identificar el atrio izquierdo y el cono de la arteria pulmonar, después de que el corazón se exteriorizase a través de la incisión. La arteria coronaria descendente anterior del ventrículo izquierdo entre ambos fue ligada fuertemente con una sutura

médica 6/0 antes de volver a colocar el corazón en la cavidad torácica. Se cosió la cavidad torácica. El ventilador se bloqueó para llenar completamente el pulmón. El músculo y la piel del pecho se cosieron después de presionar cuidadosamente la cavidad torácica para extraer el aire. Los ventiladores se retiraron de las ratas hasta que volvió una respiración espontánea constante.

- 5 Después se estudió la función cardíaca de las ratas mediante ecocardiografía (sonda Philips Sonos 7500 S4) en el día 14 después de la ligadura. Las ratas con unos valores de la fracción de eyección (en lo sucesivo "EF") del 30% al 50% fueron separadas y agrupadas (15 ratas por grupo).

B. Tratamiento de las ratas ligadas con neurregulina

- 10 Las ratas fueron pesadas en el día 15 después de la ligadura coronaria del ventrículo izquierdo para determinar la cantidad de NRG necesaria. Las ratas en el grupo con vehículo recibieron 0,4 ml/100 g (volumen/peso corporal) de vehículo mediante una inyección IV. El vehículo se inyectó una vez diaria durante cinco días, se detuvo durante dos días, y después se inyectó durante cinco días más.

- 15 Los grupos de ratas IM e IV recibieron una inyección IM e IV de NRG, respectivamente (la cantidad de NRG fue de 149,3 U/kg (proteína/peso corporal), el volumen fue de 0,4 ml/100 g). La NRG fue inyectada una vez diaria durante cinco días, se detuvo durante dos días, y después se inyectó durante otros cinco días.

- 20 Tal como se analiza más a fondo a continuación, el grupo IVGTT tiene bombas osmóticas (bomba osmótica 2ML1 ALZET) implantadas al quinto día después del agrupamiento. Cada bomba contiene 2 ml de disolución de NRG, que contiene 933,1 U de NRG (puesto que una rata pesa ahora aproximadamente 250 g), y la velocidad de infusión era de aproximadamente 18,7 U/kg/h. Así, la concentración máxima de fármaco comparada fue de aproximadamente 2,67 U/kg mediante inyección IV.

Después de 7 días, la función cardíaca de todas las ratas se volvió a comprobar mediante ecocardiografía (sonda Philips Sonos 7500 S4). Al día siguiente, también se realizaron comprobaciones de los parámetros hemodinámicos y comprobaciones anatómicas para confirmar aún más la función cardíaca de las ratas.

B.1. Transplante de la bomba osmótica en ratas (todas las etapas deben ser estériles)

- 25 Se inyectó 1 ml de agua estéril y 1 ml de disolución salina al 0,9% estéril en un vial de NRG (993,1 U, 62,5 µg) en la campana sucesivamente. La disolución de NRG se extrajo hacia una jeringa estéril. Se intercambió una aguja de punta roma por la jeringa y se eliminaron las burbujas de la jeringa. La bomba se mantuvo en posición vertical y la aguja se insertó a través de la abertura pequeña en la parte superior de la bomba en posición vertical hasta que ya no entraba más. Se empujó el émbolo lentamente para añadir la disolución de NRG a la bomba hasta que la disolución comenzó a desbordar la bomba. Se retiró la aguja y la bomba se limpió. Se retiró la tapa transparente del moderador de flujo para exponer un tubo de acero inoxidable corto. El tubo de acero después se insertó en un extremo de un tubo PET60 de 5 cm. La aguja de la jeringa se insertó en el otro extremo del tubo PE60. Se empujó el émbolo de la jeringa para añadir la disolución de NRG al moderador de flujo hasta que se llenó. Después el tubo largo del moderador de flujo se insertó en la bomba hasta que su pestaña blanca se unió a la bomba. La aguja se extrajo del moderador de flujo antes de empapar la bomba en disolución salina al 0,9% estéril a 37 °C durante la noche.

- 40 Las ratas se anestesiaron con quetamina (tal como se describió anteriormente). El área entre el cuello y el hombro de las ratas se depiló y se esterilizó. El cuerpo se cubrió con un trozo de tela húmeda estéril. Entonces se realizó una incisión cuidadosamente en la piel entre los omóplatos para localizar y separar la vena yugular externa. El extremo distal de la vena desde el corazón se ligó. Se realizó un pequeño orificio con unas tijeras oculares en la pared de la vena yugular externa y se agrandó con un microfórceps. El tubo PE60 conectado a la bomba osmótica se insertó 2 cm en la vena a través del orificio. Después el extremo proximal de la vena desde el corazón se unió con el tubo PE60 para fijar el tubo. El extremo distal de la vena que rodea el tubo PE60 fue atado fuertemente para fijar mejor el tubo. Empleando un hemostato, se formó un túnel mediante la separación roma de la piel de la incisión en el omóplato. Por último, se formó un bolsillo en la espalda de la rata en la región omoplatelar media extendiendo la piel. La bomba se deslizó a través del túnel hacia el bolsillo con el moderador de flujo apuntando hacia el lado contrario a la incisión. Después se cerró la incisión en la piel con una sutura. Las ratas se volvieron a colocar en la sala de animales después de ser revividas y se alimentaron como siempre.

C. Resultados experimentales

- 50 La función del corazón MI después de una infusión con NRG mediante IVGTT e IV se muestra en la siguiente tabla 1. En la tabla 1, "IVS", "LVEDD", "PW", "LVESD", "EF", "FS" y "CC" significan septo intraventricular, dimensión diastólica final del ventrículo izquierdo, espesor de la pared posterior, dimensión sistólica final del ventrículo izquierdo, fracción de eyección, acortamiento fraccional y ciclo cardíaco, respectivamente. En este caso, EF y FS reflejan la contractilidad del corazón, en especial para el ventrículo izquierdo.

55

EF = (volumen diastólico final - volumen sistólico final)/volumen diastólico final

FS = (dimensión diastólica final - dimensión sistólica final)/dimensión diastólica final

En la tabla 1, P < 0,01 es para LVEDD, LVEDS, EF y FS en el grupo IVGTT o IV, comparado con sus homólogos en el grupo con vehículo, lo cual indica una diferencia muy significativa.

5 Tabla 1 - Función cardíaca de ratas MI después de una infusión de NRG mediante IVGTT e IV

	IVS	LVEDD	PW	LVEDS	EF	FS	CC
	cm	cm	cm	cm	%	%	ms
Vehículo	0,168 ± 0,005	0,952 ± 0,082	0,173 ± 0,009	0,819 ± 0,107	34,3 ± 5,0	14,5 ± 2,4	162,5 ± 23,1
IVGTT	0,169 ± 0,007	0,857 ± 0,093	0,190 ± 0,013	0,644 ± 0,061	54,6 ± 5,4	25,2 ± 3,0	173,1 ± 22,5
IV	0,177 ± 0,027	0,912 ± 0,081	0,189 ± 0,013	0,759 ± 0,099	40,5 ± 8,9	17,5 ± 4,6	164,5 ± 18,2

10 La NRG infundida mediante una bomba osmótica aumentó drásticamente la función cardíaca de ratas MI, comparado con el grupo IV. En particular, el valor de EF, una medición de la eficacia de bombeo de sangre del corazón que puede utilizarse para calcular la función del ventrículo izquierdo, en el grupo IVGTT era 59,18% mayor que la del grupo con vehículo, y 34,81% mayor que el grupo IV. Además, el valor de FS, que también es una forma de medir la actuación del ventrículo izquierdo, del grupo IVGTT era 73,79% mayor que la del grupo con vehículo, y 44,0% mayor que el grupo IV. Estos resultados demuestran que la liberación extendida de NRG es más eficaz que la inyección IV convencional para mejorar la función cardíaca.

15 De forma sorprendente, la NRG infundida mediante una bomba osmótica no solo aumentó mucho la función cardíaca de ratas MI comparado con el grupo IV, sino que también redujo el diámetro interior del ventrículo izquierdo. De modo específico, la media de la dimensión diastólica final del ventrículo izquierdo (denominada en lo sucesivo "LVEDD") del grupo IVGTT era 9,98% menor que la del grupo con vehículo, y 6,03% menor que el grupo IV. Además, la dimensión sistólica final del ventrículo izquierdo (denominada en lo sucesivo "LVEDS") del grupo IVGTT era 21,37% menor que la del grupo con vehículo, y 15,15% menor que el grupo IV. Estos resultados demuestran que la administración constante de NRG puede reducir la masa y el volumen ventricular izquierdo, mejorando con ello la actuación y la salud ventricular izquierda.

Ejemplo 3: Función cardíaca de ratas con infarto de miocardio después de infundir neurregulina por vía intravenosa constantemente mediante una bomba de jeringa (Zhejiang University Medical Instrument Co. LTD; WZS 50-F2)

25 En este ejemplo se empleó una bomba de jeringa para la liberación extendida de neurregulina en pacientes humanos. La bomba de jeringa puede bombear la disolución continuamente a una velocidad concreta hacia la corriente sanguínea a través de una aguja inyectada en la vena de la cola de la rata. Para la bomba de jeringa, es fácil controlar la velocidad y el tiempo de infusión. La neurregulina se infundió por vía intravenosa mediante una bomba de jeringa a diferente velocidad durante diferentes tiempos diarios en ratas MI para mejorar el periodo de tiempo y la velocidad del tratamiento.

30 Ratitas MI en grupos se trataron mediante una inyección intravenosa de 4 ml/kg (volumen/peso corporal) de vehículo cada día durante 10 días (grupo A); o una inyección intravenosa de 10 µg/kg de neurregulina (2,5 µg/ml) cada día durante 10 días (grupo B); o una infusión con bomba de jeringa intravenosa de neurregulina (0,625 µg/ml) a 1,25 µg/kg/h con 4 horas diarias durante 10 días (grupo C); o una infusión con bomba de jeringa intravenosa de neurregulina (1,25 µg/ml) a 2,5 µg/kg/h con 4 horas por día durante 10 días (grupo D); o una infusión con bomba de jeringa intravenosa de neurregulina (0,625 µg/ml) a 0,625 µg/kg/h con 8 horas por día durante 10 días (grupo E); o una infusión con bomba de jeringa intravenosa de neurregulina (1,25 µg/ml) a 1,25 µg/kg/h con 8 horas por día durante 10 días (grupo F). Después se realizó una ecocardiografía en todos los grupos para estudiar la función del corazón.

40

Tabla 2 - Datos de ecocardiografía para ratas MI después de una infusión con bomba de jeringa intravenosa (ISPI) o inyección IV de NRG

	IVS	LVEDD	PW	LVESD	EF	FS	HR
	cm	cm	cm	cm	%	%	/min
A. vehículo	0,057 ± 0,003	0,947 ± 0,041	0,142 ± 0,013	0,811 ± 0,047	34,5 ± 3,3	14,4 ± 1,6	418 ± 51
B. IV	0,060 ± 0,005	0,924 ± 0,060	0,164 ± 0,016	0,770 ± 0,057	41,5 ± 2,6	17,8 ± 1,6	382 ± 52
C. ISPI 1,25 µg/kg/h 4 h/día	0,059 ± 0,005	0,935 ± 0,050	0,156 ± 0,013	0,779 ± 0,067	41,2 ± 5,7	17,7 ± 2,8	395 ± 30
D. ISPI 2,5 µg/kg/h 4 h/día	0,061 ± 0,004	0,943 ± 0,058	0,160 ± 0,015	0,762 ± 0,055	43,7 ± 5,4	19,0 ± 2,9	391 ± 41
E. ISPI 0,625 µg/kg/h 8 h/día	0,062 ± 0,006	0,941 ± 0,061	0,164 ± 0,011	0,742 ± 0,079	47,4 ± 8,6	2,1 ± 4,5	391 ± 48
F. ISPI 1,25 µg/kg/h 8 h/día	0,061 ± 0,004	0,966 ± 0,038	0,166 ± 0,019	0,766 ± 0,045	47,2 ± 4,2	20,8 ± 2,5	364 ± 33

5 P < 0,01 es para LVEDD, LVESD, EF y FS en cualquiera de los grupos ISPI o IV comparado con sus homólogos en el grupo con vehículo, lo cual indica una diferencia muy significativa. HR significa frecuencia cardíaca.

10 Tal como se muestra en la tabla 2, comparado con el grupo con vehículo, la neurregulina mediante IV (grupo B) potencia el valor de EF de ratas MI en 20,29%, la infusión con una bomba de jeringa intravenosa durante 4 h/día (grupo C, D) es tan eficaz como IV, mientras que la neurregulina mediante una infusión con una bomba de jeringa intravenosa durante 8 h/día (grupo E, F) potencia el valor de EF en aproximadamente 37,10%. Al mismo tiempo, comparado con el grupo con vehículo, la neurregulina mediante una inyección IV (grupo B) potencia el valor de FS de ratas MI en 23,61%, la infusión con una bomba de jeringa intravenosa durante 4 h/día (grupo C, D) fue tan eficaz como IV, mientras que la neurregulina mediante una infusión con una bomba de jeringa intravenosa durante 8 h/día (grupo E, F) potencia el valor de FS en aproximadamente 45,49%. De modo sorprendente, aunque las ratas MI en el grupo E solo recibieron la mitad de neurregulina que el grupo F, el valor de EF o FS es casi el mismo. Los resultados demuestran que después de que la neurregulina haya sido infundida por vía intravenosa de modo continuo mediante una bomba de jeringa durante 8 o más horas por día, esta puede potenciar la función cardíaca.

Ejemplo 4: Función cardíaca de ratas MI después de una infusión hipodérmica extendida de NRG mediante una bomba osmótica

20 Se realizó la ligadura de la arteria coronaria del ventrículo izquierdo y un trasplante de bomba osmótica en ratas de la misma forma que en el ejemplo 2, excepto que la cantidad de NRG inyectada en la bomba fue de 1791,3 U (125 µg), y la bomba se introdujo en un tubo conectado con la vena para que la infusión de NRG fuera hipodérmica. La velocidad de infusión fue de 37,33 U/kg/h.

La infusión de IV comenzó en el mismo momento que la infusión hipodérmica extendida, de modo que el grupo IV fue tratado con NRG durante 7 días. La cantidad de NRG para el grupo IV también cambió a 223,95 U/kg.

25 La función del corazón MI después de una infusión con NRG hipodérmica extendida e IV se muestra en la tabla 3. En la tabla 3, P < 0,01 es para LVEDD, LVESD, EF y FS en el grupo IVGTT e IV, comparado con sus homólogos en el grupo con vehículo, lo cual indica una diferencia muy significativa.

Tabla 3 - Función cardíaca de ratas MI después de una infusión hipodérmica extendida (EHI) e IV de NRG

	IVS	LVEDD	PW	LVESD	EF	FS	CC
	cm	cm	cm	cm	%	%	ms
Vehículo	0,174 ± 0,005	1,02 ± 0,077	0,185 ± 0,012	0,876 ± 0,098	33,9 ± 7,9	14,3 ± 3,8	153 ± 19
EHI	0,177 ± 0,006	0,908 ± 0,079	0,209 ± 0,023	0,712 ± 0,091	48,4 ± 9,3	21,7 ± 5,1	153 ± 11
IV	0,171 ± 0,007	1,013 ± 0,111	0,188 ± 0,010	0,874 ± 0,124	33,9 ± 6,8	14,3 ± 3,3	157 ± 15

5 La tabla 3 demuestra que la infusión hipodérmica extendida de NRG aumenta significativamente la función cardíaca de ratas MI comparado con los grupos con vehículo e IV. Comparado con el grupo con vehículo, la infusión hipodérmica extendida de NRG potencia el valor de EF de los corazones MI en 42,77%, y el valor de FS en 51,75%. Tal como se analizó anteriormente, los valores de EF y FS son formas de medir la eficacia de bombeo de la sangre del corazón y pueden utilizarse para calcular la función del ventrículo izquierdo. Así, estos resultados demuestran que la liberación extendida de NRG es mucho más eficaz que una inyección IV convencional para mejorar la función cardíaca.

10 Una infusión hipodérmica extendida de NRG también reduce el diámetro interior del ventrículo izquierdo. De modo específico, la LVEDD de corazones MI disminuye en 10,98%, y la LVESD disminuye en 18,72%, comparado con el grupo con vehículo. La inyección IV de NERG en este experimento no produjo un efecto obvio sobre la función cardíaca del corazón MI comparado con el vehículo. Los resultados demuestran que la infusión hipodérmica extendida de NRG puede reducir la masa y el volumen ventricular izquierdo, mejorando con ello la actuación y la salud ventricular izquierda, lo cual sugiere que también puede emplearse como tratamiento para la insuficiencia cardíaca.

Ejemplo 5: Función cardíaca de ratas con infarto de miocardio después de infundir neurregulina de modo hipodérmico constantemente mediante una bomba de jeringa

20 La neurregulina fue infundida con una bomba de jeringa a diferentes velocidades y durante diferentes tiempos por día en ratas MI.

25 Los grupos de ratas MI fueron tratados con una inyección intravenosa de 4 ml/kg (volumen/peso corporal) de vehículo cada día durante 10 días (grupo A); o una inyección intravenosa de 10 µg/kg de neurregulina (2,5 µg/ml) cada día durante 10 días (grupo B); o una inyección hipodérmica (HI) de 10 µg/kg de neurregulina (2,5 µg/ml) cada día durante 10 días (grupo C); o una infusión con una bomba de jeringa hipodérmica de neurregulina (1,25 µg/ml) a 2,5 µg/kg/h durante 4 horas por día durante 10 días (grupo D); o una infusión con una bomba de jeringa hipodérmica de neurregulina (1,11 µg/ml) a 1,67 µg/kg/h durante 6 horas por día durante 10 días (grupo E); o una infusión con una bomba de jeringa hipodérmica de neurregulina (1,25 µg/ml) a 1,25 µg/kg/h durante 8 horas por día durante 10 días (grupo F). Después se realizó una ecocardiografía a todos los grupos para estudiar la función del corazón.

30 Tabla 4 - Datos de ecocardiografía para ratas MI después de una infusión con una bomba de jeringa hipodérmica (HSPI) o una inyección IV de NRG

	IVS	LVEDD	PW	LVESD	EF	FS	HR
	cm	cm	cm	cm	%	%	/min
A. vehículo	0,060 ± 0,007	0,906 ± 0,107	0,151 ± 0,027	0,757 ± 0,130	39,3 ± 10,8	16,9 ± 6,1	388 ± 33
B. IV	0,063 ± 0,004	0,812 ± 0,045	0,159 ± 0,010	0,726 ± 0,047	43,4 ± 2,8	18,8 ± 1,4	385 ± 33
C. HI	0,063 ± 0,003	0,909 ± 0,054	0,163 ± 0,011	0,744 ± 0,048	42,1 ± 3,7	18,1 ± 1,9	390 ± 40
D. HSPI 2,5 µg/kg/h 4 h/día	0,065 ± 0,007	0,933 ± 0,055	0,160 ± 0,016	0,754 ± 0,069	44,2 ± 6,5	19,3 ± 3,4	385 ± 32
E. HSPI 1,67 µg/kg/h 6 h/día	0,067 ± 0,003	0,880 ± 0,073	0,168 ± 0,019	0,693 ± 0,076	48,3 ± 6,0	21,4 ± 3,5	404 ± 38
F. HSPI 1,25 µg/kg/h 8 h/día	0,066 ± 0,005	0,899 ± 0,056	0,168 ± 0,014	0,709 ± 0,098	47,2 ± 11,8	21,3 ± 8,2	377 ± 44

$P < 0,01$ es para LVEDD, LVESD, EF y FS en cualquiera de los grupos HSPI, HI o IV comparado con sus homólogos en el grupo con vehículo, lo cual indica una diferencia muy significativa. HR significa frecuencia cardíaca.

Tal como se muestra en la tabla 4, comparado con el grupo con vehículo, la neurregulina mediante IV (grupo B) potencia el valor de EF de ratas MI en 10,43%, la neurregulina mediante una inyección hipodérmica (grupo C) potencia el valor de EF de ratas MI en 7,12%, mientras que la neurregulina mediante una infusión con una bomba de jeringa hipodérmica durante 4 h/día (grupo D) potencia el valor de EF en 12,47%, la neurregulina mediante una infusión con una bomba de jeringa hipodérmica durante 6 h/día (grupo E) hace que el valor de EF aumente hasta 22,90%, la neurregulina mediante una infusión con una bomba de jeringa hipodérmica durante 8 h/día (grupo E) también aumenta el valor de EF en 20,10%. Al mismo tiempo, comparado con el grupo con vehículo, la neurregulina mediante IV (grupo B) potencia el valor de FS de ratas MI en 11,24%, la neurregulina mediante una inyección hipodérmica (grupo C) potencia el valor de FS de ratas MI en 7,10%, mientras que la neurregulina mediante una infusión con una bomba de jeringa hipodérmica durante 4 h/día (grupo D) potencia el valor de FS en 14,20%, la neurregulina mediante una infusión con una bomba de jeringa hipodérmica durante 6 h/día (grupo E) hace que el valor de FS aumente hasta 26,63%, la neurregulina mediante una infusión con una bomba de jeringa hipodérmica durante 8 h/día (grupo E) también aumenta el valor de FS en 26,04%. Los resultados demuestran que, después de infundir neurregulina de modo hipodérmico continuamente con una bomba de jeringa durante 6 o más horas por día, se puede aumentar la función cardíaca drásticamente.

Ejemplo 6: Acoplamiento de PEG a NRG y actividad de NRG acoplada a PEG

A. Acoplamiento de PEG y aislamiento de NRG acoplada a PEG

Se añadió PEG (mPEG-SPA-5000, NEKTAR) a 10 ml de PGS 20 mM (pH 8,0) que contenía NRG 1 mg/ml (PEG:NRG = 1:1, proporción molar) y se mezcló con rapidez, y la mezcla se agitó suavemente a temperatura ambiente durante 30 min, y después se añadió una cierta cantidad de ácido acético glacial para detener la reacción de acoplamiento. La mezcla después se cargó sobre una columna de filtración en gel (S100, Pharmacia) para separar los componentes. Cada fracción pico se recogió y se preparó una muestra para una SDS-PAGE. Después de la electroforesis, el gel se teñó con BaI_2 y azul brillante de Coomassie secuencialmente para detectar PEG y NRG por separado.

Tal como se muestra en la figura 2 para el gel teñido con BaI_2 , la mezcla contiene monómero de PEG, NRG-monoPEG, NRG-diPEG y NRG-poliPEG. Después la mezcla se cargó sobre una columna de filtración en gel S100, los componentes se separaron en NRG-poliPEG y NRG-diPEG (pico 1), NRG-monoPEG y PEG (pico 2).

El gel teñido con azul de Coomassie en la figura 3 también confirmó que el pico 1 y el pico 2 contienen NRG que está acoplada a PEG, mientras que el pico 3 solo contiene NRG.

B. Medición de la actividad de NRG acoplada a PEG

Se recolectaron células MCF-7, se contaron, se sedimentaron y se resuspendieron en DMEM (con suero al 10% e insulina 9 μ g/ml) a 5×10^4 células/ml. Se añadieron 100 μ l de una suspensión de células a cada pocillo de una placa de 96 pocillos, y la placa se incubó a 37 °C durante la noche. Las células después se lavaron 3 veces con PBS y se cultivaron en DMEM sin suero durante 24 horas más.

El anticuerpo de ErbB2 H4 (Zensun, anticuerpo monoclonal anti-ErbB2) se diluyó hasta 6 μ g/ml con tampón de revestimiento (Na_2CO_3 - $NaHCO_3$ 50 mM, pH 9,6), y se añadió a 50 μ l/pocillo a una placa de 96 pocillos. La placa se dejó a 4 °C durante la noche para que se revistiera con el anticuerpo.

El DMEM se aspiró de las células MCF-7 en ayunas, y se añadieron 100 μ l de diluciones en serie de NRG, NRG-monoPEG o NRG-diPEG en DMEM a cada pocillo por separado. Se añadió DMEM a dos pocillos como blanco. La placa se incubó a 37 °C durante 20 min. Las células se lavaron una vez con PBS antes de añadir 100 μ l/pocillo de tampón de lisis (Hepes 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, ortovanadato de sodio 2 mM, timerosal al 0,01%, Triton X-100 al 1% y un comprimido de cóctel de inhibidor de proteasas por 25 ml de disolución) y se lisó a 4 °C durante 30 min. La placa después se agitó suavemente para lisar completamente y retirar las células de la placa y se centrifugó a 15000 rpm durante 15 min.

La placa con el anticuerpo de revestimiento se lavó cinco veces con tampón de lavado (PBS 10 mM, pH 7,4, Tween 20 al 0,05%) antes de añadir 200 μ l/pocillo de leche desnatada al 5% en tampón de lavado. La placa se incubó a 37 °C durante 2 horas antes de volver a lavar 3 veces con tampón de lavado.

Se extrajeron 90 μ l de disolución de las células lisadas de cada pocillo en la placa de cultivo y se trasladaron al correspondiente pocillo en una placa revestida. Después de una incubación a 37 °C durante 1 hora, la placa revestida con la lisis celular se lavó de nuevo 5 veces con tampón de lavado y se trató con 100 μ l de una concentración adecuada de anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) (Santa Cruz Biotechnology) a 37 °C durante 1 hora. Después la placa se volvió a lavar 5 veces con tampón de lavado, se añadieron 100 μ l de disolución de sustrato de HRP recién preparada (ácido cítrico 50 mM, Na_2PO_4 100

mM, pH 5,0, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) 0,2 mg/ml, H₂O₂ al 0,003%) a cada pocillo antes de incubar la placa a 37 °C durante 10 min. Por último, se añadieron 50 µl de H₂SO₄ 2 N a cada pocillo para destruir la actividad HRP. El valor de DO a 450 nm para cada pocillo se leyó en un lector de microplacas (BIO-RAD, modelo 550), y la EC₅₀ es la concentración de NRG que logra 50% del valor máximo de DO. Cuanto menor sea EC₅₀, mayor será la actividad.

5 La EC₅₀ de NRG, NRG-monoPEG y NRG-diPEG se muestra en la tabla 5.

Tabla 5: EC₅₀ de NRG, NRG-monoPEG y NRG-diPEG

muestra	EC ₅₀ (µg/ml)
NRG	0,070
NRG-monoPEG	0,070
NRG-diPEG	0,098

10 A partir de la tabla 5 se puede observar claramente que la EC₅₀ de NRG-monoPEG es la misma que la de NRG, mientras que la EC₅₀ de NRG-diPEG es 40% mayor. Esto significa que NRG-monoPEG tiene la misma actividad que NRG *in vitro*, pero la actividad de NRG-diPEG es 40% menor.

Ejemplo 7: La liberación extendida de neuregulina reduce los efectos secundarios de la administración de neuregulina

15 Este ejemplo demuestra que, cuando se compara con la administración durante largo tiempo o a una dosis alta, la liberación extendida de neuregulina puede reducir los efectos secundarios, tales como el trastorno gastrointestinal o la efusión pericárdica, asociados con la administración de neuregulina.

20 Se administró NRG-1β por vía intravenosa mediante una bomba de jeringa a dos grupos de monos, cada uno con 24 monos rhesus sanos (12 machos y 12 hembras, con un peso de aproximadamente 5-7 kg). El grupo I fue infundido con NRG-1β durante 12 horas diarias durante 14 días, a una velocidad de 1 µg/kg/hr. No se observaron efectos secundarios en este grupo. El grupo II fue infundido durante 24 horas diarias durante 14 días, a una velocidad de 1 µg/kg/hr. En el grupo II se observaron aproximadamente 3-5 ml de efusión pericárdica en el corazón de los monos.

25 Se administró a dos grupos de individuos sanos la misma cantidad de NRG-1β diaria durante 10 días. Ocho individuos del grupo I fueron infundidos con NRG-1β durante cuatro horas diarias durante diez días a una velocidad de 0,3 µg/kg/hr. En este grupo, cada individuo experimentó un trastorno gastrointestinal con una media de aproximadamente dos veces durante el periodo de 10 días. Seis individuos fueron infundidos con NRG-1β durante dos horas diarias durante 10 días a una velocidad de 0,6 µg/kg/hr. En el grupo II, cada individuo experimentó un trastorno gastrointestinal con una media de aproximadamente cinco veces durante el periodo de 10 días.

30 Estos resultados demuestran que la liberación extendida de neuregulina puede reducir los efectos secundarios adversos asociados con la administración de neuregulina durante largo tiempo o a una dosis alta. Estos resultados sugieren que una infusión intravenosa o hipodérmica durante un tiempo más corto o a una dosificación menor diaria puede reducir los efectos secundarios de una infusión de neuregulina de 24 horas.

Ejemplo 8: Expresión génica tras la liberación extendida de NRG en el ventrículo izquierdo de ratas con infarto de miocardio

35 En este ejemplo, ratas con infarto de miocardio fueron infundidas con NRG-1β y se analizó el patrón de expresión génica en el ventrículo izquierdo de estas ratas mediante micromatrices. Comparado con ratas con infarto de miocardio infundidas con vehículo, las ratas infundidas con NRG tienen diferentes patrones de expresión génica. Después de la liberación extendida de NRG, el nivel de ARNm de la proteína similar a beta-timosina aumentó 3,10 veces; el nivel de ARNm de beta-defensina 1 aumentó 2,87 veces; el nivel de ARNm de proteína asociada al crecimiento aumentó 2,16 veces; el nivel de ARNm de beta-timosina 4, gamma-laminina 1, miocardina, y subunidad reguladora gamma-P13K casi se dobló, mientras que el nivel de ARNm de elastina y gamma-P13K fue casi el mismo que antes. Esto demuestra que la neuregulina cambia el nivel de expresión de diversas proteínas en el corazón.

40

Listado de secuencias

- <110> Zensun (Shanghai) Science and Technology Inc.
Zhou, Mingdong
- 5 <120> LIBERACIÓN EXTENDIDA DE NEURREGULINA PARA UNA MEJOR FUNCIÓN CARDÍACA
<130> 11748-009-228
- 10 <140> Por asignar
<141> 29-12-2009

<150> documento US 60/755.124
<151> 30-12-2005
- 15 <150> documento US 60/758.626
<151> 13-01-2006

<160> 2
- 20 <170> FastSEQ para Windows versión 4.0

<210> 1
<211> 61
<212> PRT
- 25 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 1 5 10 15
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr
 35 40 45
 Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr Gln
 50 55 60

- 30 <210> 2
<211> 183
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
- 35 <400> 2

agccatcttg taaatgtgc ggagaaggag aaaacttct gtgtgaatgg aggggagtgc 60
 ttcattggtga aagaccttc aaaccctcg agatacttgt gcaagtgcc aaatgagttt 120
 actggtgatc gctgccaaaa ctacgtaatg gcgagcttct acaaggcgga ggagctgtac 180
 cag 183

REIVINDICACIONES

- 5 1.- La neurregulina 1, o uno de sus fragmentos funcionales que comprende un dominio similar al factor del crecimiento epidérmico de la neurregulina 1, para su uso en un método para prevenir, tratar o retrasar la insuficiencia cardíaca en un mamífero, comprendiendo dicho método la liberación de neurregulina 1 en el mamífero mediante un medio de liberación extendida a lo largo de un periodo de tiempo de entre 4 horas y 12 horas diarias, en el que el medio de liberación extendida comprende una bomba osmótica o una bomba de jeringa.
- 2.- La neurregulina 1, o uno de sus fragmentos, para el uso de la reivindicación 1, en el que dicha neurregulina 1 se libera a una dosis de aproximadamente 1 U/kg a 5000 U/kg de peso corporal, o de 10 U/kg a 1000 U/kg de peso corporal del mamífero.
- 10 3.- La neurregulina 1, o uno de sus fragmentos, para el uso de la reivindicación 1, en el que dicha neurregulina 1 se libera a una dosis de aproximadamente 1 U/día a 10.000 U/día.
- 4.- La neurregulina 1, o uno de sus fragmentos, para el uso de la reivindicación 1, en el que dicha neurregulina 1 se libera a una dosis de aproximadamente 0,001 mg/día a 1000 mg/día.
- 15 5.- La neurregulina 1, o uno de sus fragmentos, para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho fragmento de neurregulina 1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1.
- 6.- La neurregulina 1, o uno de sus fragmentos, para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el mamífero es un ser humano.

FIG. 1

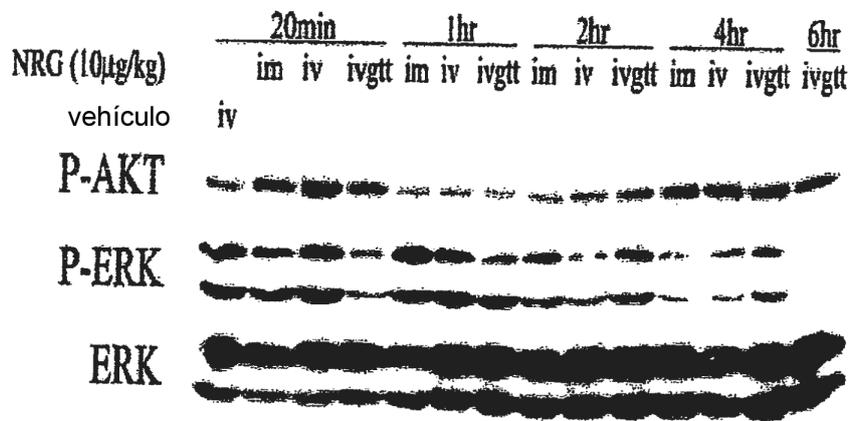


FIG. 2

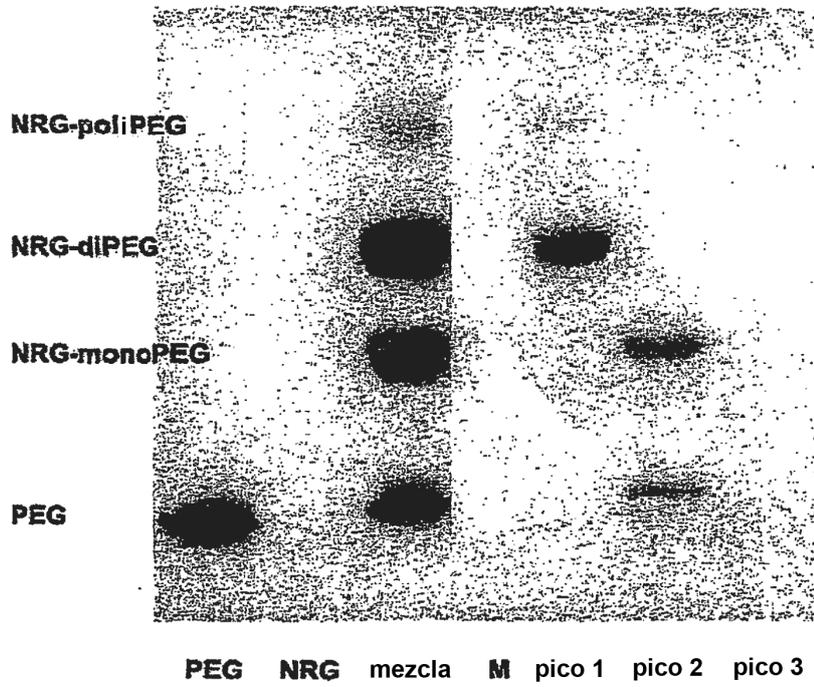


FIG. 3

