

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 125**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 9/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2010 E 10785654 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2440236**

54 Título: **Métodos basados en Neuregulina para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca**

30 Prioridad:

09.06.2009 CN 200910057390
25.08.2009 US 236849 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.06.2016

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 2 575 125 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

Métodos basados en Neuregulina para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere a métodos para prevenir, tratar o retrasar la insuficiencia cardíaca en un mamífero utilizando la proteína neuregulina. En particular, la presente invención proporciona el intervalo de administración de la proteína neuregulina para prevenir, tratar o retrasar la insuficiencia cardíaca en el mamífero.

Antecedentes de la invención

- 10 La insuficiencia cardíaca afecta aproximadamente a cinco millones de estadounidenses, y más de 550.000 nuevos pacientes son diagnosticados con la enfermedad cada año. El tratamiento farmacológico actual para la insuficiencia cardíaca está dirigido principalmente a los inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ECA), que son vasodilatadores que hacen que los vasos sanguíneos se expandan, disminuyendo la presión arterial y reduciendo la carga de trabajo del corazón. Mientras que el porcentaje de reducción de la mortalidad ha sido significativo, la reducción real de la mortalidad con inhibidores de la ECA tiene un promedio de sólo el 3% al 4%, y hay varios efectos secundarios potenciales. Otras limitaciones están asociadas a otras opciones para la prevención o el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. Por ejemplo, el trasplante de corazón es claramente más costoso e invasivo que el tratamiento farmacológico, y está limitado además por la disponibilidad de corazones de donantes. El uso de dispositivos mecánicos, tales como los marcapasos biventriculares, es igualmente invasivo y costoso. Por lo tanto, ha habido necesidad de nuevos tratamientos dadas las deficiencias de los tratamientos actuales.

- 20 Una nueva terapia prometedora conlleva la administración de neuregulina (en lo sucesivo denominada "NRG") a un paciente que padece o está en situación de riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca. Las NRG, una familia de factores de crecimiento similares a EGF, comprende una familia de factores de crecimiento y diferenciación relacionados estructuralmente que incluyen NRG1, NRG2, NRG3 y NRG4 y sus isoformas, están involucrados en una variedad de respuestas biológicas: la estimulación de la diferenciación de células de cáncer de mama y la secreción de proteínas de la leche; la inducción de la diferenciación de células de la cresta neural a las células de Schwann; la estimulación de la síntesis de células de músculo esquelético de los receptores de acetilcolina; y, la estimulación de la supervivencia celular miocárdica y la síntesis de ADN. Los estudios *in vivo* de embriones de ratones homocigóticos dirigidos al gen neuregulina con graves defectos en la formación de trabéculas ventriculares y el desarrollo de los ganglios de la raíz dorsal indican que la neuregulina es esencial para el corazón y el desarrollo neuronal.

- 30 Las NRG se unen a la familia de receptores de EGF, que comprende EGFR, ErbB2, ErbB3 y ErbB4, cada uno de los cuales desempeña una función importante en varias funciones celulares, incluidas el crecimiento celular, la diferenciación y la supervivencia. Son receptores de la proteína tirosina cinasa, consistentes en un dominio extracelular de unión a ligando, dominio transmembrana de cinasa y el dominio citoplásmico de tirosina cinasa. Una vez la NRG se unen al dominio extracelular de ErbB3 o ErbB4, provoca un cambio de configuración que conduce a la formación de heterodímero entre ErbB3, ErbB4 y ErbB2 o la formación de homodímero entre el propio ErbB4, lo que da como resultado la fosforilación de dominio C-terminal del receptor dentro de la membrana celular. El dominio intracelular fosforilado se une entonces a proteínas señal adicionales dentro de la célula, activando la vía de señalización de AKT o ERK aguas abajo correspondiente, y provocando una serie de reacciones celulares, tales como la estimulación o la depresión de la proliferación celular, la diferenciación celular, la apoptosis celular, la migración celular o la adhesión celular. Entre estos receptores, principalmente ErbB2 y ErbB4 se expresan en el corazón.

- 45 Se ha demostrado que los dominios similares a EGF de NRG-1, que oscilan en tamaño desde 50 a 64 aminoácidos, son suficientes para unirse a estos receptores y activarlos. Estudios anteriores han demostrado que la neuregulina-1 β (NRG-1 β) se puede unir directamente a ErbB3 y ErbB4 con gran afinidad. El receptor huérfano, ErbB2, puede formar heterodímeros con ErbB3 y ErbB4 con mayor afinidad que con homodímeros de ErbB3 o ErbB4. La investigación en desarrollo neural ha indicado que la formación del sistema nervioso simpático requiere un sistema de señalización intacto de NRG-1 β , ErbB2 y ErbB3. La destrucción dirigida de la NRG-1 β , ErbB2 o ErbB4 condujo a la letalidad embrionaria debido a defectos de desarrollo cardíaco. Estudios recientes también destacaron las funciones de NRG-1 β , ErbB2 y ErbB4 en el desarrollo cardiovascular, así como en el mantenimiento de la función normal del corazón adulto. Se ha demostrado que NRG-1 β mejora la organización del sarcómero en los cardiomiocitos adultos. La administración de un dominio similar a EGF de NRG-1 β recombinada mejora significativamente o protege contra el deterioro en el rendimiento de miocardio en modelos animales distintos de insuficiencia cardíaca. Más importante aún, NRG-1 β prolonga significativamente la supervivencia de animales con insuficiencia cardíaca. Estos efectos hacen a NRG-1 β prometedora como compuesto terapéutico o principal de amplio espectro para la insuficiencia cardíaca debido a una serie de enfermedades comunes. Sin embargo, todavía hay necesidad de más información acerca de la tolerancia y la dosis eficaz de NRG, que puede utilizarse en un entorno clínico para la prevención, tratamiento o retraso de la insuficiencia cardíaca.

Compendio de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento de que NRG mejora la diferenciación de las células de músculo cardíaco y la organización de la estructura sarcomérica y del citoesqueleto, así como la adhesión celular. La presente invención también se basa en el descubrimiento de que NRG mejora significativamente o protege contra el deterioro en el rendimiento del miocardio en distintos modelos animales de insuficiencia cardíaca y prolonga la supervivencia de los animales con insuficiencia cardíaca. La neuregulina, el polipéptido de neuregulina, los derivados de neuregulina o los compuestos que imitan las actividades de las neuregulinas, caen dentro del alcance de los métodos de la presente invención.

En un primer aspecto de la invención, se proporciona el intervalo de tolerancia de administración de la proteína NRG cuando se usa en mamíferos (p. ej., personas). Dicho intervalo de tolerancia de administración quiere decir la mayor cantidad de NRG que se puede administrar al mamífero (p. ej., personas) sin daño. En una realización, el intervalo de tolerancia de administración no excedía de 2,4 µg/kg/día, p. ej., 2,4 µg/kg/día, 1,2 µg/kg/día, 0,6 µg/kg/día o 0,3 µg/kg/día. En una realización, el intervalo de tolerancia de administración no excedía de 48 U/kg/día, p. ej., 48 U/kg/día, 24 U/kg/día, 12 U/kg/día o 6 U/kg/día. En otra realización, el intervalo de tolerancia de administración no excedía de 0,34 nmol/kg/día, p. ej., 0,34 nmol/kg/día, 0,17 nmol/kg/día, 0,08 nmol/kg/día o 0,04 nmol/kg/día.

En un segundo aspecto de la invención, se proporciona el intervalo de administración eficaz de proteína NRG para prevenir, tratar o retrasar la insuficiencia cardíaca en mamíferos (p. ej., personas). Dicho intervalo de administración eficaz significa la cantidad de NRG que produzca uno o más efectos beneficiosos cuando se administra al mamífero (p. ej., a una persona). Los efectos beneficiosos podrían ser la mejora de la función cardíaca de los pacientes con insuficiencia cardíaca, o la prevención del deterioro de la función cardíaca de los pacientes con insuficiencia cardíaca, o el retraso del deterioro de la función cardíaca de los pacientes con insuficiencia cardíaca. En una realización, el intervalo de administración eficaz es de 0,3 a 2,4 µg/kg/día, p. ej., 2,4 µg/kg/día, 1,2 µg/kg/día, 0,6 µg/kg/día o 0,3 µg/kg/día. En una realización, el intervalo de administración eficaz es 6-48 U/kg/día, p. ej., 48 U/kg/día, 24 U/kg/día, 12 U/kg/día o 6 U/kg/día. En otra realización, el intervalo de administración eficaz es 0,04-0,34 nmol/kg/día, p. ej., 0,34 nmol/kg/día, 0,17 nmol/kg/día, 0,08 nmol/kg/día o 0,04 nmol/kg/día.

En un tercer aspecto de la invención, se proporciona NRG para su uso en un método para prevenir, tratar o retrasar la insuficiencia cardíaca en mamíferos (p. ej., personas), comprendiendo el método la administración de una proteína NRG dentro del intervalo de tolerancia de administración en el mamífero (p. ej., en una persona) que lo necesita. En una realización, la proteína NRG dentro del intervalo de tolerancia de administración se administra una vez al día. En otra realización, la proteína NRG dentro del intervalo de tolerancia de administración se administra varias veces al día. En una realización, la proteína NRG dentro del intervalo de tolerancia de administración se administra durante un día. En otra realización, la proteína NRG dentro del intervalo de tolerancia de administración se administra durante varios días.

En un cuarto aspecto de la invención, se proporciona NRG para su uso en un método para prevenir, tratar o retrasar la insuficiencia cardíaca en mamíferos (p. ej., en personas), comprendiendo el método la administración de una proteína NRG dentro del intervalo de administración eficaz en el mamífero (p. ej., en una persona) que lo necesite. En una realización, la proteína NRG dentro del intervalo de administración eficaz se administra una vez al día. En otra realización, la proteína NRG dentro del intervalo de administración eficaz se administra varias veces al día. En una realización, la proteína NRG dentro del intervalo de administración eficaz se administran durante un día. En otra realización, la proteína NRG dentro del intervalo de administración eficaz se administra durante varios días.

En un quinto aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica para prevenir, tratar o retrasar la insuficiencia cardíaca, la composición comprende la proteína NRG con la cantidad dentro del intervalo de tolerancia de administración.

En un sexto aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica para prevenir, tratar o retrasar la insuficiencia cardíaca, la composición comprende la proteína NRG con la cantidad dentro del intervalo de administración eficaz.

En un séptimo aspecto de la invención, se proporciona un kit para prevenir, tratar o retrasar la insuficiencia cardíaca, el kit comprende una o varias dosis de la composición farmacéutica susodicha para prevenir, tratar o retrasar la insuficiencia cardíaca.

Descripción detallada de la invención

Aunque en la práctica de la presente invención pueden utilizarse cualesquiera de los métodos similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, se describen ahora los métodos y materiales preferidos.

La presente invención proporciona métodos para prevenir, tratar o retrasar la insuficiencia cardíaca en mamíferos (p. ej., en personas) que los necesitan usando una proteína NRG dentro del intervalo de administración de tolerancia y/o eficaz. Preferiblemente, los mamíferos (p. ej., las personas) son personas o pacientes que padecen o están en situación de riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca.

A. Definiciones

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos empleados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende generalmente cualquier experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

- 5 Tal como se emplea en el presente documento, las formas singulares "un", "una", y "el", "la" significa "al menos uno" o "uno o más" a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Tal como se emplea en la presente memoria, "neuregulina" o "NRG" empleada en la presente invención se refiere a proteínas o péptidos que pueden unirse y activar ErbB2, ErbB3, ErbB4 o una de sus combinaciones, incluidas, pero sin limitarse a todas las isoformas de neuregulina, dominio EGF de neuregulina solo, polipéptidos que comprenden el dominio similar a EGF de neuregulina, mutantes o derivados de neuregulina, y cualquier tipo de productos génicos similares a neuregulina que también activan los receptores anteriores como los descritos con detalle a continuación. La neuregulina también incluye proteínas, péptidos, fragmentos de NRG-1, NRG-2, NRG-3 y NRG-4 y compuestos que imitan las actividades de la neuregulina. La neuregulina utilizada en la presente invención puede activar los receptores de ErbB anteriores y modular sus reacciones biológicas, p. ej., estimular la síntesis del receptor de acetilcolina en células de músculo esquelético; y/o mejorar la diferenciación de los cardiocitos, la supervivencia y la síntesis de ADN. La neuregulina también incluye las variantes con sustituciones conservadoras de aminoácidos que no alteran sustancialmente su actividad biológica. Las sustituciones conservadoras adecuadas de aminoácidos son conocidas por los expertos en esta técnica y pueden realizarse generalmente sin alterar la actividad biológica de la molécula resultante. Los expertos en esta técnica reconocen que, en general, cada una de las sustituciones de aminoácidos en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (véase, p. ej., Watson *et al.*, *Molecular Biology of the Gene*, 4ª Edición, 1987 The Bejacmin/Cummings Pub. co., pág. 224). En realizaciones preferidas, la neuregulina utilizada en la presente invención se une y activa los heterodímeros ErbB2/ErbB4 o ErbB2/ErbB3, por ejemplo, pero no con el propósito de restricción, incluyendo los péptidos los restos 177-237 de la isoforma β2 de NRG-1 que contienen la secuencia de aminoácidos: SHLVKCAEKEKTFVNGGECFMVKDLSNPSRYLC KCPNEFTGDRCQNYVMASFYKAEELYQ (SEQ. ID. n°: 1).

La neuregulina puede administrarse por cualquier vía según el criterio de los expertos en la técnica, incluidas, pero no limitadas a vía oral, por inhalación, parenteral (p. ej., intravenosa, intramuscular, subcutánea o intradérmica). En determinadas realizaciones, la neuregulina se administra por vía oral. En determinadas realizaciones, la neuregulina se administra por vía intravenosa. En determinadas realizaciones, la neuregulina se administra por vía subcutánea. En realizaciones preferidas, la neuregulina se libera un periodo prolongado al mamífero por vía intravenosa o subcutánea.

La liberación prolongada de neuregulina proporciona nivel terapéutico continuo de neuregulina durante un periodo. En algunas realizaciones, se libera neuregulina durante 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. En algunas realizaciones, se libera neuregulina durante 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. En otras realizaciones, se libera neuregulina durante un periodo de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas o más. En otras realizaciones, se libera neuregulina durante un periodo de 1 mes, 2 meses, 4 meses, 8 meses, 12 meses o más. En otras realizaciones, se libera neuregulina durante un periodo de 1 año, 2 años, 3 años, 4 años o más. En otras realizaciones, se libera neuregulina 4 horas cada día durante 3 días consecutivos, 4 horas cada día durante 5 días consecutivos, 4 horas cada día durante 7 días consecutivos, 4 horas cada día durante 10 días consecutivos, 6 horas cada día durante 3 días consecutivos, 6 horas cada día durante 5 días consecutivos, 6 horas cada día durante 7 días consecutivos, 6 horas cada día durante 10 días consecutivos, 8 horas cada día durante de 3 días consecutivos, 8 horas cada día durante 5 días consecutivos, 8 horas cada día durante 7 días consecutivos, 8 horas cada día durante 10 días consecutivos.

Como se emplea en la presente memoria, "dominio similar al factor de crecimiento epidérmico" o "dominio similar a EGF" se refiere a un motivo de polipéptido codificado por el gen de neuregulina que se une a ErbB2, ErbB3, ErbB4, o combinaciones de los mismos, y los activa y lleva una similitud estructural con el dominio de fijación al receptor de EGF como se describe en el documento WO 00/64400, Holmes y otros, *Science*, 256:1205-1210 (1992); patentes de EE.UU. n° 5.530.109 y n° 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 documento WO 97/09425, cuyos contenidos están todos incorporados en la presente memoria por referencia. En determinadas realizaciones, el dominio similar a EGF se une a los heterodímeros ErbB2/ErbB4 o ErbB2/ErbB3 y los activa. En determinadas 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 correspondiente a los residuos de aminoácidos 177-226, 177-237 o 177-240 de NRG-1. En determinadas realizaciones, el dominio similar a EGF comprende la secuencia de aminoácidos del dominio de unión al receptor de NRG-2. En determinadas realizaciones, el dominio similar a EGF comprende la secuencia de aminoácidos del dominio de unión al receptor de NRG-3. En determinadas realizaciones, el dominio similar a EGF comprende la secuencia de aminoácidos del dominio de unión al receptor de NRG-4. En determinadas realizaciones, el dominio similar a EGF comprende 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 (SEQ. ID. n°: 2), como se describe en la patente de EE.UU. n° 5.834.229.

Como se emplea en la presente memoria, "dosis de tolerancia" se refiere a la mayor cantidad de NRG que puede administrarse en un mamífero sin daño. En determinadas realizaciones, el daño puede determinarse por la incidencia y gravedad de casos clínicos adversos, anomalías de los signos vitales, incluidas la presión arterial, la frecuencia cardíaca, la respiración y la temperatura corporal, nuevos cambios electrocardiográficos y anomalías físicas o de laboratorio. En determinadas realizaciones, la dosis de tolerancia se refiere a la mayor cantidad de NRG que puede administrarse a una persona sin efectos secundarios graves. En una realización específica, los efectos secundarios graves son fatales o potencialmente mortales. En otra realización específica, los efectos secundarios graves dan lugar a hospitalización de pacientes ingresados u hospitalización actual prolongada. En otra realización específica, los efectos secundarios graves dan lugar a una discapacidad o incapacidad persistente o significativa. En otra realización específica, los efectos secundarios graves dan lugar a infarto de miocardio, evolución a angina inestable u otro aumento en la isquemia miocárdica. En otra realización específica, los efectos secundarios graves dan lugar a la aparición de una nueva arritmia mantenida, p. ej., aleteo auricular o fibrilación auricular, taquicardia ventricular o fibrilación ventricular, bloqueo cardíaco completo. En otra realización específica, los efectos secundarios graves dan lugar a anomalía congénita. En otras realizaciones, los efectos secundarios graves pueden no ser potencialmente mortales inmediatamente o causar la muerte o la hospitalización, pero pueden poner en peligro al paciente o requerir intervención para evitar uno de los resultados mencionados anteriormente.

Como se emplea en la presente memoria, "dosis eficaz" se refiere a la cantidad de NRG que produzca uno o más efectos beneficiosos cuando se administra a un mamífero. En determinadas realizaciones, los efectos beneficiosos pueden determinarse por cambios de la función cardíaca incluidos, pero no limitados por LVEF, LVEDV y LVESV medidos por MRI. En determinadas realizaciones, los efectos beneficiosos pueden determinarse por los cambios hemodinámicos agudos, incluidos, pero no limitados al gasto cardíaco, a las presiones de llenado ventricular izquierdo y derecho, a las presiones arteriales pulmonar y general y a la resistencia vascular general y pulmonar. En determinadas realizaciones, los efectos beneficiosos pueden determinarse mediante marcadores neuro-hormonales e inmunológicos en sangre, p. ej., noradrenalina, aldosterona, endotelina-1, NT-proBNP, propéptido terminal de procolágeno de tipo III (PIIINP), hsCRP, TNF e IL6. En determinadas realizaciones, los efectos beneficiosos se pueden determinar mediante Six-minute Walk Test. En determinadas realizaciones, los efectos beneficiosos pueden determinarse mediante la New York Heart Association Classification of CHF patients. En determinadas realizaciones, los efectos beneficiosos pueden determinarse por la calidad de vida (QOL, Minnesota, 1986). En determinadas realizaciones, los efectos beneficiosos pueden determinarse por la frecuencia de rehospitalización del paciente. En determinadas realizaciones, los efectos beneficiosos pueden determinarse por la tasa de supervivencia o la mortalidad de los pacientes.

Como se emplea en la presente memoria, "tratar" y "tratamiento" se refieren a cualquier manera en que se mejoran los síntomas de una afección, trastorno o enfermedad o de otra manera se alteran favorablemente. El efecto puede ser profiláctico por lo que respecta a evitar completa o parcialmente una enfermedad o uno de sus síntomas y/o puede ser terapéutico por lo que respecta a una cura parcial o completa para una enfermedad y/o efecto secundario atribuible a la enfermedad. El tratamiento también abarca cualquier uso farmacéutico de las composiciones de la presente invención.

Tal como se emplea en la presente memoria, "fracción de expulsión del ventrículo izquierdo" o "LVEF" significa la porción de sangre que se bombea fuera de un ventrículo lleno como resultado de un latido del corazón. Puede definirse mediante la fórmula siguiente: $(LVEDV-LVESV)/LVEDV$.

Tal como se emplea en la presente memoria, "LVEDV" significa el volumen diastólico final del ventrículo izquierdo.

Tal como se emplea en la presente memoria, "LVESV" significa el volumen sistólico final del ventrículo izquierdo.

Tal como se emplea en la presente memoria, "acortamiento fraccionado" o "FS" significa una relación del cambio de diámetro del ventrículo izquierdo entre los estados contraído y relajado. Puede definirse mediante la fórmula siguiente: $(\text{diámetro diastólico final del VI} - \text{diámetro sistólico final del VI}) / \text{diámetro sistólico final del VI}$.

Tal como se emplea en la presente memoria, "insuficiencia cardíaca" significa una anomalía de la función cardíaca en la que el corazón no bombea sangre al ritmo necesario para los requisitos de los tejidos metabolizantes. La insuficiencia cardíaca incluye una amplia gama de enfermedad tales como la insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio, taquiarritmia, cardiomiopatía hipertrófica familiar, cardiopatía isquémica, cardiomiopatía dilatada idiopática, miocarditis y similares. La insuficiencia cardíaca puede ser causada por cualquier número de factores, incluidos, sin limitación, formas isquémica, congénita, reumática, vírica, tóxica o idiopática. La hipertrofia cardíaca crónica es una condición significativamente patológica que es un precursor para la insuficiencia cardíaca congestiva y el paro cardíaco.

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

Tal como se emplea en la presente memoria, "unidad de actividad" o "UE" o "U" significa la cantidad de producto estándar que puede inducir un 50% de reacción máxima. En otras palabras, para determinar la unidad de actividad de un agente activo dado, debe medirse la EC50. Por ejemplo, si la EC50 para un lote de producto fue de 0,1 μg , entonces esa sería una unidad. Además, si se está utilizando 1 μg de estos productos, entonces, se está utilizando 10 UE (1/0,1). La EC50 puede determinarse por cualquier método conocido en la técnica, incluido el método empleado por el inventor. Esta determinación de la unidad de actividad es importante para el control de calidad de

los productos genéticamente modificados y de los fármacos utilizados en clínica, permite que los productos de diferentes productos farmacéuticos y/o diferentes números de lote sean cuantificados con criterios uniformes.

El siguiente es un método ilustrativo, rápido, sensible, de alto flujo y cuantitativo para la determinación de la actividad biológica de NRG-1 a través de la combinación de NRG con moléculas ErbB3/ErbB4 de la superficie celular y mediación indirecta de la fosforilación de ErbB2 (Véase, p. ej., Michael D. Sadick *et al.*, 1996, *Analytical Biochemistry*, 235:207-214 y documento WO03/099300).

En resumen, el ensayo, denominado ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas de activación del receptor de cinasa (KIRA-ELISA), consiste en dos placas separadas de microvaloración, una para el cultivo celular, estimulación de ligandos y lisis celular/disolución del receptor y la otra placa para la captura de receptor y ELISA de fosfotirosina. El ensayo se desarrolló para el análisis de la activación de ErbB2 inducida por NRG y utiliza la estimulación del receptor intacto en la estirpe celular de carcinoma de mama adherente, MCF-7. Las proteínas de membrana se disuelven por lisis con Triton X-100 y el receptor se captura en los pocillos de ELISA recubiertos con anticuerpos específicos contra ErbB2 sin reacción cruzada para ErbB3 o ErbB4. El grado de fosforilación del receptor se cuantifica a continuación por ELISA de antifosfotirosina. Una curva patrón reproducible se genera con una EC50 de aproximadamente 360 pM para heregulina beta 1 (177 a 244). Cuando muestras idénticas de HRG beta 1 (177 a 244) se analizan tanto por KIRA-ELISA como por análisis cuantitativo de transferencia Western con antifosfotirosina, los resultados se correlacionan muy estrechamente entre sí. El ensayo descrito en este informe es capaz de cuantificar específicamente la fosforilación de tirosina de ErbB2 que resulta de la interacción de HRG con ErbB3 y/o ErbB4.

Dado que la mayoría de los medicamentos genéticamente modificados son proteínas y polipéptidos, su actividad puede determinarse por sus secuencias de aminoácidos o el centro de actividad formado por su estructura espacial. El valor de la actividad de la proteína y el polipéptido no es coherente con su calidad absoluta, por lo tanto, no puede determinarse con la unidad de peso como la de los fármacos químicos. Sin embargo, la actividad biológica de los medicamentos genéticamente modificados es generalmente coherente con su farmacodinámica y sistema de determinación del valor probado por la actividad biológica dada puede determinar su unidad de valor. Por lo tanto, la determinación de la actividad biológica puede formar parte de un proceso de valoración de la sustancia con actividad biológica y es un componente importante del control de calidad del producto genéticamente modificado. Es importante determinar los criterios de actividad biológica para el control de calidad de productos genéticamente modificados y los fármacos utilizados clínicamente.

La cantidad de producto patrón que puede inducir el 50% de reacción máxima se define como una unidad de actividad (1 UE). En consecuencia, el producto de diferentes productos farmacéuticos y de los diferentes números de lote puede cuantificarse con criterios uniformes.

B. Ejemplos

La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: Un estudio en fase I, abierto, no comparativo, de una sola dosis para evaluar la tolerancia de neuregulina-1 humana recombinada a inyecciones en voluntarios sanos

Para determinar la seguridad y tolerancia de la dosis única de neuregulina-1 humana recombinada a inyecciones en personas sanas, se llevó a cabo el ensayo clínico en fase I (Protocolo ID.: KW-70112) en el Primer Hospital Universitario de Pekín en China, se inscribieron 28 voluntarios sanos y se asignaron al azar en seis grupos de dosis según su orden de inscripción, entre las cuales la relación de género fue de aproximadamente 1:1.

Producto en investigación:

Especificación: Neucardín™, un polipéptido de 61 aminoácidos que comprende el dominio similar a EGF de la isoforma β2 de neuregulina-1 y que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ. ID. n°: 1, con el peso molecular de 7.054 Dal (1 µg = 0,14 nmol). 250 µg (5.000 UE)/vial (1 µg = 20 UE).

Preparación: Para inyectables.

Modo de administración: inyección en embolada lenta (20 ml/10 min, control de la bomba de infusión).

Almacenamiento: en lugar seguro, con acceso limitado y protegido de la luz, a 3-8 ° C.

Grupos de dosis:

Veintiocho voluntarios se dividieron en seis grupos con dosis crecientes equivalentes a 0,2 µg, 0,4 µg, 0,8 µg, 1,2 µg, 1,6 µg y 2,4 µg (referirse a la Tabla 1 para más detalles). Comenzado desde 0,2 mg/kg, bajo condición previa de confirmación de la seguridad y tolerabilidad del grupo de dosis anterior, el estudio se escalonó a las dosis siguientes.

Tabla 1: Grupos de dosis y pacientes en cada grupo

Grupo	Dosis	Muestras
A	0,2 µg/kg (4 UE/kg)	4
B	0,4 µg/kg (8 EU/kg)	4
C	0,8 µg/kg (16 UE/kg)	4
D	1,2 µg/kg (24 UE/kg)	5
E	1,6 µg/kg (32 UE/kg)	6
F	2,4 µg/kg (48 UE/kg)	5

Procedimientos del estudio

1) Período de selección:

- 5
 - Obtener el formulario de consentimiento informado por escrito;
 - Comprobar los criterios de inclusión/exclusión;
 - Demografía
 - Recoger los antecedentes personales patológicos;
 - Examen físico;
- 10
 - Signos vitales (presión arterial en decúbito supino, pulso, frecuencia respiratoria, temperatura);
 - Hematología, análisis de orina;
 - Análisis bioquímico de sangre;
 - Marcadores cardíacos del suero;
 - ECG;
 - Cardiograma ultrasónico;
- 15
 - Prueba de coagulación de la sangre: APTT, PT;
 - Prueba de serología (incluidos los ensayos HBsAg, anti-VCH, anti-VIH);
 - Radiografía de tórax;
 - Análisis de HCG en la orina (paciente femenina, si es necesario);
- 20
 - Registrar efectos secundarios y efectos secundarios graves;
 - Registrar las medicaciones simultáneas.

2) Valor de referencia: Tiempo desde la administración del fármaco en estudio programada la noche anterior hasta el inicio de la administración del fármaco en estudio.

- 25
 - Examen físico;
 - Signos vitales (presión arterial en decúbito supino, pulso, frecuencia respiratoria, temperatura);
 - Ensayo de anticuerpos específicos;
 - Volver a comprobar los criterios de inclusión/exclusión;
 - Registrar los efectos secundarios y efectos secundarios graves;
 - Registrar la medicación simultánea.

3) El fármaco en estudio del día se administró

- 30
 - Estudiar la administración del fármaco;
 - ECG;
 - Ecocardiografía;
 - Registrar efectos secundarios y efectos secundarios graves;
 - Registrar la medicación simultánea (cada día).
- 35

4) El 1^{er} día y el 7^o día después del cese de la administración de fármacos

- Examen físico;
- Signos vitales (presión arterial en decúbito supino, pulso, frecuencia respiratoria, temperatura);
- Ensayo de anticuerpos específicos;
- 5 • Hematología, análisis de orina;
- Análisis bioquímico de sangre;
- Marcadores cardíacos del suero;
- ECG;
- Cardiograma ultrasónico (7^o día después del cese de la administración del fármaco);
- 10 • Prueba de coagulación de la sangre: APTT, PT;
- Análisis de HCG en orina (paciente femenina, si es necesario);
- Registrar los efectos secundarios y efectos secundarios graves;
- Registrar las medicaciones simultáneas.

5) El 10^o día después del cese de la administración de fármacos

- 15 En cuanto a cualquier punto anormal en los resultados de las pruebas del 7^o día después del cese de la administración del fármaco, este punto se volvió a probar, el 10^o día después de la dosis. Después de eso, se volvió a probar con un determinado intervalo hasta que el resultado se normalizó.

Resultados y Análisis

- 20 28 personas totalmente sanas se inscribieron en 6 grupos de dosis de 0,2, 0,4, 0,8, 1,2, 1,6, 2,4 µg/kg, el número de personas que completaron el estudio en cada uno de los grupos de dosis fue de 4, 4, 4, 5, 6, 5, respectivamente (consultar la Tabla 1).

- 25 Los efectos secundarios (E.S.) se controlaron a partir del momento en que se firmó el consentimiento informado hasta la visita al final del tratamiento. Dieciséis personas (57,1%) experimentaron al menos un efecto secundario durante el transcurso del estudio, todos los efectos secundarios fueron leves. Ninguna de las personas experimentó efectos secundarios moderados o graves durante el estudio.

Durante el estudio, los efectos secundarios más frecuentes se enumeraron en la Tabla 2, los efectos secundarios de gravedad se enumeraron en la Tabla 3.

Tabla 2. Listado de efectos secundarios

Grupo	Pacientes	E.S.	Gravedad	Resultado
0,2 µg/kg	402	ECG anormal	Leve	Recuperación
0,8 µg/kg	101	Náuseas	Leve	Recuperación
	102	Náuseas; fatiga de las extremidades inferiores	Leve	Recuperación
	103	Náuseas; fatiga; heces blandas; ligera excitación	Leve	Recuperación
	104	Náuseas	Leve	Recuperación
1,2 µg/kg	601	ECG anormal	Leve	Recuperación
	603	Anomalías en hematología	Leve	Recuperación
	605	ECG anormal	Leve	Recuperación
1,6 µg/kg	201	Poco apetito; Anomalías en hematología	Leve	Recuperación
	202	Anomalías en ECG y urinarias	Leve	Recuperación
	204	Náuseas; ECG anormal	Leve	Recuperación
	206	Náuseas; Poco apetito	Leve	Recuperación
2,4 µg/kg	302	ECG anormal	Leve	Recuperación
	303	Resfriado común	Leve	Recuperación
	304	ECG anormal	Leve	Recuperación
	305	Náuseas; ligera excitación; ECG anormal	Leve	Recuperación

Tabla 3. Compendio de efectos secundarios por gravedad

	0,2 g/kg (N = 4) n (%)	0,4 g/kg (N = 4) n (%)	0,8 g/kg (N = 4) n (%)	1,2 g/kg (N = 5) n (%)	1,6 g/kg (N = 6) n (%)	2,4 g/kg (N = 5) n (%)	Total (N = 28) n (%)
Los pacientes experimentaron al menos un efecto secundario	1 (25,0)	0 (0,0)	4 (100,0)	3 (60,0)	4 (66,7)	4 (80,0)	16 (57,1)
Pacientes clasificados por peores efectos secundarios							
Leve	1 (25,0)	0 (0,0)	4 (100,0)	3 (60,0)	4 (66,7)	4 (80,0)	16 (57,1)
Moderado	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Grave	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Los pacientes experimentaron al menos un E.S.G.	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Los pacientes experimentaron al menos un efecto secundario que conduce al aborto prematuro	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Muerte	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

5 Los efectos secundarios relacionados con el fármaco en estudio fueron las anomalías en el ECG (8 pacientes, 28,6%) y los trastornos gastrointestinales (7 pacientes, 25,0%). Las anomalías del ECG incluían ligera depresión del segmento ST-T, aplanamiento de la onda T o inversión mínima de la onda T. Durante el período de administración y el período de observación del fármaco en estudio, ninguno de los pacientes experimentó malestar precordial, sensación de ahogo, dolor en el pecho, disnea; la presión arterial era normal 2 horas y 24 horas después de la dosificación; no se encontró ninguna anomalía en el análisis bioquímica de la sangre, los electrolitos, los marcadores cardíacos del suero y la ecocardiografía.

10 Todos los pacientes de cada dosis no cambiaron en los parámetros de la exploración física de los valores de referencia. El ensayo de anticuerpos en el suero presentaba resultados negativos en todas los pacientes (véase la Tabla 4).

Tabla 4. Anticuerpo anti-NRG-1 en el suero de cada grupo

Grupo	Primer muestreo		Segundo muestreo		Tercer muestreo	
	1:50	1:100	1:50	1:100	1:50	1:100
0,2 µg/kg	0,18 ± 0,05	0,12 ± 0,02	0,18 ± 0,06	0,13 ± 0,02	0,17 ± 0,06	0,14 ± 0,02
0,4 µg/kg	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,12 ± 0,06	0,10 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01
0,8 µg/kg	0,16 ± 0,05	0,15 ± 0,02	0,18 ± 0,03	0,15 ± 0,04	0,18 ± 0,05	0,16 ± 0,05
1,2 µg/kg	0,12 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,12 ± 0,03	0,10 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,10 ± 0,02
1,6 µg/kg	0,21 ± 0,12	0,17 ± 0,08	0,22 ± 0,10	0,17 ± 0,07	0,22 ± 0,10	0,18 ± 0,06
2,4 µg/kg	0,15 ± 0,04	0,15 ± 0,03	0,17 ± 0,04	0,13 ± 0,03	0,14 ± 0,03	0,14 ± 0,03

15 Los resultados del estudio clínico en fase I demostraron que en la dosis no superior a 2,4 µg/kg/día, los efectos secundarios relacionados con el fármaco son anomalías en el ECG principalmente leves y trastornos gastrointestinales, no se observaron efectos secundarios moderados o graves. Así que, la dosis no superior a 2,4 µg/kg/día cuando se administra con una sola dosis es tolerable.

Ejemplo 2: Estudio en varias dosis en fase I, abierto, no comparativo, para evaluar la tolerancia de neuregulina-1 humana recombinada para inyectables en voluntarios sanos

20 Para evaluar la seguridad y tolerancia de varias dosis de neuregulina-1 humana recombinada para inyectables en personas sanas durante 5 días consecutivos, se llevó a cabo el estudio clínico en fase I (Protocolo ID: KW-70112) en el Primer Hospital Universitario de Pekín en China, se inscribieron y se distribuyeron aleatoriamente 32 voluntarios sanos en 4 grupos de dosis.

Producto de investigación:

25 Especificación: Neucardin™, un polipéptido de 61 aminoácidos que comprende el dominio similar a EGF de la isoforma β2 de neuregulina-1 y que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ. ID. n.º: 1, con el peso molecular de 7.054 Dal (1 µg = 0,14 nmol). 250 µg (5.000 UE)/vial (1 µg = 20 UE).

Preparación: Para inyectables.

Modo de administración: inyección en embolada lenta (20 ml/10 min, control de la bomba de infusión).

Almacenamiento: en lugar seguro, con acceso limitado y protegido de la luz, a 3-8°C.

Grupos de dosis:

Treinta y dos voluntarios se dividieron en cuatro grupos con dosis crecientes equivalentes a 0,2 µg, 0,4 µg, 0,8 µg y 1,2 µg (véase la Tabla 5 para más detalles). Comenzado desde 0,2 µg/kg, en condición previa de confirmación de la seguridad y tolerabilidad del primer grupo de dosis, el estudio se intensificó a la dosis siguiente.

Tabla 5. Grupos de dosis y pacientes en cada grupo

Grupo	Dosis	Muestras
I (5 días)	0,2 mg/kg (4 UE)	8
II (5 días)	0,4 mg/kg (8 UE)	8
III (5 días)	0,8 mg/kg (16 UE)	8
IV (5 días)	1,2 mg/kg (24 UE)	8

5

Procedimientos del estudio

1) Período de selección:

- Obtener el formulario de consentimiento informado por escrito;
- Comprobar los criterios de inclusión/exclusión;
- Demografía;
- Recoger los antecedentes personales patológicos;
- Examen físico;
- Signos vitales (presión arterial en decúbito supino, pulso, frecuencia respiratoria, temperatura);
- Hematología, análisis de orina;
- Análisis bioquímico de la sangre;
- Marcadores cardíacos del suero;
- ECG;
- Cardiograma ultrasónico;
- Prueba de coagulación de la sangre: APTT, PT;
- Prueba serológica (incluido el ensayo con HBsAg, anti-VCH, anti-VHI);
- Radiografía de tórax;
- Análisis de HCG en la orina (paciente femenina, si es necesario);
- Registrar efectos secundarios y efectos secundarios graves;
- Registrar las medicaciones simultáneas.

10

15

20

25

2) Valor de referencia: Tiempo desde la noche antes de la administración programada del fármaco del estudio al inicio de la administración del fármaco del estudio.

- Examen físico;
- Signos vitales (presión arterial en decúbito supino, pulso, frecuencia respiratoria, temperatura);
- Volver a comprobar los criterios de inclusión/exclusión;
- Registrar efectos secundarios y efectos secundarios graves;
- Registrar la medicación simultánea.

30

3) 1^{er} día a 5^o día de administración del fármaco

- Estudiar la administración del fármaco;
- ECG;
- Registro de efectos secundarios y efectos secundarios graves (cada día);
- Registrar la medicación concomitante (cada día).

35

4) El 1^{er} día y el 7^o día después del cese de la administración del fármaco

- Examen físico;
- Signos vitales (presión arterial en decúbito supino, pulso, frecuencia respiratoria, temperatura);
- Hematología, análisis de orina;
- Análisis bioquímico de la sangre;
- Marcadores cardíacos del suero;
- ECG;
- Cardiograma ultrasónico (7^o día después del cese de la administración del fármaco);
- Prueba de coagulación de la sangre: APTT, PT;
- Análisis de HCG en la orina (persona femenina, si es necesario);
- Registrar los efectos secundarios y efectos secundarios graves;
- Registrar las medicaciones simultáneas.

40

45

5) El 14º día después del cese de la administración del fármaco

En cuanto a cualquier punto anormal en los resultados de las pruebas del 7º día después del cese de la administración del fármaco, este punto se volvió a probar, el 10º día después de la dosis. Después de eso, se volvió a probar con un determinado intervalo hasta que se normalizó el resultado.

5 Resultados y Análisis

Un total de 32 personas sanas se inscribieron de forma aleatoria en 4 grupos de dosis diferentes de 0,2, 0,4, 0,8 y 1,2 µg/kg, con 8 personas en cada grupo y la relación entre los géneros de 1:1. Una persona en el grupo de dosis de 1,2 µg abandonó el estudio debido a efectos secundarios, todas las demás personas completaron el estudio.

10 Se hizo seguimiento de los efectos secundarios desde el momento en que se firmó el consentimiento informado hasta la visita al final del tratamiento. Veintitrés personas (71,9%) experimentaron al menos un efecto secundario durante el transcurso del estudio, todos los efectos secundarios fueron leves. Ninguno de los personas experimentaron efectos secundarios graves o serios durante el estudio (véase la Tabla 6).

Tabla 6. Efectos secundarios por gravedad

	0,2 g/kg (N = 8) n (%)	0,4 g/kg (N = 8) n (%)	0,8 g/kg (N = 8) n (%)	1,2 g/kg (N = 8) n (%)	Total (N = 32) n (%)
Los pacientes experimentaron al menos un efecto secundario	4 (50,0)	5 (62,5)	7 (87,5)	7 (87,5)	23 (71,9)
Pacientes clasificados por peores efectos secundarios					
Leve	4 (50,0)	5 (62,5)	7 (87,5)	7 (87,5)	23 (71,9)
Moderado	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Grave	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Los pacientes experimentaron al menos un E.S.G.	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Los pacientes experimentaron al menos un efecto secundario que conduce a aborto prematuro	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (12,5)	1 (3,1)
Muerte	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)

15 Los efectos secundarios relacionados con el fármaco del estudio descrito con frecuencia incluían anomalías en el ECG (14 casos, 40,63%) y trastornos gastrointestinales (9 casos, 28,13%). Las anomalías en el ECG incluían una ligera depresión del segmento STT, aplanamiento de la onda T o una mínima inversión de la onda T. Durante el período de administración y el período de observación del fármaco del estudio, ninguno de los pacientes con ECG anormal experimentó malestar precordial, sensación de ahogo, dolor torácico y disnea. No se tomó ningún tratamiento en todo el proceso de estudio, casi todas las anomalías en el ECG vuelven a la normalidad dentro de las 48 horas después de la 5ª administración del fármaco del estudio.

20 Los trastornos gastrointestinales relacionados con el fármaco del estudio fueron malestar estomacal, náuseas, vómitos y heces blandas (véase la Tabla 7).

Tabla 7. Efectos secundarios relacionados con el fármaco del estudio descrito con frecuencia

Clase de órganos del sistema MedDRA/ término preferido de MedDRA	0,2 µg/kg (N = 8) n (%)	0,4 µg/kg (N = 8) n (%)	0,8 µg/kg (N = 8) n (%)	1,2 µg/kg (N = 8) n (%)	Total (N = 32) n (%)
Pacientes que experimentaron al menos un efecto secundario	2 (25,0)	4 (50,0)	7 (87,5)	7 (87,5)	20 (62,5)
Trastornos de la piel y la hipodermis	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (25,0)	0 (0,0)	2 (6,3)
Exantema	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (25,0)	0 (0,0)	2 (6,3)
Trastorno del sistema nervioso	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (12,5)	0 (0,0)	1 (3,1)
Cefalea	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (12,5)	0 (0,0)	1 (3,1)
Trastorno gastrointestinal	0 (0,0)	1 (12,5)	4 (50,0)	4 (50,0)	9 (28,1)
Náuseas	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (50,0)	2 (25,0)	6 (18,8)
Vómitos	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (25,0)	2 (6,3)
Malestar estomacal	0 (0,0)	1 (12,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (3,1)
Heces blandas	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (12,5)	1 (3,1)
Trastorno cardíaco	2 (25,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (6,3)
Arritmia ventricular	2 (25,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (6,3)
Anomalías en el ECG	0 (0,0)	3 (37,5)	5 (62,5)	6 (75,0)	14 (43,8)
Inversión de la onda T	0 (0,0)	2 (25,0)	2 (25,0)	3 (37,5)	7 (21,9)

Clase de órganos del sistema MedDRA/ término preferido de MedDRA	0,2 µg/kg (N = 8) n (%)	0,4 µg/kg (N = 8) n (%)	0,8 µg/kg (N = 8) n (%)	1,2 µg/kg (N = 8) n (%)	Total (N = 32) n (%)
Depresión de la onda T	0 (0,0)	2 (25,0)	5 (62,5)	4 (50,0)	11 (34,4)
Anomalías en la onda T	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (12,5)	1 (3,1)

5 Los resultados del estudio clínico en fase I demostraron que en la dosis no superior a 1,2 m µg/kg/día, los efectos secundarios relacionados con el fármaco son anomalías en el ECG y trastornos gastrointestinales principalmente leves, no se observaron efectos secundarios moderados o graves. Los efectos secundarios experimentados en este estudio de varias dosis fueron similares a los del estudio de una sola dosis, apoyando que la incidencia e intensidad de los efectos secundarios no va a aumentar cuando el fármaco del estudio se administre durante varios días.

Ejemplo 3: Un estudio abierto, de un solo centro, de grupos paralelos para evaluar la eficacia y seguridad de neuregulina-1 humana recombinada para inyectables en pacientes de insuficiencia cardíaca en tratamiento normal

10 Para evaluar la eficacia y seguridad de neuregulina-1 humana recombinada para inyectables en la insuficiencia cardíaca crónica y para investigar el intervalo de administración eficaz de neuregulina-1 humana recombinada para inyectables para tratar la insuficiencia cardíaca crónica, se llevó a cabo el estudio basado en un tratamiento normal de fase II, abierto, de un solo centro, de grupos paralelos, (Protocolo ID.: HREC 06/035) en St Vicent's Hospital en Australia. Quince pacientes con insuficiencia cardíaca crónica se inscribieron y se asignaron de forma aleatoria en 3 grupos.

15 Producto de investigación:

Especificación: Neucardin™, un polipéptido de 61 aminoácidos que comprende el dominio similar a EGF de la isoforma β2 de neuregulina-1 y que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ. ID. n°: 1, con el peso molecular de 7.054 Dal (1 µm = 0,14 nmol). 250 µg (5.000 UE)/vial (1µ g = 20 UE).

Preparación: Para inyectables.

20 Modo de administración: Goteo por vía intravenosa.

Almacenamiento: en lugar seguro, con acceso limitado y protegido de la luz, a 3-8°C.

Grupos de dosis:

25 Quince pacientes con insuficiencia cardíaca crónica (LVEF ≤ 40%, NYHA clase II/III, probada en ACEI/ARA y bloqueador beta con dosis estables de estos medicamentos durante los 3 meses anteriores) se inscribieron y asignaron de forma aleatoria en 3 grupos de dosis con 5 pacientes en cada grupo (véase la Tabla 8).

Tabla 8. Régimen de dosificación del estudio de fase II en Australia

Grupo de dosis	Muestra	Dosis (1 ^{er} día)	Dosis (2 ^o a 11 ^o día)
A	5	1,2 µg/kg/6 h	2,4 µg/kg/12 h
B	5	1,2 µg/kg/6 h	1,2 µg/kg/12 h
C	5	1,2 µg/kg/6 h	0,6 µg/kg/12 h

Procedimientos del estudio

1) Selección y valores de referencia:

- Obtener el formulario de consentimiento informado por escrito;
- 30 • Recoger los antecedentes personales patológicos;
- Signos vitales (presión arterial en decúbito supino, pulso, frecuencia respiratoria, temperatura);
- Examen físico;
- Comprobar los criterios de inclusión/exclusión;
- ECG;
- 35 • FBC;
- Marcador inmunológico neurohormonal (NT-proBNP, PIIINP, NA, Aldos, endotelina, hsCRP, TNF-a, IL-6);
- Cardiograma ultrasónico;
- IRM.

2) 1^{er} día de administración de fármacos

- 40 • Signos vitales (presión arterial en decúbito supino, pulso, frecuencia respiratoria, temperatura);
- Administración del fármaco del estudio;
- ECG;
- Catéter de RH;

- NT-proBNP.

3) 2º a 11º día de administración de fármacos

- Signos vitales (presión arterial en decúbito supino, pulso, frecuencia respiratoria, temperatura);
- Administración del fármaco del estudio;
- ECG.

4) 12º día del estudio

- Signos vitales (presión arterial en decúbito supino, pulso, frecuencia respiratoria, temperatura);
- ECG;
- Catéter de RH;
- FBC;
- Marcador inmunológico neurohormonal (NT-proBNP, PIIINP, NA, Aldos, endotelina, hsCRP, TNF-a, IL-6);
- Cardiograma ultrasónico;
- IRM.

5) 30º día del estudio

- Signos vitales (presión arterial en decúbito supino, pulso, frecuencia respiratoria, temperatura);
- ECG;
- FBC;
- Marcador inmunológico neurohormonal (NT-proBNP, PIIINP, NA, Aldos, endotelina, hsCRP, TNF-a, IL-6);
- Cardiograma ultrasónico;
- IRM.

6) 60º día del estudio

- Signos vitales (presión arterial en decúbito supino, pulso, frecuencia respiratoria, temperatura);
- ECG;
- FBC;
- Marcador inmunológico neurohormonal (NT-proBNP, PIIINP, NA, Aldos, endotelina, hsCRP, TNF-a, IL-6);

7) 90º día del estudio

- Recoger los antecedentes personales patológicos;
- Signos vitales (presión arterial en decúbito supino, pulso, frecuencia respiratoria, temperatura);
- Examen físico;
- ECG;
- FBC;
- Catéter de RH;
- Marcador inmunológico neurohormonal (NT-proBNP, PIIINP, NA, Aldos, endotelina, hsCRP, TNF-a, IL-6);
- Cardiograma ultrasónico;
- IRM.

Resultados y Análisis

El criterio principal de valoración de la eficacia está evaluando la función ventricular izquierda y la remodelación (como se determina por el cambio en LVEF, LVEDV y LVESV medido por IRM). Los parámetros hemodinámicos y los marcadores neurohormonales e inmunológicos actúan como criterios secundarios de valoración de la eficacia.

Como recuento total, 13 pacientes (13/15, 86,7%) recibieron el fármaco de la prueba por infusión intravenosa durante 11 días consecutivos, un persona (1/15, 6,7%) recibió el fármaco de la prueba por infusión intravenosa durante 10 días, un persona (1/15, 6,7%) recibió el fármaco de la prueba por infusión intravenosa durante 7 días. No se retiró ninguna persona.

En el grupo A (1,2 µg/kg/día * 1 día + 2,4 µg/kg/día * 10 días), 4 pacientes (4/5, 80,0%) recibieron el fármaco de la prueba por infusión intravenosa durante 11 días consecutivos, un persona (1/5, 20,0%) recibió el fármaco de la prueba por vía infusión intravenosa durante 7 días. En el grupo B (1,2 µg/kg/día * 1 día + 1,2 µg/kg/día * 10 días), 5 pacientes (5/5, 100,0%) recibieron el fármaco de la prueba por infusión intravenosa durante 11 días consecutivos. En el grupo C (1,2 µg/kg/día * 1 día + 0,6 µg/kg/día * 10 días), 4 pacientes (4/5, 80,0%) recibieron el fármaco de la prueba por infusión intravenosa durante 11 días consecutivos, un persona (1/5, 20%) recibió el fármaco de la prueba por infusión intravenosa durante 10 días.

En el grupo A, tras la administración de Neucardin™, el 12º día, LVEF (%) mejoró en un 5,4% en comparación con el valor de referencia; el incremento porcentual fue del 16,0%; en 1 mes, la LVEF (%) mejoró en un 3,3% en comparación con el valor de referencia, el porcentaje de aumento fue del 8,8%; a los 3 meses, la LVEF (%) mejoró aún en un 2,6% en comparación con el valor de referencia, el porcentaje de aumento fue del 6,1%.

En el grupo B, el 12º día, la LVEF (%) mejoró en un 3,8% en comparación con el valor de referencia; el incremento porcentual fue del 11,8%; en 1 mes, la LVEF (%) mejoró en un 3,4% en comparación con el valor de referencia, el porcentaje de aumento fue del 9,7%; a los 3 meses, la mejora de la LVEF (%) se incrementó hasta el 4,8% en comparación con el valor de referencia, el porcentaje de aumento fue del 15,7%.

5 En el grupo C, el 12º día, la LVEF (%) mejoró en un 2,2% en comparación con el valor de referencia; el porcentaje de incremento fue del 8,4%; en 1 mes, la LVEF (%) mejoró en un 4,6% en comparación con el valor de referencia, el porcentaje de aumento fue del 15,4%; y la mejora de la LVEF (%) se mantuvo hasta 3 meses un 4,4% en comparación con el valor de referencia, el porcentaje de aumento fue del 15,5%.

10 Y para los 15 pacientes que completaron el estudio (combinado), la mejora de la LVEF (%) fue de 3,8%, 3,8% y 3,9% el 12º día, en 1 mes, 3 meses, en comparación con el valor de referencia, respectivamente (véase la Tabla 9).

Para los 15 pacientes que completaron el estudio (combinado) y para cada grupo de dosis individual, no hubo ningún cambio significativo en comparación con el valor de referencia de LVEDV (ml) en ningún punto de tiempo.

15 En cuanto a LVESV (ml), en el grupo A, el 12º día, el LVESV (ml) se redujo en 8,4 ml en comparación con el valor de referencia, la disminución porcentual fue del 4,9%; en 1 mes, el LVESV (ml) se redujo en 14,3 ml en comparación con el valor de referencia, la disminución porcentual fue del 8,8%; a los 3 meses, el LVESV (ml) se redujo en 12,0 ml en comparación con el valor de referencia, la disminución porcentual fue del 8,3%.

Tabla 9. Valores medidos (media ± D.T.) de la LVEF (%)

Grupo de dosis	Puntos de tiempo	Valor medido de LVEF (%)	Cambio absoluto de LVEF (%)	Cambio porcentual de LVEF comparado con el valor de referencia (%)
Grupo A (1,2 µg/kg/día * 1 día + 2,4 µg/kg/día * 10 días)	Valor de referencia (n = 5)	33,2 ± 9,7		
	12º día (n = 5)	38,6 ± 11,6	5,4 ± 2,9	16,0 ± 8,2
	1 mes (n = 4)	37,5 ± 13,1	3,3 ± 2,8	8,8 ± 6,3
	3 meses (n = 5)	35,8 ± 13,1	2,6 ± 4,0	11,0 ± 6,1
Grupo B (1,2 µg/kg/día * 1 día + 1,2 µg/kg/día * 10 días)	Valor de referencia (n = 5)	30,8 ± 8,0		
	12º día (n = 5)	34,6 ± 10,0	3,8 ± 2,6	11,8 ± 5,9
	1 mes (n = 5)	34,2 ± 10,9	3,4 ± 4,1	9,7 ± 12,4
	3 meses (n = 5)	35,6 ± 9,4	4,8 ± 3,4	15,7 ± 11,2
Grupo C (1,2 µg/kg/día * 1 día + 0,6 µg/kg/día * 10 días)	Valor de referencia (n = 5)	32,6 ± 7,3		
	12º día (n = 5)	34,8 ± 5,4	2,2 ± 3,7	8,4 ± 11,9
	1 mes (n = 5)	37,2 ± 6,8	4,6 ± 3,4	15,4 ± 11,5
	3 meses (n = 5)	37,0 ± 5,2	4,4 ± 3,0	15,5 ± 12,9
Todos los pacientes	Valor de referencia (n = 15)	32,2 ± 7,9		
	12º día (n = 15)	36,0 ± 8,9	3,8 ± 3,2	12,1 ± 8,9
	1 mes (n = 14)	36,2 ± 9,6	3,8 ± 3,3	11,5 ± 10,3
	3 meses (n = 15)	36,1 ± 9,1	3,9 ± 3,4	12,4 ± 11,8

20 En el grupo B, el 12º día, el LVESV (ml) se redujo 1,0 ml en comparación con el valor de referencia, la disminución porcentual fue del 2,5%; en 1 mes, el LVESV (ml) se redujo en 3,8 ml en comparación con el valor de referencia, la disminución porcentual fue del 2,5%; a los 3 meses, el LVESV (ml) se redujo en 12,6 ml en comparación con el valor de referencia, la disminución porcentual fue del 6,3%.

En el grupo C, el 12º día, el LVESV (ml) se redujo en 11,4 ml en comparación con el valor de referencia, la disminución porcentual fue del 8,6%; en 1 mes, el LVESV (ml) se redujo en 8,0 ml en comparación con el valor de

referencia, la disminución porcentual fue del 5,1%; a los 3 meses, el LVESV (ml) se redujo en 10,8 ml en comparación con el valor de referencia, la disminución porcentual fue del 7,1%.

Y para los 15 pacientes que completaron el estudio (combinado), la disminución del LVESV (ml) fue del 6,9, 8,3 y 11,8 ml el 12° día, en 1 mes, en 3 meses, en comparación con el valor de referencia, respectivamente (véase la Tabla 10).

5

Tabla 10. Valores medidos (media ± D.T.) de LVESV (ml)

Grupos de dosis	Puntos de tiempo	Valor medido de LVESV (ml)	Cambio absoluto de LVESV (ml)	Cambio porcentual de LVESV comparado con el valor de referencia (%)
Grupo A (1,2 µg/kg/día * 1 día + 2,4 µg/kg/día * 10 días)	Valor de referencia (n = 5)	194,2 ± 74,0		
	12° día (n = 5)	185,8 ± 73,2	-8,4 ± 10,4	-4,9 ± 6,3
	1 mes (n = 4)	172,8 ± 81,5	-14,3 ± 14,9	-8,8 ± 9,8
	3 meses (n = 5)	182,2 ± 83,4	-12,0 ± 17,6	-8,3 ± 11,4
Grupo B (1,2 µg/kg/día * 1 día + 1,2 µg/kg/día * 10 días)	Valor de referencia (n = 5)	179,6 ± 34,7		
	12° día (n = 5)	178,6 ± 60,5	-1,0 ± 29,0	-2,5 ± 16,6
	1 mes (n = 5)	175,8 ± 40,1	-3,8 ± 14,5	-2,5 ± 8,3
	3 meses (n = 5)	167,0 ± 26,0	-12,6 ± 15,6	-6,3 ± 8,3
Grupo C (1,2 µg/kg/día * 1 día + 0,6 µg/kg/día * 10 días)	Valor de referencia (n = 5)	182,4 ± 70,5		
	12° día (n = 5)	171,0 ± 81,6	-11,4 ± 22,2	-8,6 ± 14,2
	1 mes (n = 5)	174,4 ± 73,4	-8,0 ± 9,2	-5,1 ± 6,9
	3 meses (n = 5)	171,6 ± 74,4	-10,8 ± 8,9	-7,1 ± 6,6
Todos los pacientes	Valor de referencia (n = 15)	185,4 ± 58,1		
	12° día (n = 15)	178,5 ± 67,2	-6,9 ± 20,8	-5,3 ± 12,4
	1 mes (n = 14)	174,4 ± 60,7	-8,3 ± 12,7	-5,2 ± 8,1
	3 meses (n = 15)	173,6 ± 61,7	-11,8 ± 13,5	-7,2 ± 8,4

Una infusión de 6 horas de Neucardin™ influyó de forma aguda y significativa en varios parámetros hemodinámicos cuando se controló durante 24 horas. Como se muestra en la Tabla 11, la influencia aguda de Neucardin™ sobre la hemodinámica fue bastante positiva.

Tabla 11. Compendio de los cambios significativos en los parámetros hemodinámicos durante y después de una infusión de 6 horas de Neucardin™

Parámetros hemodinámicos	Puntos de tiempo cuando los parámetros aumentaban significativamente en comparación con el valor de referencia	Puntos de tiempo cuando los parámetros disminuían significativamente en comparación con el valor de referencia
Frecuencia cardíaca (FC, latidos/min)	1 hora, 2 horas, 4 horas y 6 horas	
Presión arterial sistólica (PAS, mm Hg)	6 horas	
Presión arterial diastólica (PAD, mm Hg)		24 horas
Presión arterial media (PAM, mm Hg)		24 horas
Presión en aurícula derecha (AD, mm Hg)		1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas y 24 horas
Presión sistólica en arteria pulmonar (PSAP, mm Hg)	30 minutos, 1 hora	
Presión diastólica en arteria pulmonar (PDAP, mm Hg)		2 horas, 12 horas y 24 horas
Presión media en arteria pulmonar (PMAP, mm Hg)		2 horas, 12 horas y 24 horas
Presión de enclavamiento en arteria pulmonar (PEAP, mm Hg)		30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas y 24 horas
Gradiente de presión transpulmonar (GPT, mm Hg)	30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas y 24 horas	
Resistencia vascular pulmonar (RVP, dinas. s.cm ⁻⁵)		
Resistencia vascular general (SVR, dinas. s.cm ⁻⁵)		30 minutos, 2 horas, 4 horas, 6 horas y 24 horas
Gasto cardíaco (CO, l/min)	30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas y 24 horas	
Índice cardíaco (IC, l/min/m ²)	30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas, 6 horas y 24 horas	
Volumen sistólico (VS, ml)	30 minutos, 2 horas, 4 horas, 12 horas y 24 horas	
Índice volumétrico sistólico (IVS, ml/m ²)	30 minutos, 2 horas, 4 horas, 12 horas y 24 horas	

Los cambios significativos a largo plazo de la hemodinámica de los pacientes del estudio se resumen en la tabla siguiente, y los detalles se enumeran a continuación (Tabla 12).

Tabla 12. Compendio de los cambios significativos en los parámetros hemodinámicos a largo plazo

Parámetros hemodinámicos	Puntos de tiempo cuando los parámetros aumentaban significativamente en comparación con el valor de referencia	Puntos de tiempo cuando los parámetros disminuían significativamente en comparación con el valor de referencia
PAS (mm Hg)	12º día, 3 meses	
PAD (mm Hg)	12º día, 3 meses	
PAM (mm Hg)	12º día, 3 meses	
GPT (mm Hg)	12º día, 3 meses	
PEAP (mm Hg)		3 meses

- 5 En lo que se refiere a los biomarcadores neurohormonales e inmunológicos, la NT-proBNP se incrementó después de la infusión de 6 horas de Neucardin™ el primer día, y no volvió a los valores de referencia a las 24 horas desde el

inicio de la administración, y después del final de la medicación, disminuyó y volvió al valor de referencia al final del estudio.

No se observó ningún cambio significativo en hs-CRP.

5 En cuanto a la evaluación de la seguridad, 10 pacientes (10/15, 66,7%) experimentaron al menos un efecto secundario (E.S.). Cada uno de los E.S. descritos con más frecuencia fueron las náuseas (20%), el letargo (20%) y el dolor torácico (20%), sin una relación causal clara con la dosis. Aproximadamente el 67% de los pacientes tenían anomalías en el ECG durante o después de la administración del fármaco de estudio, incluyendo: inversiones o aplanamiento de la onda T, cambios en el segmento ST-T, contracciones ventriculares prematuras, salvas discontinuas de taquicardia supraventricular o ventricular o fibrilación/aleteo auricular. Como las anomalías en el ECG son frecuentes en pacientes con ICC y no hubo grupo de placebo para comparación, es difícil evaluar la causalidad o relación con el fármaco en este estudio.

Una persona en el grupo A (2,4 µg/kg/día) y un persona en el grupo C (0,6 µg/kg/día) experimentaron efecto(s) secundario(s) grave(s) (E.S.G.).

15 No hubo anomalías clínicas significativas identificadas en cuanto se refiere a signos vitales, examen físico o parámetros de laboratorio.

Según los resultados del estudio en fase II, se cree que la neuregulina-1 humana recombinada es eficaz y segura para el tratamiento de pacientes con insuficiencia cardíaca crónica en el intervalo de administración entre 0,6 a 2,4 µg/kg/día (12 a 48 UE/kg/día o 0,08 a 0,34 nmol/kg/día).

20 Ejemplo 4: Estudio controlado con placebo al azar, doblemente a ciegas, multicéntrico, para evaluar la eficacia y seguridad de la neuregulina-1 humana recombinada en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica en base a un tratamiento habitual

25 Para evaluar la eficacia y seguridad de neuregulina-1 humana recombinada para inyectables en la insuficiencia cardíaca congestiva crónica y para investigar el intervalo de administración eficaz de neuregulina-1 humana recombinada para inyectables para tratar la insuficiencia crónica cardíaca congestiva, se llevó a cabo la fase II del estudio basado en el tratamiento habitual, controlado con placebo, doblemente a ciegas, multicéntrico (Protocolo ID.: ZS-01-206) en varios centros clínicos en China. Sesenta y cuatro pacientes con diagnóstico de insuficiencia cardíaca crónica procedente de uno o más factores incluidos la miocardiopatía dilatada, hipertensión, miocarditis vírica, infarto de miocardio, y cardiomiopatía alcohólica, se inscribieron y se asignaron al azar en 4 grupos.

Producto de la investigación:

30 Especificación: Neucardin™, polipéptido de 61 aminoácidos que comprende el dominio similar a EGF de la isoforma β2 de neuregulina-1 y que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ. ID. nº: 1, con peso molecular de 7.054 Dal (1 µg = 0,14 nmol). 250 µg (5.000 UE)/vial (1 µg = 20 UE).

Preparación: Para inyectables.

Modo de administración: Goteo por vía intravenosa.

35 Almacenamiento: en lugar seguro, con acceso limitado y protegido de la luz, a 3-8°C.

Placebo:

Especificación: Excipiente para Neucardin™. 250 µg/vial y sin proteína neuregulina-1 humana recombinada activa.

Grupos de dosis:

40 Se designaron 64 pacientes con insuficiencia cardíaca crónica (LVEF ≤ 40%, NYHA clase II/III, probada en ACEI/ARA, bloqueador beta, diuréticos o digoxina con dosis estables de estos medicamentos durante 1 mes) para ser inscritos y asignados al azar en 4 grupos de dosis con 16 pacientes en cada grupo (véase la Tabla 13).

Tabla 13. Grupos de dosis y régimen de dosificación

Dosis	0 µg/kg/día	0,3 µg/kg/día	0,6 µg/kg/día	1,2 µg/kg/día
Administración	Infusión intravenosa			
Volumen	50 ml			
Curso	10 horas al día, durante 10 días consecutivos			

Procedimientos del estudio

1) Selección y valor de referencia:

- Obtención del formulario de consentimiento informado por escrito;
- Demografía;
- 5 • Recoger los antecedentes personales patológicos;
- Signos vitales (presión arterial en decúbito supino, pulso, frecuencia respiratoria, temperatura);
- Examen físico;
- Análisis de sangre/orina de rutina, análisis bioquímico de sangre;
- 10 • Prueba de coagulación de la sangre: APTT, PT;
- NT-proBNP;
- ECG;
- Clasificación de la NYHA;
- Cardiograma ultrasónico;
- Radiografía de tórax;
- 15 • IRM;
- Doppler tisular (mama, hígado, vesícula biliar, riñón, glándula suprarrenal, páncreas, bazo, ovario, útero, próstata);
- Prueba de embarazo en orina (mujeres en edad de procrear);
- Evaluación disnea en la fase de reposo;
- 20 • Calidad de vida;
- Prueba de marcha de seis minutos;
- Comprobar los criterios de inclusión/exclusión;
- Volumen de orina en 24 horas;
- Registrar los efectos secundarios y efectos secundarios graves;
- 25 • Registrar las medicaciones simultáneas.

2) 1^{er} a 10^o día de administración de medicamentos

- Signos vitales (presión arterial en decúbito supino, pulso, frecuencia respiratoria, temperatura);
- ECG;
- 30 • Administración del fármaco del estudio;
- Volumen de orina en 24 horas;
- Registrar los efectos secundarios y efectos secundarios graves;
- Registrar las medicaciones simultáneas.

3) 11^o a 13^o día del estudio

- Signos vitales (presión arterial en decúbito supino, pulso, frecuencia respiratoria, temperatura);
- 35 • Examen físico;
- ECG;
- Análisis de sangre/orina de rutina, análisis bioquímico de sangre;
- Prueba de coagulación de la sangre: APTT, PT;
- NT-proBNP;
- 40 • Prueba de embarazo en orina (mujeres en edad de procrear);
- Calidad de vida;
- Prueba de marcha de seis minutos;
- IRM;
- Clasificación de la NYHA;
- 45 • Evaluación de disnea en fase de reposo;
- Volumen de orina en 24 horas;
- Registrar los efectos secundarios y efectos secundarios graves;
- Registrar las medicaciones simultáneas.

4) 30^o y 90^o día del estudio

- 50 • Signos vitales (presión arterial en decúbito supino, pulso, frecuencia respiratoria, temperatura);
- Examen físico;
- Análisis de sangre/orina de rutina, análisis bioquímico de sangre;
- Prueba de coagulación de la sangre: APTT, PT;
- NT-proBNP;
- 55 • ECG;
- Radiografía de tórax;
- Prueba de marcha de seis minutos;
- IRM;

- Clasificación de la NYHA;
- Evaluación de disnea en fase de reposo;
- Calidad de vida;
- Registrar los efectos secundarios y efectos secundarios graves;
- Registrar las medicaciones simultáneas.

Resultados y Análisis

Cuarenta pacientes completaron el estudio. El criterio principal de valoración de la eficacia es los parámetros de la función del corazón (LVEF, LVEDV y LVESV) el 30º día. En cuanto a la LVEF, el valor medio de la LVEF se reduce desde 21,54% al valor de referencia a 20,93% el 30º día en el grupo de placebo. Mientras que en el grupo de 0,3 g/kg/día, el valor medio de LVEF ha mejorado ligeramente desde 25,08% de referencia a 26,61%, el incremento porcentual es 4,88%. Y en el grupo de 0,6 mg/kg/día, el valor medio de la LVEF se incrementa significativamente desde 23,03% de referencia hasta 28,01% el día 30, el incremento porcentual es 27,11% (véase la Tabla 14).

En cuanto a LVEDV, el valor medio de LVEDV ha aumentado desde 392,16 ml al inicio hasta 413,35 ml el 30º día en el grupo de placebo, con el incremento porcentual de 5,93%. Mientras que en el grupo de 0,3 µg/kg/día, el valor medio de LVEDV disminuyó ligeramente desde 333,62 ml al inicio hasta 323,22 ml el 30º día, con 3,28% de disminución porcentual. En el grupo de 0,6 µg/kg/día y 1,2 µg/kg/día, el valor medio de LVEDV disminuyó significativamente desde 408,51 ml y 397,04 ml al inicio hasta 386,89 ml y 374,46 ml el 30º día, respectivamente, ambos con la disminución porcentual de más del 5% (véase la Tabla 15).

Tabla 14. Valor de LVEF antes y después del tratamiento

	Grupo A (Placebo) n = 10	Grupo B 0,3 µg/kg/día n = 11	Grupo C 0,6 µg/kg/día n = 11	Grupo D 1,2 µg/kg/día n = 8
Valor de referencia (%)	21,54 ± 4,73	25,08 ± 7,64	23,03 ± 10,23	22,64 ± 4,24
30º día (%)	20,93 ± 8,53	26,61 ± 9,68	28,01 ± 11,27	22,01 ± 7,21
ΔLVEF (%)	-0,61 ± 8,22	1,53 ± 3,81	4,98 ± 5,37	-0,63 ± 4,34
Porcentaje cambiado (%)	-1,39 ± 33,34	4,88 ± 17,07	27,11 ± 31,12	-4,01 ± 19,42

Tabla 15. Valor de LVEDV antes y después del tratamiento

	Grupo A (Placebo) n = 10	Grupo B 0,3 µg/kg/día n = 11	Grupo C 0,6 µg/kg/día n = 11	Grupo D 1,2 µg/kg/día n = 8
Valor de referencia (ml)	392,16 ± 107,38	333,62 ± 106,14	408,51 ± 142,85	397,04 ± 86,94
30º día (ml)	413,35 ± 143,98	323,22 ± 111,86	386,89 ± 150,14	374,46 ± 84,47
ΔLVEDV (ml)	21,20 ± 108,13	-10,40 ± 33,19	-21,63 ± 42,72	-22,58 ± 37,72
Porcentaje cambiado (%)	5,93 ± 31,48	-3,28 ± 11,34	-5,64 ± 10,03	-5,41 ± 8,53

El resultado de LVESV es similar al de LVEDV, en el grupo de placebo, el valor medio de LVESV aumentó desde 310,54 ml al inicio hasta 335,78 ml el 30º día, con el aumento porcentual del 9,45%. Mientras que en cada grupo de tratamiento con neuregulina recombinada, el valor medio de LVESV disminuyó. Para el grupo de 0,6 g/kg/día como ejemplo, el valor medio de LVESV disminuyó desde 325,02 ml al inicio hasta 291,71 ml el 30º día, con la disminución porcentual del 11,58% (véase la Tabla 16).

Tabla 16. Valor de LVESV antes y después del tratamiento

	Grupo A (Placebo) n = 10	Grupo B 0,3 µg/kg/día n = 11	Grupo C 0,6 µg/kg/día n = 11	Grupo D 1,2 µg/kg/día n = 8
Valor de referencia (ml)	310,54 ± 97,54	254,85 ± 100,86	325,02 ± 142,70	308,46 ± 74,37
30° día (ml)	335,78 ± 145,37	244,01 ± 110,30	291,71 ± 147,66	292,22 ± 69,20
ΔLVESV (ml)	25,24 ± 119,19	-10,84 ± 25,10	-33,31 ± 44,54	-16,24 ± 20,89
Porcentaje cambiado (%)	9,45 ± 48,04	-5,33 ± 12,89	-11,58 ± 12,74	-5,01 ± 6,77

5 NT-proBNP es un importante factor pronóstico independiente para la tasa de supervivencia de los pacientes con insuficiencia cardíaca crónica. A partir del resultado, el valor de NT-proBNP en el grupo de placebo y 1,2 µg/kg/día el 30° día y el 90° día aumentaron significativamente en comparación con el valor de referencia. Mientras que en el grupo de 0,3 µg/kg/día y 0,6 µg/kg/día, muestra una tendencia a la disminución (véase la Tabla 17), lo que sugiere un mejor pronóstico.

Tabla 17. Cambio de NT-proBNP el 30° día y el 90° día

	Grupo A (Placebo) n = 10	Grupo B 0,3 µg/kg/día n = 11	Grupo C 0,6 µg/kg/día n = 11	Grupo D 1,2 µg/kg/día n = 8
Valor de referencia (fmol/ml)	1013 ± 634,5	1732 ± 1.638,4	1403 ± 1.755,2	859 ± 460,7
30° día (fmol/ml)	811 ± 436,6	1631 ± 1222,1	1021 ± 1045,9	822 ± 349,4
Porcentaje cambiado (%)	6,54 ± 74,29	25,68 ± 72,09	-4,27 ± 41,37	49,42 ± 118,19
90° día (fmol/ml)	869 ± 440,9	1663 ± 1664,1	1112 ± 1418,5	847 ± 316,2
Porcentaje cambiado (%)	26,79 ± 102,61	-3,5 ± 60,07	8,66 ± 74,83	45,99 ± 97,45

10 Hubo efectos secundarios en cada grupo, especialmente, en el grupo de 1,2 µg/kg/día, el 100% de los pacientes en el grupo experimentaron al menos un efecto secundario. Los E.S. descritos con mayor frecuencia fueron náuseas, falta de apetito y cefalea. No hubo efectos secundarios graves descritos (véase la Tabla 18). La mayoría de los efectos secundarios comunicados se aliviaron sin tratamiento y el resto se aliviaron después del cese de la administración del fármaco del estudio o mediante tratamiento sintomático y sin secuelas.

No hubo anomalías clínicas significativas identificadas referentes a los signos vitales y al examen físico.

15 A partir de los resultados de eficacia y seguridad, se puede encontrar que en la dosis de 0,3 a 1,2 µg/kg/día (6-24 UE/kg/día o 0,04 a 0,17 nmol/kg/día), la neuregulina-1 humana recombinada es eficaz y segura para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca crónica.

Tabla 18. Incidencia de E.S. y E.S.G. en cada grupo

	Grupo de dosis	Con	Sin	Incidencia (%)
E.S.	Grupo A (n = 11)	6	5	54,5
	Grupo B (n = 11)	7	4	63,64
	Grupo C (n = 12)	8	4	66,67
E.S.G.	Grupo D (n = 10)	10	0	100
	Grupo A (n = 11)	0	11	0
	Grupo B (n = 11)	0	11	0
	Grupo C (n = 12)	0	12	0
	Grupo D (n = 10)	0	10	0

20 A partir de los resultados de estos estudios clínicos, se puede llegar a una conclusión de que en la dosis de 0,3-2,4 µg/kg/día (6-48 UE/kg/día o 0,04-0,34 nmol/kg/día), la neuregulina-1 humana recombinada es tolerante y eficaz para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca crónica.

LISTA DE SECUENCIAS

5 <160> NUMERO DE SEC ID NOS: 2

<210> SEC ID NO 1

<211> LONGITUD: 61

<212> TIPO: PROTEINA

10 <213> ORGANISMO: Homo sapiens

<400> SECUENCIA: 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

15

<210> SEC ID NO 2

<211> LONGITUD: 23

<212> TIPO: PROTEINA

<213> ORGANISMO: Homo sapiens

20

<400> SECUENCIA: 1

Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met

1 5 10 15

Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro

20

REIVINDICACIONES

1. Proteína neuregulina 1 para su utilización en un método para la prevención, el tratamiento o el retardo de la insuficiencia cardíaca en mamíferos que la necesitan, en donde el método comprende la administración al mamífero que la necesita de dicha proteína neuregulina 1 en una cantidad:
- 5 a) de aproximadamente 0,3 µg a aproximadamente 2,4 µg/kg/día;
b) de aproximadamente 6 UE a aproximadamente 48 UE/kg/día; o
c) de aproximadamente 0,04 nmol a aproximadamente 0,34 nmol/kg/día.
- 10 2. La proteína neuregulina 1 para la utilización de la reivindicación 1, en donde dicha proteína neuregulina 1 es la isoforma β2 de neuregulina 1.
3. La proteína neuregulina 1 para la utilización de la reivindicación 1, en donde dicha proteína neuregulina 1 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ. ID. n°: 1.
4. La proteína neuregulina 1 para la utilización de la reivindicación 1, en donde dicha proteína neuregulina 1 consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ. ID. n°: 1.
- 15 5. La proteína neuregulina 1 para la utilización de la reivindicación 1, en donde dicha proteína neuregulina 1 se administra al mamífero por vía intravenosa.
6. La proteína neuregulina 1 para la utilización de la reivindicación 1, en donde dicha proteína neuregulina 1 se administra al mamífero durante uno o varios días.
- 20 7. La proteína neuregulina 1 para la utilización de la reivindicación 6, en donde dicha proteína neuregulina 1 se administra al mamífero durante al menos 10 días.
8. La proteína neuregulina 1 para la utilización de la reivindicación 7, en donde dicha proteína neuregulina 1 se administra al mamífero de 10 minutos a 12 horas al día.
9. La proteína neuregulina 1 para la utilización de la reivindicación 8, en donde dicha proteína neuregulina 1 se administra al mamífero 10 horas al día durante 10 días.
- 25 10. La proteína neuregulina 1 para la utilización de la reivindicación 1, en donde el mamífero tiene o se sospecha que tiene insuficiencia cardíaca.
11. La proteína neuregulina 1 para la utilización de la reivindicación 10, en donde la insuficiencia cardíaca es causada por uno o más factores isquémicos, congénitos, reumáticos, idiopáticos, víricos o tóxicos.
12. La proteína neuregulina 1 para la utilización de la reivindicación 1, en donde el mamífero es un ser humano.

30