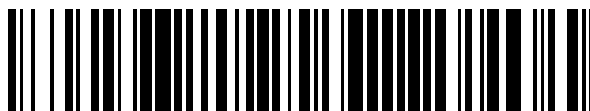


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 547**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.05.2003 PCT/CN2003/00355**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.12.2003 WO03099300**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.05.2003 E 03732172 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017 EP 1553960**

54 Título: **Métodos y composiciones basados en la neurregulina para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares**

30 Prioridad:

24.05.2002 WO PCT/CN02/00349

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

28.07.2017

73 Titular/es:

**ZENSUN (SHANGHAI) SCIENCE &
TECHNOLOGY, CO., LTD. (100.0%)
No. 68 Ju Li Road, Zhangjiang Hi-Tech Park,
Pudong
Shanghai 201203, CN**

72 Inventor/es:

ZHOU, MINGDONG

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 627 547 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 y composiciones basados en la neurregulina para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares

Campo de la técnica

La presente invención se refiere a composiciones y métodos para prevenir, tratar o retrasar diferentes enfermedades o trastornos cardiovasculares en los mamíferos, en particular en los humanos. Más en particular, la presente invención da a conocer composiciones y métodos para prevenir, tratar o retrasar diferentes enfermedades o trastornos cardiovasculares mediante el uso, entre otros, de una proteína, la neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, o un agente que potencia la producción y/o el funcionamiento de dicha neurregulina.

10 Antecedentes de la invención

La miocarditis vírica es la inflamación del músculo cardíaco ocasionada por, o asociada a, diferentes virus, lo que induce la exudación inflamatoria difusa o focal en el intersticio del miocardio y la degeneración, necrosis o lisis de la fibra muscular cardíaca. La miocarditis vírica se podría complicar por la pericarditis o la endocarditis. El desenlace de la miocarditis vírica incluye daño del miocardio, disfunción cardíaca, arritmia y síntomas sistémicos. La miocarditis vírica aparece a cualquier edad. En los últimos años, está aumentando la incidencia de la miocarditis vírica. Las secuelas de la miocarditis vírica aguda incluyen arritmia, insuficiencia cardíaca, choque cardíaco e incluso muerte súbita. La enfermedad se podría prolongar con hipertrofia cardíaca y lesión permanente del músculo cardíaco. La miocardiopatía finalmente se produce por una reacción inmunitaria. El tratamiento de la miocarditis vírica incluye antibióticos, cardioprotectores, antioxidantes, tales como dosis elevadas de vitamina C, vitamina E, coenzima Q10, nutrientes para el miocardio, tales como la combinación de energía para proporcionar una suficiente nutrición para el miocardio. Estas mediciones se aplican para mejorar el funcionamiento del corazón, reparar el daño cardíaco y prevenir la insuficiencia cardíaca, pero la eficacia no es tan ideal, sobre todo para los cambios estructurales y funcionales de la miocarditis. No existe ningún tratamiento fiable para estos cambios patológicos.

La miocardiopatía dilatada (congestiva) (MCPD) es el desenlace final de diferentes enfermedades del miocardio sin origen identificado. Sus cambios patológicos no son reumáticos, no son hipertensivos y no se deben a cardiopatía coronaria. Las principales características clínicas de la miocardiopatía dilatada es la hipertrofia ventricular, fallo funcional de la bomba del miocardio, o insuficiencia cardíaca congestiva. Se suele observar la hipertrofia del núcleo y de los orgánulos cuando hay daño leve del miocardio en presencia de miocardiopatía dilatada. El cambio estructural, la muerte celular y la fibrosis resultante se suele observar en el daño grave. La causa y la patogenia de la MCPD siguen sin estar claras. El pronóstico de la MCPD es muy malo porque no se dispone de ningún tratamiento eficaz. La mayoría de estos pacientes muere de una insuficiencia cardíaca que empeora continuamente. La muerte súbita podría deberse a la arritmia. En la actualidad, no hay ningún tratamiento eficaz ni específico de la MCPD. El tratamiento convencional de la MCPD incluye la administración de cardiotónicos, diuréticos, IACE y otros fármacos. Además, también se utilizan para tratar la MCPD antagonistas del calcio de tercera generación, tal como amlodipino, y antagonistas del receptor β de tercera generación, tal como el carvedilol. Hay controversia con respecto al efecto de la tiroxina y de la hormona del crecimiento porque no está disponible ninguna prueba de ensayo clínico con doble anonimato y aleatorizado. La cirugía de reducción de volumen del ventrículo izquierdo puede disminuir el diámetro interno del ventrículo izquierdo y mejorar durante un tiempo la función cardíaca. Sin embargo, la mortalidad más alta asociada a la insuficiencia cardíaca y la arritmia posoperatorias dificulta la aplicación de este método. La miocardioplastia dinámica es útil para mejorar la función cardíaca, pero el paciente no es capaz de tolerar el traumatismo relativamente extenso. Por lo tanto, esta operación se utiliza sólo como alternativa al trasplante de corazón. En la operación quirúrgica, el trasplante de corazón es el tratamiento radical para la MCPD. Sin embargo, los principales obstáculos son la ausencia de donante de corazón, el elevado coste, la infección posoperatoria y el rechazo del trasplante. Por lo tanto, se necesita con urgencia un nuevo tratamiento para la MCPD en la práctica clínica.

La doxorubicina o adriamicina (ADM) pertenece a los antineoplásicos de tipo antraciclina, con un amplio espectro y una potente actividad antitumoral. Se ha utilizado ampliamente en la práctica clínica para tratar diferentes tumores malignos, tales como cáncer de pulmón, cáncer de mama, carcinoma de vejiga, carcinoma de testículos, cáncer de tiroides, carcinoma de las partes blandas, osteosarcoma, neuroblastoma, leucemia aguda, linfoma maligno, carcinoma gástrico, cáncer de hígado, carcinoma de esófago y carcinoma de cuello uterino. La ADM actúa mediante su incorporación en el ADN para inhibir la síntesis del ADN. El efecto de la inhibición se observa en las fases S, M, G1 y G2, pero la actividad es más activa en la fase S. Se ha descubierto que una dosis más alta de los quimioterápicos produce una mejor eficacia clínica y una supervivencia más prolongada en unidades de tiempo para los pacientes con cáncer de mama, tanto si es metastásico o con quimioterapia posoperatoria. Otros estudios han confirmado la importancia de dosis y concentración de la dosis más altas, así como la relación entre la dosis, la concentración de la dosis y la eficacia.

Sin embargo, la aplicación de la ADM está limitada por la toxicidad de sus efectos secundarios. La toxicidad de la ADM incluye la depresión de la médula ósea. En aproximadamente el 60-80% de los pacientes, el número de leucocitos y plaquetas disminuye al nivel más bajo 10-15 días después de la administración, y se recuperan los

niveles normales 21 días después. La principal reacción del tubo digestivo son náuseas, vómitos, anorexia, gastritis e incluso úlcera y estomatitis. También se produce alopecia en casi todos los pacientes tratados con ADM, aunque este efecto se puede revertir después con la retirada.

- Aún más importante, el factor principal que impide la aplicación clínica de una dosis más alta de ADM y de otras antraciclinas es la cardiotoxicidad. La cardiotoxicidad de la ADM podría ser el resultado de la producción de radicales libres derivados del oxígeno. El grupo semiquinónico de la ADM puede inducir una reacción de oxidorreducción, lo que conduce a una mayor peroxidación de los lípidos, lo que contribuye al daño celular. Los radicales libres dañan la membrana de la célula y membrana de los orgánulos, y modifican el funcionamiento de las proteínas de la membrana y la actividad enzimática. Estos cambios pueden conducir a la sobrecarga de calcio intracelular, inhibición de la síntesis del ADN y de las proteínas, y trastornos del metabolismo energético, que inevitablemente dañan la contracción del corazón y el proceso de relajación.

- La cardiotoxicidad se produce cuando la ADM se acumula en el cuerpo, porque la afinidad de la ADM por el tejido cardíaco es más alta que por otros tejidos. Así pues, el corazón es más vulnerable al efecto tóxico de la ADM. La cardiotoxicidad puede ser aguda o crónica. Las características clínicas de la cardiotoxicidad aguda incluyen cambios funcionales del corazón, tales como taquicardia del seno, arritmia, bloqueo de la conducción, alteración del segmento ST-T, etc. En las primeras etapas del tratamiento con ADM podrían aparecer diferentes arritmias. La cardiotoxicidad aguda también puede incluir la disminución de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) así como disminuciones del volumen sistólico, gasto cardíaco e índice cardíaco. También se ha sugerido que la ADM inhibe la contracción y la capacidad de bombeo del ventrículo izquierdo. La cardiotoxicidad crónica incluye la insuficiencia cardíaca congestiva irreversible. Una vez que una persona padece una insuficiencia cardíaca congestiva, la mortalidad disminuye a aproximadamente del 30% al 50%. Debido a la cardiotoxicidad asociada a la ADM, algunos pacientes tienen que terminar el tratamiento con ADM o tienen que reducir la dosificación o la duración del tratamiento con la ADM, lo que afecta a la eficacia del tratamiento con la ADM.

- Se han realizado estudios para encontrar las maneras de reducir la toxicidad de la ADM, al mismo tiempo que se mantenga el efecto terapéutico. Determinadas medidas, tales como la disminución de la dosis total de ADM o la administración de nutrientes al miocardio, tales como una dosis alta de vitamina C, podrían ser útiles para proteger el miocardio. La transfusión regular de sangre y la administración de un quelante de hierro, tal como el ICRF-187, también tienen algún efecto protector del miocardio. Sin embargo, aunque estos agentes complementarios son beneficiosos para el músculo cardíaco, tienen poco efecto sobre la cardiotoxicidad inducida por la ADM. Así pues, en la técnica existe la necesidad de prevenir, tratar o retrasar la cardiotoxicidad de la ADM sin que se vea afectada su eficacia.

- La insuficiencia cardíaca tiene muy diversas causas, tales como la arterioesclerosis coronaria, hipertensión e inflamación inducida por lesión del miocardio, lo que conduce finalmente a la insuficiencia cardíaca insensible. Estos factores provocan cambios en la estructura y el funcionamiento de las células del miocardio, lo que finalmente conduce a una menor función de bombeo ventricular e insuficiencia cardíaca. La incidencia y la mortalidad de la insuficiencia cardíaca es muy alta en todo el mundo, por lo que es una de las enfermedades mortales más graves. En los Estados Unidos, del 30% al 40% de las insuficiencias cardíacas congestivas (ICC) anuales conducen a la hospitalización. La mortalidad a los 5 años del diagnóstico de la ICC es del 60% en los varones y del 45% en las mujeres. La duración media de la supervivencia es de 3,2 años en los varones y de 5,4 años en las mujeres, mientras que la tasa de supervivencia de los pacientes con una ICC en el estadio final es tan solo de aproximadamente el 20%.

- La neurregulina-1 (NRG-1), también denominada factor de diferenciación NEU (NDF) o factor del crecimiento glial (GGF), es un ligando de ErbB3 y ErbB4. El estudio con fetos de ratón con defectos en el gen de la neurregulina demuestra que la neurregulina es esencial para el desarrollo del corazón y del sistema nervioso. No obstante, hay pocos datos sobre el modo en el que la neurregulina controla la diferenciación celular y la transducción de señales vía abajo. En los primeros estadios del desarrollo del corazón, la neurregulina y el receptor ErbB se expresan en el revestimiento del endocardio y en los miocitos del corazón, respectivamente. Como estas dos capas están muy separadas, la neurregulina tiene que atravesar el espacio entre ambas capas antes de que pueda activar el receptor ErbB. La activación de los receptores ErbB en el cardiomiocito es útil para el cardiomiocito y su migración hasta el endocardio. La solicitud de patente internacional WO 00/37095 muestra que la neurregulina puede estimular la diferenciación de los miocitos del corazón, reforzar la combinación de la sarcómera y del citoesqueleto, así como la cohesión intercelular. La solicitud de patente internacional WO 00/37095 también muestra que la neurregulina se puede utilizar para detectar, diagnosticar y tratar las cardiopatías. La solicitud de patente internacional WO 00/37095 muestra además que la neurregulina y sus análogos pueden favorecer la diferenciación de los cardiomiocitos *in vitro*, inducir la reconstrucción de la sarcómera y del citoesqueleto en el cardiomiocito y la cohesión intercelular, identificar el polipéptido o el compuesto que puede inhibir la neurregulina. El polipéptido o el compuesto identificados se pueden utilizar para tratar las cardiopatías y la insuficiencia cardíaca. La solicitud de patente internacional WO 00/64400 describe la administración del rhGGF2 a los ratones con estenosis aórtica durante un periodo de tres semanas en la cantidad de 0,3 mg/kg, administrados en días alternos.

- En la técnica, existe una necesidad de tratamientos relacionados con la neurregulina más eficaces y más económicos contra la miocarditis vírica, la miocardiopatía dilatada, la cardiotoxicidad de un agente profiláctico o

terapéutico, p. ej., ADM, sin afectar a su eficacia contra el infarto de miocardio. La presente invención trata estas y otras necesidades relacionadas de la técnica.

Descripción de la invención

- La invención da a conocer una composición para uso en un método para prevenir, tratar o retrasar una enfermedad o trastorno cardiovascular en los mamíferos, en donde la composición comprende una proteína, la neurregulina, o un fragmento funcional de la misma que comprende un dominio de tipo factor de crecimiento epidérmico, o un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma que comprende un dominio de tipo factor de crecimiento epidérmico, y en donde dicho método comprende la administración de dicha proteína, la neurregulina, durante 21 días o menos de 21 días en una pauta posológica total igual o menor de 3600 U/kg.
- 5 Dentro del contexto de la invención, la referencia a la neurregulina en la especificación se debe entender como referencia a una proteína, la neurregulina, o un fragmento funcional de la misma que comprende un dominio de tipo factor del crecimiento epidérmico, o un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma.
- 10 Dentro del contexto de la invención, la referencia a un fragmento funcional de la neurregulina en la especificación se debe entender como referencia a un fragmento funcional de la neurregulina que comprende un dominio de tipo factor de crecimiento epidérmico.
- 15

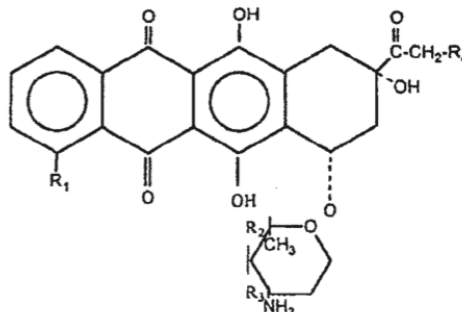
Tratamiento de la miocarditis vírica o de la miocardiopatía dilatada (congestiva) (MCPD)

- En un aspecto, la neurregulina es para uso en un método para prevenir, tratar o retrasar la miocarditis vírica o la miocardiopatía dilatada (congestiva) (MCPD) en un mamífero, en donde dicho método comprende administrar a un mamífero que necesita o al que se le desea tal prevención, tratamiento o retraso. Preferiblemente, se administra *in vivo* la proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, o un agente que potencia la producción y/o funcionamiento de dicha neurregulina.
- 20
- En otro aspecto, la neurregulina se administra en una combinación, en donde dicha combinación comprende una cantidad eficaz de una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, y una cantidad eficaz de un agente profiláctico o terapéutico contra la miocarditis vírica o contra la miocardiopatía dilatada (congestiva) (MCPD).
- 25
- Aún en otro aspecto, la neurregulina se presenta en una composición farmacéutica para prevenir, tratar o retrasar la miocarditis vírica o la miocardiopatía dilatada (congestiva) (MCPD) en un mamífero, en donde dicha composición farmacéutica comprende una cantidad eficaz de una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma.
- 30

Tratamiento de la cardiotoxicidad asociada a los agentes profilácticos o terapéuticos

- Es un objeto de la presente invención prevenir, tratar o retrasar la cardiotoxicidad asociada a los agentes profilácticos o terapéuticos. En particular, es un objeto de la presente invención prevenir, tratar o retrasar la cardiotoxicidad de la miocardiopatía inducida por fármacos.
- 35
- La presente invención da a conocer la neurregulina para uso en los métodos para prevenir, tratar o retrasar la cardiotoxicidad en un mamífero en el cual se necesita o al cual se le desea tal prevención, tratamiento o retraso, que comprende administrar a un mamífero *in vivo* una cantidad eficaz de un agente profiláctico o terapéutico y una cantidad eficaz de: (i) una proteína, la neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, o (ii) un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina o un fragmento funcional de la misma; mediante lo cual se impide, trata o retrasa la cardiotoxicidad asociada a la administración de dicho agente profiláctico o terapéutico.
- 40
- La presente invención se puede utilizar para prevenir, tratar o retrasar cualquier manifestación clínica de la cardiotoxicidad conocida por cualquier experto en la técnica, que incluye, pero sin limitarse a ellas, la cardiotoxicidad crónica o aguda. Por ejemplo, la presente invención se puede utilizar para prevenir, tratar o retrasar la taquicardia, arritmia e insuficiencia cardíaca congestiva. En una realización concreta, la presente invención se puede utilizar para prevenir, tratar o retrasar las manifestaciones clínicas de la cardiotoxicidad aguda, tales como la taquicardia del seno, arritmia, bloqueo de la conducción y alteración del segmento ST-T, así como disminuciones en la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI), volumen sistólico, gasto cardíaco o índice cardíaco. La presente invención también se puede utilizar para prevenir, tratar o retrasar la cardiotoxicidad que comprende la inhibición de la capacidad de bombear y contraer que tiene el ventrículo izquierdo.
- 50
- Los presentes métodos se pueden utilizar para prevenir, reducir o retrasar la cardiotoxicidad asociada a los agentes profilácticos o terapéuticos. En una realización, el agente profiláctico o terapéutico produce radicales libres derivados del oxígeno, lo que ocasiona la cardiotoxicidad. En otra realización, el agente profiláctico o terapéutico potencia la peroxidación de los lípidos, lo que ocasiona la cardiotoxicidad.

Los métodos presentes se pueden utilizar para prevenir, reducir o retrasar la cardiotoxicidad asociada a los antineoplásicos. El antineoplásico es preferiblemente una antraciclina. En una realización específica, el antineoplásico tiene la siguiente fórmula I:



5 en donde R1 es metoxi o hidrógeno; y R2, R3 y R4 son hidroxilo o hidrógeno.

Los ejemplos no limitantes de antraciclina para ser usadas en los métodos presentes incluyen adriamicina (o doxorubicina), daunorubicina, epirubicina, idarubicina, mitoxantrona, mitomicina, bleomicina, ciclofosfáida, fluorouracilo, actinomicina D y vincristina. En un aspecto, la presente invención hace referencia al uso de la neurregulina como un agente anticardiotóxico para prevenir, tratar o retrasar la cardiotoxicidad inducida por los quimioterápicos, tales como la adriamicina (ADM), en monoterapia o en politerapia con otro reactante.

Los presentes métodos se pueden utilizar para prevenir, reducir o retrasar la cardiotoxicidad asociada a los agentes antipsicóticos. El agente antipsicótico puede ser clorpromazina, perfenazina o trifluoperazina.

Los presentes métodos se pueden utilizar para prevenir, reducir o retrasar la cardiotoxicidad asociada a los antidepresivos tricíclicos. Los antidepresivos tricíclicos pueden ser clomipramina, amitriptilina o doxepina.

15 Los presentes métodos se pueden utilizar para prevenir, reducir o retrasar la cardiotoxicidad asociada al interferón, p. ej., interferón- α , o a la interleucina, p. ej., interleucina-2.

Los presentes métodos se pueden utilizar para prevenir, reducir o retrasar la cardiotoxicidad asociada a los agentes antiinfecciosos, p. ej., emetina.

20 La neurregulina como agente para uso en los presentes métodos puede ser neurregulina 1, neurregulina 2, neurregulina 3, o neurregulina 4. En una realización concreta, la neurregulina para uso en los presentes métodos es la neurregulina $\alpha 2$ o la neurregulina $\beta 2$. En otra realización, el fragmento de neurregulina es una neurregulina $\beta 2$ que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en la SEQ ID n.º 4.

La neurregulina como agente se puede administrar como una proteína o como un fragmento funcional de la misma. La neurregulina como agente también se puede administrar como un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina o un fragmento funcional de la misma. La neurregulina como agente se puede administrar sola o con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. La proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, se puede administrar antes, a la vez o después de la administración del agente profiláctico o terapéutico.

30 En una realización, el agente profiláctico o terapéutico se administra en una cantidad que es mayor que la cantidad máxima permitida cuando el agente profiláctico o terapéutico se administra en ausencia de la proteína neurregulina o un fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma.

En una realización concreta, la presente invención da a conocer la neurregulina para ser usada para prevenir, tratar o retrasar la cardiotoxicidad en un humano en el cual se necesita o al cual se le desea tal prevención, tratamiento o retraso. Preferiblemente, el humano tiene un tumor maligno, tal como cáncer de pulmón, cáncer de mama, carcinoma de vejiga, carcinoma de testículo, cáncer de tiroides, carcinoma de partes blandas, osteosarcoma, neuroblastoma, leucemia aguda, linfoma maligno, carcinoma gástrico, cáncer de hígado, carcinoma de esófago o carcinoma de cuello uterino.

Tratamiento del infarto de miocardio

40 En un aspecto, la neurregulina está presente en una combinación. en donde dicha combinación comprende una cantidad eficaz de una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, y una cantidad eficaz de un agente profiláctico o terapéutico contra el infarto de miocardio.

En otro aspecto, la presente invención hace referencia a un kit para uso de dicha combinación para prevenir, tratar o retrasar el infarto de miocardio, en donde dicho kit comprende una combinación descrita más arriba en un envase e instrucciones.

Aún en otro aspecto, la presente invención hace referencia a la neurregulina para uso en un método para prevenir, tratar o retrasar el infarto de miocardio en un mamífero, en donde dicho método comprende administrar a un mamífero, en el cual se necesita o al cual se le desea tal prevención, tratamiento o retraso, una cantidad eficaz de una proteína, la neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, por medio de lo cual se previene, se trata o se retrasa dicho infarto de miocardio.

10 Composiciones farmacéuticas

En un aspecto, la presente invención hace referencia a una composición farmacéutica para uso en un método para prevenir, tratar o retrasar una enfermedad cardiovascular en un mamífero, en donde dicha composición comprende una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, en una pauta posológica total igual o menor que 3600 U/kg. La neurregulina se podría suministrar en una dosis segura que es igual o menor que aproximadamente 170 U/kg.

Breve descripción de los dibujos

En la figura 1 se ilustra la construcción de una cepa bacteriana manipulada genéticamente para producir de manera recombinante una proteína, la neurregulina.

En la figura 2 se presenta la amplificación por PCR del gen de la neurregulina de humano. Carril 1: 183 pb del gen de la neurregulina obtenidas por RT-PCR; y los carriles 2 y 3: ADN marcadores.

En la figura 3 se representa el mapa físico del plásmido pET-22b.

En la figura 4 se representa la identificación del plásmido recombinante mediante digestión con endonucleasa. Carriles 1 y 3: ADN marcadores; y carril 2: fragmentos después de la digestión enzimática.

En la figura 5 se representa el cribado por expresión de una cepa manipulada genéticamente. Carril 1: marcador; carril 2: cepa manipulada genéticamente sin inducción; carril 3: 1 hora después de la inducción; carril 4: 2 horas después de la inducción; carril 5: 3 horas después de la inducción; carril 6: 4 horas después de la inducción; y carriles 7-9: diferentes cepas con inducción.

En la figura 6 se representa el corte histológico del tejido de miocardio de la rata del grupo de pseudooperación (I) (10 × 10), donde se muestra que no había ningún cambio histológico específico.

En la figura 7 se representa el área grande de la región teñida de rojo del grupo del modelo (10 × 10).

En la figura 8 se ilustra la distribución esporádica de las células del miocardio teñidas de rojo del grupo con rhNRG-1β (20 µg/kg) (I) (10 × 10).

En la figura 9 se ilustra la distribución desigual de las células del miocardio teñidas de rojo y el tejido conjuntivo del grupo con la dosis intermedia (10 µg/kg) de rhNRG-1β (I) (10 × 10).

En la figura 10 se ilustra la distribución desigual de las células del miocardio teñidas de rojo y el tejido conjuntivo del grupo con la dosis baja (5 µg/kg) de rhNRG-1β (I) (10 × 10).

En la figura 11 se representa el corte histológico del tejido del miocardio en el grupo de pseudooperación (II) (10 × 10), que muestra que no había cambios histológicos específicos del tejido del miocardio.

En la figura 12 se representa el área grande de la región teñida de rojo del grupo del modelo (II) (10 × 10).

En la figura 13 se representa la distribución esporádica de las células del miocardio teñidas de rojo del grupo con dosis altas de rhNRG-1β (20 µg/kg) (II) (10 × 10).

En la figura 14 se representa la distribución desigual de las células del miocardio teñidas de rojo y tejido fibroso visto en el grupo con el nivel de dosis intermedio de rhNRG-1β S177-Q237 (10 µg/kg) (II) (10 × 10).

En la figura 15 se representa la distribución desigual de las células del miocardio teñidas de rojo y tejido fibroso visto en el grupo con el nivel de dosis bajo de rhNRG-1β S177-Q237 (5 µg/kg) (II) (10 × 10).

En la figura 16 se ilustra el efecto de la rhNRG-1β sobre la regeneración capilar en el área fibrótica del miocardio del animal modelo (I) (tinción con HE, 50×); A: grupo de pseudooperación: estructura normal del miocardio, con cambios fibróticos; B: grupo de animales modelo: se observó fibrosis notable del miocardio y poca proliferación capilar; C: grupo con 20 µg/kg de rhNRG-1β; cambios fibróticos desiguales en el miocardio, proliferación capilar significativa; D: grupo con 10 µg/kg de rhNRG-1β: cambios fibróticos notables con proliferación de un número relativamente grande

de capilares; y E: grupo con 5 µg/kg de rhNRG-1β: se pudieron observar cambios fibróticos desiguales y proliferación capilar.

En la figura 17 se ilustra el efecto de la rhNRG-1β sobre la proliferación capilar en el área fibrótica del miocardio del animal modelo (II) (tinción con HE, 50×); A: grupo de pseudooperación: estructura normal del miocardio, con cambios fibróticos; B: grupo de animales modelo: se observaron cambios fibróticos notables del miocardio y proliferación de pocos capilares; C: grupo con 20 µg/kg de rhNRG-1β: cambios fibróticos desiguales en el miocardio, proliferación capilar significativa; D: grupo con 10 µg/kg de rhNRG-1β: cambios fibróticos notables, proliferación de un número relativamente grande de capilares; y E: grupo con 5 µg/kg de rhNRG-1β: se pudieron observar cambios fibróticos desiguales, con proliferación capilar.

- 10 En la figura 18 se ilustra el corte histológico del miocardio de la miocarditis tóxica de una rata Sprague Dawley® inducida con adriamicina; a, grupo de control normal: la puntuación patológica del miocardio era de 0, sin atrofia ni hipertrofia de las células del miocardio, con formación de vacuolas, se pudieron observar con claridad las estrías transversales; miocardio organizado de forma regular; ninguna anomalía en el endocardio ni en el pericardio; ningún cambio de los vasos ni del tejido intersticial; b: grupo de animales modelo: la puntuación patológica del miocardio era de 3, área grande de necrosis y disolución celular del miocardio.

En la figura 19 se ilustra el efecto de la rhNRG-1β sobre la tasa de supervivencia de los animales modelo.

En la figura 20 se ilustra el efecto de la rhNRG-1β sobre la estructura del miocardio de los animales modelo.

- 20 En la figura 21 se ilustra el efecto de la rhNRG-1β S177-Q237 sobre el daño histológico del miocardio en los ratones infectados con virus (I); A: grupo normal; B: grupo del modelo, C: grupo de control con placebo; D: grupo de nivel de dosis alto; E: grupo de nivel de dosis intermedio; y F: grupo de nivel de dosis bajo.

En la figura 22 se ilustra el efecto de la rhNRG-1β S177-Q237 sobre el daño histológico del miocardio en los ratones infectados con virus; A: grupo normal; B: grupo del modelo; C: grupo de control con placebo; D: grupo de nivel de dosis alto; E: grupo de nivel de dosis intermedio; y F: grupo del nivel de dosis bajo.

- 25 En la figura 23 se ilustra el efecto de la rhNRG-1β S177-Q237 administrada durante un número diferente de días sobre los cambios histológicos del miocardio en los ratones infectados con virus (I) (teñido con HE, 40×); A: grupo de control normal; B: grupo del modelo; C: rhNRG-1β S177-Q237 del grupo durante 3 días; D: rhNRG-1β S177-Q237 del grupo durante 5 días; y E: rhNRG-1β S177-Q237 del grupo durante 7 días.

- 30 En la figura 24 se ilustra el efecto de la rhNRG-1β administrada durante un número diferente de días sobre los cambios histológicos del miocardio en los ratones infectados con virus (II) (teñido con HE, 40×); A: grupo de control normal; B: grupo del modelo; C: rhNRG-1β S177-Q237 del grupo durante 3 días; D: rhNRG-1β del grupo durante 5 días; y E: rhNRG-1β S177-Q237 del grupo durante 7 días.

Modos de llevar a cabo la invención

Para dejar más clara la descripción, y no a modo de limitación, la descripción detallada de la invención se divide en los subapartados que vienen a continuación.

35 A. Definiciones

- A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende corrientemente cualquier experto en la técnica a la cual pertenece la invención. Si una definición presentada en este apartado es contraria, o bien incongruente, con una definición presentada en las patentes, solicitudes, publicaciones y otras publicaciones a las que se hace referencia en la presente memoria, la definición presentada en este apartado prevalece sobre la definición a la que se hizo referencia.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, «uno» o «una» significa «al menos uno/a» o «uno/a o varios/as».

- 45 Tal y como se utiliza en la presente memoria, «neurregulina» hace referencia a proteínas o péptidos que pueden activar las proteína cinasas heterodiméricas Erb2/Erb4 o ErbB2/ErbB3, tal y como todas las isoformas de neurregulina, solo el dominio EGF de la neurregulina, los mutantes de la neurregulina, y cualquier clase de productos génicos de tipo neurregulina que también activan los receptores anteriores. Un fragmento de neurregulina de ejemplo es un fragmento polipeptídico del isómero β2 de la neurregulina de humano, que contiene el dominio de fijación al receptor, a saber, el dominio de tipo EGF. Este polipéptido puede activar el receptor ErbB de la familia de receptores de EGF y puede modular sus reacciones biológicas, p. ej., estimular la diferenciación de las células del cáncer de mama y la secreción de las proteínas de la leche; inducir la diferenciación de las células de la cresta neural en células de Schwann; estimular la síntesis de acetilcolina en las células del músculo esquelético; y mejorar la supervivencia de los cardiomiocitos y la síntesis del ADN. La neurregulina también incluye las variantes con sustituciones conservativas de aminoácidos que no alteran sustancialmente su actividad contra la miocarditis vírica, anti-MCPD, anticardiotóxica o contra el infarto de miocardio. Las sustituciones conservativas idóneas de los

aminoácidos son conocidas por los expertos en esta técnica y se podrían realizar por lo general sin alterar la actividad biológica de la molécula resultante. Los expertos en esta técnica reconocen que, en general, las sustituciones de un único aminoácido en las regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (véase, p. ej., Watson et al., *Molecular Biology of the Gene*, 4.^a edición, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co., pág., 224). La proteína neurregulina abarca una proteína y un péptido de la neurregulina. El ácido nucleico de la neurregulina abarca el ácido nucleico de la neurregulina y oligonucleótidos de la neurregulina.

10 Tal y como se utiliza en la presente memoria, «dominio de tipo factor del crecimiento epidérmico» o «dominio de tipo EGF» hace referencia a un motivo polipeptídico codificado por el gen de la neurregulina que se fija y activa a ErbB2, ErbB3, ErbB4 o combinaciones de las mismas, y es estructuralmente similar al dominio de fijación al receptor del EGF, tal y como está descrito en la solicitud de patente internacional WO 00/64400, Holmes et al, *Science*, 256: 1205-1210 (1992); patentes de los EE. UU. 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 la solicitud de patente internacional WO 97/09425.

15 Tal y como se utiliza en la presente memoria, un «fragmento o derivado funcional» de la neurregulina hace referencia a un derivado o fragmento de la proteína neurregulina o de su ácido nucleico codificante que aún conserva sustancialmente su actividad contra la miocarditis vírica, anti-MCPD, anticardiotóxica o contra el infarto de miocardio. Normalmente, el derivado o fragmento conserva al menos el 50% de su actividad contra la miocarditis vírica, anti-MCPD, anticardiotóxica o contra el infarto de miocardio. Preferiblemente, el derivado o fragmento
20 conserva al menos el 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% y 100% de su actividad contra la miocarditis vírica, anti-MCPD, anticardiotóxica o contra el infarto de miocardio.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, un «agente que estimula la producción de neurregulina» hace referencia a una sustancia que incrementa la transcripción y/o traducción de un gen de neurregulina, o a una sustancia que incrementa la modificación postraducciona y/o el tráfico celular de un precursor de la neurregulina, o
25 a una sustancia que prolonga la semivida de una proteína neurregulina.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, un «agente que potencia el funcionamiento de la neurregulina» hace referencia a una sustancia que incrementa, de la neurregulina, la potencia de su actividad contra la miocarditis vírica, su actividad anti-MCPD, su actividad anticardiotóxica o su actividad contra el infarto de miocardio, o a una sustancia que incrementa la sensibilidad de un ligando natural de la neurregulina en una actividad contra la miocarditis vírica, anti-MCPD, anticardiotóxica, o contra la vía de señalización del infarto de miocardio, o a una sustancia que
30 disminuye la potencia de un antagonista de la neurregulina. Tal agente no es una proteína neurregulina ni su ácido nucleico codificante.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, una «combinación» o «politerapia» hace referencia a cualquier asociación entre dos o entre varios elementos.

35 Tal y como se utiliza en la presente memoria, una «composición» hace referencia a cualquier mezcla de dos o varios productos o compuestos. Podría ser una solución, una suspensión, líquido, polvo, una pasta, acuosa, no acuosa o cualquier combinación de los mismos.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, «erb» hace referencia a dos oncogenes, erbA y erbB, asociados al virus de la eritroblastosis (un retrovirus transformante agudo).

40 Tal y como se utiliza en la presente memoria, «una cantidad eficaz de un compuesto para tratar una enfermedad concreta» es una cantidad que es suficiente para mejorar, o de alguna manera reducir, los síntomas asociados a la enfermedad. Tal cantidad se podría administrar como una dosis única o se podría administrar de acuerdo con una pauta posológica, mediante lo cual resulta eficaz. La cantidad podría curar la enfermedad, pero, típicamente, se administra para mejorar los síntomas de la enfermedad. La administración repetida podría ser necesaria para
45 conseguir la mejoría deseada de los síntomas.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, «insuficiencia cardíaca» significa una anomalía de la función cardíaca, en la que el corazón no bombea la sangre a la velocidad necesaria para las necesidades de los tejidos metabolizadores. La insuficiencia cardíaca incluye un amplio margen de estados patológicos, tales como la insuficiencia cardíaca congestiva, el infarto de miocardio, taquiarritmia, miocardiopatía hipertrófica familiar, cardiopatía isquémica, miocardiopatía dilatada idiopática, y miocarditis. La insuficiencia cardíaca puede estar
50 ocasionada por muchos factores, entre ellos las formas isquémica, congénita, reumática o idiopática. La hipertrofia cardíaca crónica es un estado significativamente patológico que es precursor de la insuficiencia cardíaca congestiva y del paro cardíaco.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, «producción por medios recombinantes» hace referencia a los
55 métodos de producción que utilizan métodos con ácidos nucleicos recombinantes que se basan en métodos bien conocidos de la biología molecular para expresar las proteínas codificadas por los ácidos nucleicos clonados.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, «complementario», cuando hace referencia a dos moléculas de ácido

nucleico, significa que las dos secuencias de nucleótidos son capaces de hibridarse, preferiblemente con menos del 25%, más preferiblemente con menos del 15%, incluso más preferiblemente con menos del 5%, lo más preferiblemente sin ninguna, discordancia entre los nucleótidos confrontados. Preferiblemente, las dos moléculas se hibridarán en las condiciones muy rigurosas.

- 5 Tal y como se utiliza en la presente memoria: «rigor de la hibridación» a la hora de determinar el porcentaje de discordancia es como sigue:

- 1) rigor alto: SSPE a 0,1×, SDS al 0,1%, 65 °C;
- 2) rigor medio: SSPE a 0,2×, SDS al 0,1%, 50 °C (también se denomina rigor moderado); y
- 3) rigor bajo: SSPE a 1,0×, SDS al 0,1%, 50 °C.

- 10 Se entiende que se podrían conseguir rigores equivalentes con el uso de tampones, sales y temperaturas alternativos.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, «vector (o plásmido)» hace referencia a elementos independientes que se utilizan para introducir ADN heterólogo en las células para la expresión o bien para replicación del mismo. La selección y uso de tales vehículos los conoce bien el experto en la técnica. Un vector de expresión incluye los
 15 vectores capaces de expresar los ADN que están unidos operativamente a las secuencias reguladoras, tales como regiones promotoras, que son capaces de alterar la expresión de tales fragmentos de ADN. Así pues, un vector de expresión hace referencia a una construcción de ADN o ARN recombinante, tal como un plásmido, un fago, virus recombinante u otro vector que, tras la introducción en una célula hospedadora adecuada, da lugar a la expresión del ADN clonado. Los vectores de expresión adecuados los conocen bien los expertos en la técnica e incluyen los
 20 que son replicables en las células eucarióticas y/o en las células procariotas, y los que permanecen episómicos o los que se integran en el genoma de la célula hospedadora.

- Tal y como se utiliza en la presente memoria, «región promotora o elemento promotor» hace referencia a un segmento de ADN o de ARN que controla la transcripción del ADN o del ARN al cual está operativamente unido. La región promotora incluye secuencias específicas que son suficientes para el reconocimiento, fijación e inicio de la
 25 transcripción de la ARN polimerasa. Esta porción de la región promotora recibe el nombre de promotor. Además, la región promotora incluye secuencias que modulan este reconocimiento, fijación y actividad de inicio de la transcripción de la ARN polimerasa. Estas secuencias podrían actuar en *cis* o podrían responder a los factores que actúan en *trans*. Los promotores, según la naturaleza de la regulación, pueden ser constitutivos o estar regulados. Los promotores de ejemplo contemplados para ser usados en los procariotas incluyen los promotores de los
 30 bacteriófagos T7 y T3, y similares.

- Tal y como se utiliza en la presente memoria, «unido operativamente u operativamente asociado» hace referencia a la relación funcional del ADN con las secuencias reguladoras y efectoras de los nucleótidos, tales como promotores, potenciadores, sitios de parada transcripcional y traduccional, u otras secuencias señalizadoras. Por ejemplo, la unión operativa del ADN a un promotor hace referencia a la relación física y funcional entre el ADN y el promotor, de
 35 tal manera que la transcripción de tal ADN se inicia desde el promotor mediante una ARN polimerasa que, de forma específica, reconoce el ADN, se une a él y lo transcribe. Para optimizar la transcripción y/o la expresión *in vitro*, podría ser necesario retirar, añadir o alterar las porciones sin traducir en 5' de los clones para eliminar los posibles codones de inicio de la traducción alternativos inadecuados o adicionales, u otras secuencias que podrían interferir o reducir la expresión, tanto a nivel de transcripción como de traducción. Como alternativa, el consenso de los sitios de
 40 fijación del ribosoma (véase, p. ej., Kozak, *J. Biol. Chem.*, 266, 19867-19870 (1991)) se puede insertar inmediatamente en 5' del codón de inicio y podría mejorar la expresión. La deseabilidad (o necesidad) de tal modificación se podría determinar de manera empírica.

- Tal y como se utiliza en la presente memoria, «mejoría» de los síntomas de un trastorno concreto mediante la administración de una composición farmacéutica concreta hace referencia a cualquier atenuación, bien sea
 45 permanente o temporal, duradera o transitoria que se puede atribuir o relacionar con la administración de la composición.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, «un agente terapéutico» hace referencia a cualquier fármaco convencional o tratamientos farmacológicos que conocen los expertos en la técnica, que incluyen, pero sin limitarse a ellos, agentes profilácticos o quimioterápicos.

- 50 Tal y como se utiliza en la presente memoria, «cantidad terapéuticamente eficaz» hace referencia a la cantidad que es suficiente para mejorar, o de alguna manera reducir, los síntomas asociados a la enfermedad. Tal cantidad se podría administrar como una dosis única o de acuerdo con una pauta posológica. La administración repetida podría ser necesaria para conseguir la mejoría deseada de los síntomas.

- Tal y como se utiliza en la presente memoria, «administración» o «administrar» un compuesto hace referencia a
 55 cualquier método idóneo para suministrar un compuesto a un sujeto.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, «tratamiento» o «tratar» hace referencia a cualquier manera en la que los síntomas de una afección, trastorno o enfermedad se mejoran, o, si no, se alteran de manera beneficiosa. El tratamiento también abarca cualquier uso farmacéutico de las composiciones de la presente memoria. La mejoría de los síntomas de un trastorno concreto hace referencia a cualquier atenuación de los síntomas, tanto permanente

5 como temporal, que se puede atribuir o asociar a la administración de la composición.

Tal y como se utiliza en la presente memoria, «neoplasia» hace referencia al nuevo crecimiento anormal o al crecimiento tumoral, que podría ser benigno o maligno. A diferencia de la hiperplasia, la proliferación neoplásica persiste incluso en ausencia de los estímulos originales.

10 Tal y como se utiliza en la presente memoria, «un agente antineoplásico» hace referencia a cualquier agente utilizado para prevenir la aparición o reducir la gravedad de la neoplasia, tumor o cáncer. Estos incluyen, pero sin limitación, agentes antiangiogénicos, alquilantes, antimetabolitos, productos naturales, complejos de coordinación del platino, antracenediona, urea sustituida, derivados de la metilhidrazina, supresores corticosuprarrenales, hormonas, antagonistas, inhibidores de los oncogenes, genes o proteínas supresores de los tumores, anticuerpos contra oncogenes, u oligonucleótidos antisentido contra oncogenes.

15 Tal y como se utiliza en la presente memoria, «agente antipsicótico» hace referencia a cualquier agente utilizado para el tratamiento de los trastornos psiquiátricos. Estos incluyen, pero sin limitarse a ellos, fenotiazinas tricíclicas, tioxantenos y dibenzepinas, así como butirofenonas y congéneres, otros heterocíclicos, y benzamidas experimentales.

20 Tal y como se utiliza en la presente memoria, «antidepresivos tricíclicos» hace referencia a cualquier agente utilizado para el tratamiento de la depresión. Estos incluyen, pero sin limitarse a ellos, agentes que inhiben la captación de la noradrenalina y de la serotonina en las terminaciones nerviosas, y así acaban por facilitar de manera prolongada la función noradrenérgica del cerebro.

25 Tal y como se utiliza en la presente memoria, «agente antiinfeccioso» hace referencia a cualquier agente utilizado para el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Estas incluyen, pero sin limitarse a ellas, agentes para utilizar contra las infecciones parasitarias, bacterianas y microbianas

Tal y como se utiliza en la presente memoria, «dosis segura o inocua» hace referencia a una dosis suficiente para prevenir, tratar o retrasar una enfermedad en un mamífero sin inducir efectos tóxicos intolerables u otros efectos secundarios en dicho mamífero.

30 Tal y como se utiliza en la presente memoria, «infarto de miocardio» hace referencia al bloqueo de la arteria coronaria, con interrupción del torrente circulatorio, lo que conduce a la necrosis focal de parte del miocardio ocasionada por la isquemia intensa y persistente.

B. Métodos para prevenir, tratar o retrasar la miocarditis vírica o la MCPD

35 En un aspecto, la presente invención se refiere al uso de la neurregulina en un método para prevenir, tratar o retrasar la miocarditis vírica o la miocardiopatía dilatada (o congestiva) (MCPD) en un mamífero, en donde dicho método comprende administrar a un mamífero, para el cual se necesita o al cual se le desea tal prevención, tratamiento o retraso, una cantidad eficaz de una proteína, la neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, mediante lo cual se impide, trata o retrasa dicha miocarditis vírica o MCPD.

40 El presente método se puede utilizar para prevenir, tratar o retrasar la miocarditis vírica o la MCPD en cualquier mamífero, tal como ratones, ratas, conejos, gatos, perros, cerdos, vacas, bues, ovejas, cabras, caballos, monos u otros primates no humanos. Preferiblemente, el presente método se utiliza para prevenir, tratar o retrasar la miocarditis vírica o la MCPD en los humanos.

45 Se puede utilizar en los presentes métodos cualquier proteína neurregulina idónea, o fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma. En una realización específica, la neurregulina utilizada en los presentes métodos lleva a cabo su actividad contra la miocarditis vírica o actividad anti-MCPD a través de la fijación a los receptores ErbB2-ErbB4. En otra realización específica, se utiliza la neurregulina 1, la neurregulina 2, la neurregulina 3 o la neurregulina 4 en los presentes métodos. Los sinónimos de la neurregulina 1 incluyen herregulina, GGF2 y ligando p185erbB2. Véase, p. ej., la solicitud de patente internacional WO 00/64400 y las patentes de los EE. UU. n.^{os} 5.530.109 y 5.716.930. Tanto la neurregulina $\alpha 2$ como la neurregulina $\beta 2$ se pueden utilizar en los presentes métodos. Preferiblemente, en los

50 presentes métodos se utiliza un fragmento de la neurregulina $\beta 2$ que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en la SEQ ID n.^o 4.

Aún en otras realizaciones específicas, las neurregulinas o los fragmentos funcionales de las mismas que se describen en las siguientes patentes, solicitudes de patentes y bases de datos de GenBank se pueden utilizar en los

55 presentes métodos: patentes de los EE. UU. n.^{os} 6.252.051 y 6.121.415 (NRG3); 6.087.323 (neurregulina con actividad de fijación p185^{erbB2}, p185^{erbB3} o p185^{erbB4}); 6.033.906 (neurregulina como un ligando para un receptor

- seleccionado del grupo que consiste en p185^{erbB2} y p180^{erbB4}); US2002002276 (las adhesinas heteromultiméricas y quiméricas de ErbB como antagonistas competitivas o agonistas de una neurregulina); WO 01/81540 (NRG-4); WO 01/64877 (NRG1); WO 01/64876 (NRG1AG1); WO 01/58948 (neurregulina β), WO 01/26607 (isoformas de variantes de ajuste de la neurregulina SMDF y GGF); WO 00/70322 (CRD-neurregulina); WO 00/64400; WO 99/18976; WO 98/02540 (adhesinas heteromultiméricas y quiméricas de ErbB como antagonistas competitivas o agonistas de una neurregulina); WO 96/30403; WO 96/15812; BC 017568 (*Homo sapiens*, similar a la neurregulina 4); BC007675 (*Homo sapiens*, neurregulina 1); AF142632 (dominio rico en cisteínas de la neurregulina 1 de *Xenopus laevis*); AF194439 (neurregulina α 2a SMDF de *Rattus norvegicus* (Nrg1)) AF194438 (neurregulina β 1a SMDF de *Rattus norvegicus* (Nrg1)); HS2NRG12 (neurregulina 2 ajustada alternativamente de *Homo sapiens* (NRG2)); HS2NRG08 (neurregulina 2 ajustada alternativamente de *Homo sapiens* (NRG2)); HS2NRG07 (neurregulina 2 ajustada alternativamente de *Homo sapiens* (NRG2)); AF083067 (isoforma corta de la neurregulina 4 de *Mus musculus* (Nrg4)); AF076618 (neurregulina α 1 de *Xenopus laevis*); AF045656 (neurregulina β -2b de *Gallus gallus*); AF045655 (neurregulina β -2a de *Gallus gallus*); AF045654 (neurregulina β -1a de *Gallus gallus*); MAU96612 (neurregulina de *Mesocricetus auratus*); AF010130 (neurregulina-3 de *Mus musculus* (NRG3)). Preferiblemente, en los presentes métodos se utilizan las neurregulinas descritas en el GenBank con n.º de acceso NT_007995 (gi:18570363).

- Cualquier miocarditis vírica se puede prevenir, tratar o retrasar con los presentes métodos. Por ejemplo, la miocarditis vírica ocasionada por, o asociada a, la infección de un virus *Coxsackie* del grupo A, virus *Coxsackie* del grupo B, virus ECHO o virus de la poliomielitis, se puede prevenir, tratar o retrasar con los presentes métodos. Preferiblemente, la miocarditis vírica ocasionada por, o asociada a, la infección de un virus *Coxsackie* del grupo B se previene, trata o retrasa con los presentes métodos.

- La miocarditis vírica con diferentes características clínicas se puede prevenir, tratar o retrasar con los presentes métodos. Por ejemplo, la miocarditis vírica que se complica por pericarditis o endocarditis se puede prevenir, tratar o retrasar con los presentes métodos. En otro ejemplo, la miocarditis vírica con características clínicas de daño del miocardio, disfunción cardíaca, arritmia, síntoma sistémico o miocardiopatía se puede prevenir, tratar o retrasar con los presentes métodos. La miocarditis vírica aguda, así como la crónica, se pueden prevenir, tratar o retrasar con los presentes métodos. Preferiblemente, la miocarditis vírica aguda que tiene arritmia, insuficiencia cardíaca o choque cardíaco se puede prevenir, tratar o retrasar con los presentes métodos. La miocarditis vírica que se prolonga con la hipertrofia cardíaca y/o la lesión del músculo cardíaco permanente también se podría prevenir, tratar o retrasar con los presentes métodos.

- La MCPD con diferentes características clínicas se puede prevenir, tratar o retrasar con los presentes métodos. Por ejemplo, la MCPD que tiene hipertrofia ventricular, fallo del funcionamiento de la bomba del miocardio o insuficiencia cardíaca congestiva, se puede prevenir, tratar o retrasar con los presentes métodos.

- Se puede administrar en monoterapia la proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma. Como alternativa, la proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, se puede administrar con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

- La proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, se puede administrar *in vivo*, a saber, administrarse directamente a un mamífero. Como alternativa, la proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, se puede administrar *ex vivo*, a saber, administrarse a una o varias células, tejidos u órganos, y tales una o varias células, tejidos u órganos que llevan la proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, se puede transferir a un mamífero.

- En una realización específica, se administra una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma. En otra realización específica, se administra un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma.

- Se puede utilizar únicamente la proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma. Como alternativa, la proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, se puede utilizar en combinación con un agente profiláctico o terapéutico contra la miocarditis vírica o la MCPD. La proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, se puede administrar antes, a la vez o después de la administración del agente profiláctico o terapéutico contra la miocarditis vírica o la MCPD.

- En los presentes métodos se puede utilizar cualquier agente profiláctico o terapéutico idóneo contra la miocarditis vírica. Por ejemplo, el agente profiláctico o terapéutico contra la miocarditis vírica puede ser un antibiótico, p. ej., penicilina, un cardioprotector, p. ej., taurina, un antioxidante, p. ej., vitamina C, vitamina E y coenzima Q10, y un nutriente para el miocardio, p. ej., una combinación energética.

En los presentes métodos se puede utilizar cualquier agente profiláctico o terapéutico idóneo contra la MCPD. Por

ejemplo, el agente profiláctico o terapéutico contra la MCPD puede ser un cardiotónico, p. ej., digoxina y Cedilanid, un diurético (Goodman y Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (9.^a Ed.), McGraw-Hill (1996), págs. 683-713), p. ej., un inhibidor de la anhidrasa carbónica, un diurético osmótico, un inhibidor del simporte de $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$, un inhibidor del simporte de $\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$, un inhibidor de los canales de Na^+ del epitelio renal y un antagonista de los receptores de mineralocorticoides, inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina I (IECA), un antagonista del calcio, p. ej., amlodipino, y un antagonista del receptor β , p. ej., carvedilol.

C. Composiciones farmacéuticas, kits y combinaciones para prevenir, tratar o retrasar la miocarditis vírica o la MCPD

En otro aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica para uso en un método para prevenir, tratar o retrasar la miocarditis vírica o la miocardiopatía dilatada (o congestiva) (MCPD) en un mamífero, cuya composición farmacéutica comprende una cantidad eficaz de una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma.

En las presentes composiciones farmacéuticas se puede utilizar cualquier proteína neurregulina idónea, o un fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, que incluye las descritas en el apartado B más arriba. En una realización específica, la neurregulina utilizada en las presentes composiciones farmacéuticas lleva a cabo su actividad contra la miocarditis vírica o anti-MCPD a través de la fijación a los receptores ErbB2-ErbB4. En otra realización específica, en las presentes composiciones farmacéuticas se utiliza la neurregulina 1, la neurregulina 2, la neurregulina 3 o la neurregulina 4. Los sinónimos de la neurregulina 1 incluyen la herregulina, GGF2 y el ligando p185erbB2. Véase, p. ej., la solicitud de patente internacional WO 00/64400 y las patentes de los EE. UU. n.ºs 5.530.109 y 5.716.930. La neurregulina $\alpha 2$ y la neurregulina $\beta 2$ se pueden utilizar ambas en las presentes composiciones farmacéuticas. Preferiblemente, en las presentes composiciones farmacéuticas se utiliza un fragmento de la neurregulina $\beta 2$ que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en la SEQ ID n.º 4.

La proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, se puede utilizar en cualquiera de los márgenes de dosis idóneos. Por ejemplo, la proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, puede tener un margen de dosis desde unos 25 μg a unos 2.500 μg .

Aún en otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit para ser usado para prevenir, tratar o retrasar la miocarditis vírica o la MCPD, en donde dicho kit comprende la composición farmacéutica de más arriba en un envase e instrucciones para utilizar dicha composición farmacéutica para prevenir, tratar o retrasar la miocarditis vírica o la MCPD.

Aún en otro aspecto, la neurregulina está presente en una combinación, en donde dicha combinación comprende una cantidad eficaz de una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, y una cantidad eficaz de un agente profiláctico o terapéutico contra la miocarditis vírica o la miocardiopatía dilatada (o congestiva) (MCPD).

En las presentes combinaciones se pueden utilizar cualquier proteína neurregulina idónea, o un fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, que incluye las descritas en el apartado B anterior. En una realización específica, la neurregulina utilizada en las presentes combinaciones lleva a cabo su actividad contra la miocarditis vírica o anti-MCPD a través de la fijación a los receptores ErbB2-ErbB4. En otra realización específica, la neurregulina 1, la neurregulina 2, la neurregulina 3 o la neurregulina 4 se utiliza en las presentes combinaciones. Los sinónimos de la neurregulina 1 incluyen herregulina, GGF2 y el ligando p185erbB2. Véase, p. ej., la solicitud de patente internacional WO 00/64400 y las patentes de los EE. UU. n.ºs 5.530.109 y 5.716.930. Tanto la neurregulina $\alpha 2$ como la neurregulina $\beta 2$ se pueden utilizar en las presentes combinaciones. Preferiblemente, en las presentes combinaciones se utiliza un fragmento de la neurregulina $\beta 2$ que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en la SEQ ID n.º 1.

En las presentes combinaciones se puede utilizar cualquier agente profiláctico o terapéutico idóneo contra la miocarditis vírica, que incluye los descritos en el apartado B anterior. Por ejemplo, el agente profiláctico o terapéutico contra la miocarditis vírica puede ser un antibiótico, p. ej., penicilina, un cardioprotector, p. ej., taurina, un antioxidante, p. ej., vitamina C, vitamina E y coenzima Q10, y un nutriente para el miocardio, p. ej., una combinación energética.

En las presentes combinaciones se puede utilizar cualquier agente profiláctico o terapéutico idóneo contra la MCPD, que incluye los descritos en el apartado B anterior. Por ejemplo, el agente profiláctico o terapéutico contra la MCPD puede ser un cardiotónico, p. ej., digoxina y Cedilanid, un diurético, p. ej., un inhibidor de la anhidrasa carbónica, un diurético osmótico, un inhibidor del simporte de $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$, un inhibidor del simporte de $\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$, un inhibidor de los canales de Na^+ del epitelio renal y un antagonista de los receptores de mineralocorticoides, inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina I (IECA), un antagonista del calcio, p. ej., amlodipino, y un antagonista del receptor β , p. ej., carvedilol.

Aún en otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit para ser usado para prevenir, tratar o retrasar la

miocarditis vírica o la MCPD, en donde dicho kit comprende la combinación anterior en un envase e instrucciones para utilizar dicha combinación para prevenir, tratar o retrasar la miocarditis vírica o la MCPD.

D. Métodos para prevenir, tratar o retrasar la cardiotoxicidad

Se ha hallado que la neurregulina potencia la diferenciación de los cardiomiocitos y refuerza la combinación de la sarcómera y el citoesqueleto, así como la cohesión intercelular (solicitud de patente internacional WO 00/37095). La neurregulina también se puede utilizar para detectar, diagnosticar y tratar las cardiopatías. En la presente invención, la neurregulina se utiliza como un agente protector de cardiomiocitos para prevenir, tratar o retrasar la cardiotoxicidad debida a otros agentes profilácticos o terapéuticos.

- En un aspecto, la presente invención se refiere a una neurregulina para uso en un método para prevenir, tratar o retrasar la cardiotoxicidad en un mamífero en el cual se necesita o al que se le desea tal prevención, tratamiento o retraso, que comprende administrar a un mamífero *in vivo* una cantidad eficaz de un agente profiláctico o terapéutico y una cantidad eficaz de: (i) una proteína neurregulina o un fragmento funcional de la misma; o (ii) un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina o un fragmento funcional de la misma; mediante lo cual se previene, trata o retrasa la cardiotoxicidad asociada a la administración de dicho agente profiláctico o terapéutico. El presente método se puede utilizar para prevenir, tratar o retrasar la cardiotoxicidad en cualquier mamífero, tales como ratones, ratas, conejos, gatos, perros, cerdos, vacas, bueyes, ovejas, cabras, caballos, monos y otros primates no humanos. Preferiblemente, el presente método se utiliza para prevenir, tratar o retrasar la cardiotoxicidad en los humanos.

1. Agentes de neurregulina

- En los presentes métodos puede utilizarse cualquier proteína neurregulina idónea, o un fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma. En una realización, los métodos de la presente invención usan un fragmento polipeptídico de un isómero de la neurregulina $\beta 2$ de humano, que contiene el dominio de fijación al receptor (a saber, una región de la clase EGF). Este polipéptido puede activar el receptor erbB de la familia de receptores de EGF y modular sus reacciones biológicas (p. ej., estimular la diferenciación de las células del cáncer de mama y la secreción de la proteína de la leche; inducir la diferenciación de las células de la cresta neural en células de Schwann; estimular la síntesis de acetilcolina en las células del músculo esquelético; y/o mejorar la supervivencia de los cardiomiocitos y la síntesis del ADN). Los ácidos nucleicos y las proteínas de la neurregulina se pueden producir mediante cualquier método idóneo y conocido en la técnica, que incluye, pero sin limitarse a ellos, la producción recombinante, la síntesis química o una combinación de ambos. Preferiblemente, los ácidos nucleicos y proteínas de la neurregulina se producen mediante producción recombinante (véase Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. 2002).

- En los presentes métodos también se pueden utilizar las variantes de la neurregulina con sustituciones conservativas de aminoácidos que no alteran sustancialmente su actividad anticardiotóxica. Las sustituciones conservativas idóneas de los aminoácidos las conocen bien los expertos en esta técnica y se podrían llevar a cabo de manera general sin alterar la actividad biológica de la molécula resultante. Los expertos en la técnica reconocerán que, en general, las sustituciones de un solo aminoácido en las regiones que no son esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (véase, p. ej., Watson et al., *Molecular Biology of the Gene*, 4.^a edición, pág. 224, The Benjamin/Cummings Pub. Co., 1987).

- El ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina o un fragmento funcional de la misma se puede utilizar en forma de ADN desnudo, ADN en complejo, ADNc, ADN plasmídico, ARN u otras mezclas de los mismos, como componentes del sistema de suministro del gen. En otra realización, el ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, está incluido en un vector vírico. Se puede utilizar cualquier vector vírico que sea idóneo para la genoterapia. Los ejemplos no limitantes incluyen vectores adenovíricos (patente de los EE. UU. n.º 5.869.305), vectores del virus del simio (patente de los EE. UU. n.º 5.962.274), vectores del virus de la inmunodeficiencia humana que se replican condicionalmente (patente de los EE. UU. n.º 5.888.767), retrovirus, SV40, vectores del amplicón del virus del herpes simple, y vectores del virus de la variolovacuna. Además, los genes se pueden introducir en un sistema de vector no vírico, tal como un liposoma, en donde el lípido protege al ADN o a otros biomateriales de la oxidación durante la coagulación.

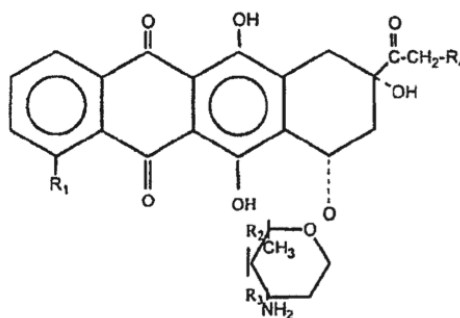
- En una realización específica, la neurregulina utilizada en los presentes métodos lleva a cabo su actividad anticardiotóxica a través de la fijación a cualquiera de los receptores erbB2-erbB4. En otra realización específica, se utiliza la neurregulina 1, la neurregulina 2, la neurregulina 3 o la neurregulina 4 en los presentes métodos. Los sinónimos de la neurregulina 1 incluyen herregulina, GGF2 y ligando p185erbB2 (véase, p. ej., la solicitud de patente internacional WO 00/64400 y las patentes de los EE. UU. n.ºs 5.530.109 y 5.716.930). En los presentes métodos se pueden utilizar la neurregulina $\alpha 2$ y la neurregulina $\beta 2$. Preferiblemente, en los presentes métodos se utiliza un fragmento de la neurregulina $\beta 2$ que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en la SEQ ID n.º 4.

- En otras realizaciones específicas más, se pueden utilizar en los presentes métodos las neurregulinas o los fragmentos funcionales de las mismas descritos en las siguientes patentes, solicitudes de patentes y bases de datos de GenBank: patentes de los EE. UU. n.ºs 6.252.051 y 6.121.415 (NRG3); 6.087.323 (neurregulina con actividad de fijación a p185^{erbB2}, p185^{erbB3} o p185^{erbB4}); 6.033.906 (neurregulina como ligando para un receptor seleccionado del

grupo que consiste en p185^{erbB2} y p180^{erbB4}); patente US2002002276 (adhesinas heteromultiméricas y quiméricas de ErbB como antagonistas competitivos o agonistas de una neurregulina); solicitudes de patente internacional WO 01/81540 (NRG-4); WO 01/64877 (NRG1); WO 01/64876 (NRG1AG1); WO 01/58948 (neurregulina β); WO 01/26607 (isoformas de variantes de ajuste de la neurregulina SMDF y GGF); WO 00/70322 (CRD-neurregulina); WO 00/64400; WO 99/18976; WO 98/02540 (adhesinas heteromultiméricas y quiméricas de ErbB como antagonistas competitivos o agonistas de una neurregulina); WO 96/30403; WO 96/15812; BC017568 (*Homo sapiens*, similar a la neurregulina 4); BC007675 (*Homo sapiens*, neurregulina 1); AF142632 (dominio rico en cisteínas de la neurregulina 1 de *Xenopus laevis*); AF194439 (neurregulina α 2a de SMDF de *Rattus norvegicus* (Nrg1)); AF194438 (neurregulina β 1a de SMDF de *Rattus norvegicus* (Nrg1)); HS2NRG12 (neurregulina 2 (NRG2) ajustada alternativamente de *Homo sapiens*); HS2NRG08 (neurregulina 2 (NRG2) ajustada alternativamente de *Homo sapiens*); HS2NRG07 (neurregulina 2 (NRG2) ajustada alternativamente de *Homo sapiens*); AF083067 (isoforma corta de la neurregulina 4 de *Mus musculus* (Nrg4)); AF076618 (neurregulina α 1 de *Xenopus laevis*); AF045656 (neurregulina β -2b de *Gallus gallus*); AF045655 (neurregulina β -2a de *Gallus gallus*); AF045654 (neurregulina β -1a de *Gallus gallus*); MAU96612 (neurregulina de *Mesocricetus auratus*); AF010130 (neurregulina 3 de *Mus musculus* (NRG3)). Preferiblemente, en los presentes métodos se utiliza la una o varias neurregulinas descritas en el acceso de GenBank n.º NT_007995 (gi:18570363).

2. Agentes profilácticos o terapéuticos

La presente invención da a conocer la neurregulina para uso en los métodos para prevenir, tratar o retrasar una cardiotoxicidad relacionada con la administración de un agente profiláctico o terapéutico. El agente de la neurregulina se puede administrar antes, a la vez, o después de la administración del agente profiláctico o terapéutico. Los presentes métodos no se limitan a prevenir, tratar o retrasar la cardiotoxicidad asociada a los agentes profilácticos o terapéuticos específicos. Los ejemplos no limitantes de agentes profilácticos o terapéuticos para ser usados en los presentes métodos incluyen antineoplásicos, antipsicóticos, antidepresivos tricíclicos, interferones, interleucinas y agentes antiinfecciosos. En los presentes métodos se puede utilizar cualquier antineoplásico. Preferiblemente, el antineoplásico es un antineoplásico antraciclínico que tiene la fórmula:



en donde R1 es metoxi o hidrógeno; y R2, R3 y R4 son hidroxilo o hidrógeno.

Los ejemplos no limitantes de antineoplásico antraciclínico incluyen adriamicina (o doxorubicina), daunorubicina, epirubicina, idarubicina, mitoxantrona, mitomicina, bleomicina, ciclofosfamida, fluorouracilo, actinomicina D, vincristina y derivados de los mismos (véase Goodman y Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9.^a edición, págs. 1264-1269, McGraw-Hill, 1996). Otros ejemplos de antineoplásicos que se pueden utilizar en los presentes métodos se describen en la solicitud de patente de los EE. UU. n.º 2002/044919. Otros antineoplásicos incluyen, pero sin limitarse a ellos, citidina, arabinosiladenina (araC), daunomicina, metotrexato (MTX), pirimidinas fluoradas, tales como 5-fluorouracilo (5-FU), hidroxiurea, 6-mercaptopurina, alcaloides vegetales, tales como vincristina (VCR), VP-16 y vinblastina (VLB), alquilante, cisplatino, mecloretamina, trisamina, procarbazona, bleomicina, mitomicina C, actinomicina D, o una enzima, tal como L-asparaginasa (véase Goodman y Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9.^a edición, págs. 1227-1229).

En los presentes métodos se puede utilizar cualquier antipsicótico. Los ejemplos no limitantes de antipsicóticos incluyen clorpromazina, perfenazina y trifluoperazina. Otros ejemplos de antipsicóticos se pueden encontrar en Goodman y Gilman' *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9.^a edición, págs. 400-420).

En los presentes métodos se puede utilizar cualquier antidepresivo tricíclico. Los ejemplos no limitantes de antidepresivos tricíclicos incluyen clomipramina, amitriptilina y doxepina. Otros ejemplos de antipsicóticos se pueden encontrar en Goodman y Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9.^a edición, págs. 431-434.

En los presentes métodos se puede utilizar cualquier interferón. Preferiblemente, el interferón es el interferón α . En una realización, el interferón es el interferón α de humano. Los métodos para producir el interferón α se pueden encontrar en las patentes de los EE. UU. n.ºs 6.005.075; 5.834.235; 5.503.828; y 4.820.638.

En los presentes métodos se puede utilizar cualquier interleucina. Preferiblemente, la interleucina es la interleucina 2.

En una realización, la interleucina es la interleucina 2 de humano. Los métodos para producir la interleucina 2 se pueden hallar en las patentes de los EE. UU n.^{os} 5.834.441; 5.795.777; 5.419.899; y 5.399.699.

En los presentes métodos se puede utilizar cualquier agente antiinfeccioso. Preferiblemente, el agente antiinfeccioso es la emetina. Otros ejemplos de agentes antiinfecciosos se pueden encontrar en Goodman y Gilman' *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9.^a edición, págs. 965-1008.

Se pueden administrar *in vivo* agentes de neurregulina (a saber, administrados directamente a un mamífero). Como alternativa, la proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, se puede administrar *ex vivo* (a saber, administrarse en células, tejidos u órganos, en donde tales células, tejidos u órganos que llevan la proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, se pueden transferir a un mamífero).

E. Tratamiento del infarto de miocardio

En un aspecto, la presente invención se refiere a una neurregulina para uso en un método para tratar, retrasar o prevenir el infarto de miocardio, en donde la neurregulina está presente en una combinación, en donde dicha combinación comprende una cantidad eficaz de una proteína, la neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, y una cantidad eficaz de un agente profiláctico o terapéutico contra el infarto de miocardio. Preferiblemente, las presentes combinaciones comprenden además un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En las presentes combinaciones se puede utilizar cualquier neurregulina idónea. Por ejemplo, la neurregulina utilizada en las presentes combinaciones puede llevar a cabo su actividad contra el infarto de miocardio a través de la fijación a los receptores ErbB2-ErbB4. En otro ejemplo, la neurregulina utilizada en las presentes combinaciones es la neurregulina 1, la neurregulina 2, neurregulina 3 o neurregulina 4. Preferiblemente, la neurregulina 2 es la neurregulina $\alpha 2$ o la neurregulina $\beta 2$. Aún en otro ejemplo, la neurregulina utilizada en las presentes combinaciones es un fragmento de la neurregulina $\beta 2$ que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en la SEQ ID n.º 4. También se puede utilizar cualquier neurregulina específica descrita en los apartados anteriores.

En las presentes combinaciones se puede utilizar cualquier agente profiláctico o terapéutico idóneo. Por ejemplo, el agente profiláctico o terapéutico utilizado en las presentes combinaciones puede ser un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina I (IECA), un agonista del calcio, un antagonista del receptor β , aspirina, atropina, nitroglicerina, escopolamina o un trombolítico.

Se puede utilizar cualquier IECA idóneo. Los IECA de ejemplo incluyen captopril, rampril, lisinopril, zofenopril y trandolapril. Se puede utilizar cualquier antagonista idóneo del calcio. Los antagonistas del calcio de ejemplo incluyen diltiazem. Se puede utilizar cualquier antagonista idóneo del receptor β . Los antagonistas de ejemplo del receptor β incluyen propranolol, metoprolol, atenolol y timolol. Se puede utilizar cualquier trombolítico. Los trombolíticos de ejemplo incluyen la estreptocinasa, t-PA y anistreplasa.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit con neurregulina para ser usada para prevenir, tratar o retrasar el infarto de miocardio, en donde dicho kit comprende una combinación descrita más arriba en un envase e instrucciones para utilizar dicha combinación para prevenir, tratar o retrasar el infarto de miocardio.

Aún en otro aspecto, la presente invención se refiere a la neurregulina para uso en un método para prevenir, tratar o retrasar el infarto de miocardio en un mamífero, en donde dicho método comprende administrar a un mamífero, en el cual se necesita o al que se le desea tal prevención, tratamiento o retraso, una cantidad eficaz de una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, mediante lo cual se previene, trata o retrasa dicho infarto de miocardio.

En los presentes métodos se puede utilizar cualquier neurregulina idónea. Por ejemplo, la neurregulina utilizada en los presentes métodos puede llevar a cabo su actividad contra el infarto de miocardio a través de la fijación a los receptores ErbB2-ErbB4. Aún en otro ejemplo, la neurregulina utilizada en los presentes métodos es la neurregulina 1, la neurregulina 2, la neurregulina 3 o la neurregulina 4. Preferiblemente, la neurregulina 1 es la neurregulina $\alpha 2$ o la neurregulina $\beta 2$. Aún en otro ejemplo, la neurregulina utilizada en los presentes métodos es un fragmento de la neurregulina $\beta 2$ que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en la SEQ ID n.º 4. Se puede utilizar también cualquier neurregulina específica descrita en los apartados de más arriba.

En una realización específica, la proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, el ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, es antagonista del incremento del diámetro telediastólico del ventrículo izquierdo (DTDVI) y del diámetro telesistólico del ventrículo izquierdo (DTSVI) asociados al infarto de miocardio. En otra realización específica, la proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, el ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, es antagonista de la disminución de la FEVI asociada al infarto de miocardio.

Los presentes métodos se pueden utilizar para prevenir, tratar o retrasar el infarto de miocardio en cualquier

mamífero idóneo. Los mamíferos de ejemplo incluyen ratones, ratas, conejos, gatos, perros, cerdos, vacas, bueyes, ovejas, cabras, caballos, monos y otros primates no humanos. Preferiblemente, los presentes métodos se utilizan para prevenir, tratar o retrasar el infarto de miocardio en un humano.

- 5 Los presentes métodos se pueden utilizar para prevenir, tratar o retrasar cualquier infarto de miocardio idóneo. Por ejemplo, los presentes métodos se pueden utilizar para prevenir, tratar o retrasar el infarto de miocardio que tiene una característica clínica seleccionada del grupo que consiste en dilatación del ventrículo izquierdo, función sistólica reducida e incremento de la presión de llenado.

- 10 La proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, se puede administrar sola. Preferiblemente, la proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, se administra con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, se administra una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma. En otra realización, se administra un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma. Se puede utilizar cualquier vía de administración idónea. Preferiblemente, se utiliza la administración intravenosa.

- 15 Los presentes métodos pueden además comprender la administración de un agente profiláctico o terapéutico contra el infarto de miocardio. En los presentes métodos se puede utilizar cualquier agente profiláctico o terapéutico adecuado. Por ejemplo, el agente profiláctico o terapéutico utilizado en los presentes métodos puede ser un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina I (IECA), un antagonista del calcio, un antagonista del receptor β , aspirina, atropina, nitroglicerina, escopolamina o un trombolítico.

- 20 Se puede utilizar cualquier IECA. Los IECA de ejemplo incluyen captopril, rampril, lisinopril, zofenopril y trandolapril. Se puede utilizar cualquier antagonista del calcio idóneo. Los antagonistas del calcio de ejemplo incluyen diltiazem. Se puede utilizar cualquier antagonista del receptor β idóneo. Los antagonistas del receptor β de ejemplo incluyen propranolol, metoprolol, atenolol y timolol. Se puede utilizar cualquier trombolítico idóneo. Los trombolíticos de ejemplo incluyen estreptocinasa, t-PA y anistreplasa.

En una realización preferida, se administra *in vivo* la proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, el ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma.

F. Composiciones farmacéuticas con pauta posológica y/o dosificación segura preferida

- 30 En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para prevenir, tratar o retrasar una enfermedad en un mamífero, en donde dicha composición comprende una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, en una pauta posológica total igual o menor que aproximadamente 3600 U/kg. La neurregulina podría estar presente en la composición en una dosificación segura que es igual o menor que aproximadamente 170 U/kg.

- 35 Las presentes composiciones farmacéuticas se pueden utilizar en cualquier pauta posológica y/o plan de administración idóneos. De acuerdo con la invención, las presentes composiciones farmacéuticas se administran durante aproximadamente 21 días o menos de 21 días. Las presentes composiciones farmacéuticas se podrían administrar de forma continua o intermitente.

Las presentes composiciones farmacéuticas se pueden administrar solas. Preferiblemente, las presentes composiciones farmacéuticas pueden comprender además un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

- 40 Se puede utilizar cualquier neurregulina idónea en las presentes composiciones farmacéuticas. Por ejemplo, la neurregulina utilizada en las presentes composiciones farmacéuticas puede llevar a cabo su actividad contra la enfermedad a través de la fijación a los receptores ErbB2-ErbB4. En otro ejemplo, la neurregulina utilizada en las presentes composiciones farmacéuticas es la neurregulina 1, la neurregulina 2, la neurregulina 3 o la neurregulina 4. Preferiblemente, la neurregulina 1 es la neurregulina $\alpha 2$ o la neurregulina $\beta 2$. Aún en otro ejemplo, la neurregulina utilizada en las presentes composiciones farmacéuticas es un fragmento de neurregulina $\beta 2$ que comprende una secuencia de aminoácidos presentada en la SEQ ID n.º 4. También se puede utilizar cualquier neurregulina específica descrita en los apartados anteriores.

- 45 Las presentes composiciones farmacéuticas se pueden utilizar para prevenir, tratar o retrasar una enfermedad en cualquier mamífero idóneo. Los mamíferos de ejemplo incluyen ratones, ratas, conejos, gatos, perros, cerdos, vacas, bueyes, ovejas, cabras, caballos, monos y otros primates no humanos. Preferiblemente, los presentes métodos se utilizan para prevenir, tratar o retrasar una enfermedad en un humano. De acuerdo con la invención, las presentes composiciones farmacéuticas se utilizan para prevenir, tratar o retrasar una enfermedad cardiovascular, p. ej., miocarditis vírica, MCPD, actividad cardiotóxica, actividad de infarto de miocardio.

- 50 En una realización preferida, las presentes composiciones farmacéuticas se formulan para la administración intravenosa.

Lo siguiente es un método ejemplar, rápido, sensible, de alto flujo y cuantitativo para determinar la actividad biológica de NRG-1 mediante la combinación de la neurregulina con la molécula de ErbB3/ErbB4 de la superficie celular y la mediación indirecta de la fosforilación de la proteína ErbB2 (véase, p. ej., Michael D. Sadick et al., *Analytical Biochemistry*, 1996, 235, 207-214). De acuerdo con el ejemplo práctico 3 de la determinación de la actividad de NRG-1 *in vitro* que se describe en Michael D. Sadick et al., se puede determinar la actividad biológica de NRG-1 con diferentes orígenes.

- Brevemente, el ensayo, denominado enzoinmunoensayo (ELISA) de la activación del receptor con actividad cinasa (KIRA-ELISA), consiste en dos placas de microtitulación independientes, una para el cultivo celular, estimulación con el ligando y solubilización del receptor/lisis celular, y la otra placa es para la captura del receptor y ELISA de fosfotirosina. El ensayo se desarrolló para el análisis de la activación de ErbB2 inducida por la herregulina y utiliza la estimulación del receptor intacto en la línea de células adheridas de carcinoma de mama, MCF-7. Las proteínas de la membrana se solubilizan mediante la lisis con Tritón X-100 y el receptor se captura en los pocillos para ELISA revestidos con anticuerpos específicos contra ErbB2 que no dan reacción cruzada con ErbB3 ni con ErbB4. A continuación, se cuantifica el grado de fosforilación del receptor mediante ELISA con antifosfotirosina. Se genera una curva estándar reproducible con una CE(50) de aproximadamente 360 pM para la herregulina $\beta 1$ (177-244) (HRG $\beta 1$ (177-244)). Cuando muestras idénticas de HRG $\beta 1$ (177-244) se analizan mediante KIRA-ELISA y el análisis de transferencia Western cuantitativo de antifosfotirosina, los resultados se correlacionan mucho entre sí. El ensayo descrito en este informe es capaz de cuantificar específicamente la fosforilación de la tirosina de ErbB2 que es resultado de la interacción de HRG con ErbB3 y/o ErbB4.
- Ya que la mayoría de los fármacos manipulados genéticamente son proteínas y polipéptidos, su actividad se puede determinar por su secuencia de aminoácidos o el centro de actividad formado por su estructura espacial. El título de la actividad de la proteína y el polipéptido no es congruente con su calidad absoluta, por lo que no se puede determinar con la unidad de peso como se hace con los fármacos químicos. Sin embargo, la actividad biológica de los fármacos fabricados por ingeniería genética es generalmente congruente con su farmacodinámica y el sistema de determinación del título puesto en marcha gracias a la actividad biológica dada puede determinar su unidad de título. Así pues, la determinación de la actividad biológica puede ser parte de un proceso de titulación la sustancia con la actividad biológica y es un componente importante de control de calidad del producto fabricado por ingeniería genética. Es importante determinar los criterios de actividad biológica para el control de calidad del producto fabricado por ingeniería genética y los fármacos utilizados en la práctica clínica.
- La cantidad del producto estándar que puede inducir el 50% de la reacción máxima se define como una unidad de actividad (1 U). En consecuencia, se puede cuantificar con criterios uniformes el producto de diferentes sustancias farmacéuticas y de diferentes números de lote.

G. La formulación, dosificación y vía de administración de la neurregulina

- La formulación, dosificación y vía de administración de una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, preferiblemente en forma de composiciones farmacéuticas, se puede determinar de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica (véase, p. ej., *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Alfonso R., Gennaro (Editor) Mack Publishing Company, abril 1997; *Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing and Delivery Systems*, Banga, 1999; y *Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins*, Hovgaard y Frkj (Ed.), Taylor y Francis, Inc., 2000; *Medical Applications of Liposomes*, Lasic y Papahadjopoulos (Ed.), Elsevier Science, 1998, *Textbook of Gene Therapy*, Jain, Hogrefe y Huber Publishers, 1998; *Adenoviruses: Basic Biology to Gene Therapy*, vol. 15, Seth, Landes Bioscience, 1999; *Biopharmaceutical Drug Design and Development*, Wu-Pong y Rojanasakul (Ed.), Humana Press, 1999; *Therapeutic Angiogenesis: From Basic Science to the Clinic*, vol. 28, Dole et al., (ed.), Springer-Verlag New York, 1999).
- La proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica la proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, se puede formular para la administración por vía oral, rectal, tópica, inhalada, bucal (p. ej., sublingual), parenteral (p. ej., subcutánea, intramuscular, intradérmica o intravenosa), transdérmica, o cualquier otra vía de administración idónea. La vía más idónea en un caso dado dependerá de la naturaleza y de la gravedad de la afección a ser tratada, y de la naturaleza de la proteína neurregulina concreta, o un fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica la proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, que se utilice.

- La proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica la proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, se puede administrar en monoterapia. Como alternativa y preferiblemente, la proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica la proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, se coadministra con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En el presente método se puede utilizar cualquier vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado (véase, p. ej., *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Alfonso R. Gennaro (editor) Mack Publishing Company, abril 1997).

El ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, se puede utilizar en

forma de ADN desnudo, ADN en complejo, ADNc, ADN plasmídico, ARN u otras mezclas de los mismos como componentes del sistema de introducción génica. En otra realización, el ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, está incluido en un vector vírico. Se puede utilizar cualquier vector vírico que es idóneo para la genoterapia. Por ejemplo, se puede utilizar un vector adenovírico (patente de los EE. UU. n.º 5.869.305), un vector del virus del simio (patente de los EE. UU. n.º 5.962.274), un vector del virus de la inmunodeficiencia humana que se replica de forma condicional (patente de los EE. UU. n.º 5.888.767), retrovirus, SV40, vectores del amplicón del virus del herpes simple, y vectores del virus de la variolovacuna. Además, los genes se pueden introducir en un sistema de vector no vírico, tal como un liposoma en el que el lípido protege el ADN u otros biomateriales de la oxidación durante la coagulación.

- 10 De acuerdo con la presente invención, la proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica la proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, sola o en combinación con otros agentes, vehículos o excipientes, se podría formular para cualquier vía de administración idónea, tal como la inyección intracavernosa, inyección subcutánea, inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intradérmica, administración oral o tópica. El método podría emplear formulaciones para la administración inyectable
- 15 en una forma farmacéutica unitaria, en ampollas o en contenedores de multidosis, con la adición de un conservante. Las formulaciones podrían tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y podrían contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Como alternativa, el ingrediente activo podría estar en forma de polvo para la preparación con un vehículo idóneo, agua estéril sin pirógenos, u otros disolventes, antes del uso. La administración tópica en la
- 20 presente invención podría emplear el uso de una espuma, gel, crema, ungüento, parche transdérmico o pasta.

Las composiciones farmacéuticamente aceptables y los métodos para su administración que se podrían emplear para ser usadas en esta invención incluyen, pero sin limitación, lo descrito en las patentes de los EE. UU. n.ºs 5.736.154; 6.197.801 B1; 5.741.511; 5.886.039; 5.941.868; 6.258.374 B1; y 5.686.102.

- 25 La magnitud de una dosis terapéutica en el tratamiento o la prevención variará con la gravedad de la afección a tratar y la vía de administración. La dosis, y quizás la frecuencia de la dosis, también variará según la edad, la masa corporal, la afección y la respuesta de cada paciente.

- Se debe comentar que el médico de cabecera debería saber cómo y cuándo terminar, interrumpir o ajustar el tratamiento para disminuir la dosis debido a su toxicidad o a los efectos adversos. Por el contrario, el médico debería saber también cómo y cuándo ajustar el tratamiento a unos niveles más altos si la respuesta clínica no es la
- 30 adecuada (toda vez que se descartan los efectos secundarios tóxicos).

Se puede utilizar cualquier vía idónea de administración. Las formas farmacéuticas incluyen comprimidos, trociscos, sellos, dispersiones, suspensiones, soluciones, cápsulas, parches y similares. Véase, *Remington's Pharmaceutical Sciences*.

- En el uso práctico, la proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica la proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, sola o en combinación con otros agentes, se puede combinar como el activo en una mezcla estrecha con un vehículo o excipiente farmacéutico, tal como β -ciclodextrina y 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina, de acuerdo con las técnicas convencionales de formulación farmacéutica. El vehículo podría tomar una amplia forma de preparación deseada para la administración, tópica o parenteral. Al preparar las composiciones para la forma farmacéutica parenteral, tal como la inyección intravenosa o la infusión, se
- 40 podrían emplear medios farmacéuticos similares, agua, glicoles, aceites, tampones, azúcar, conservantes, liposomas, y similares, conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos de tales composiciones parenterales incluyen, pero sin limitarse a ellas, dextrosa al 5% p/v, solución salina normal u otras soluciones. La dosis total de la proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica la proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, sola o en combinación con otros agentes a administrar, se
- 45 podría administrar en un vial de líquido intravenoso, que oscila de aproximadamente 1 ml a 2.000 ml. El volumen del líquido de dilución variará de acuerdo con la dosis total administrada.

- La invención también da a conocer kits para realizar las pautas terapéuticas de la invención. Tales kits comprenden, en uno o varios envases, cantidades terapéuticamente eficaces de la proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la misma, o un ácido nucleico que codifica la proteína neurregulina, o un fragmento funcional de la
- 50 misma, sola o en combinación con otros agentes, en una forma farmacéuticamente aceptable. Las formas farmacéuticas preferidas estarían en combinación con solución salina estéril, solución de dextrosa o solución tamponada, u otro líquido estéril farmacéuticamente aceptable. Como alternativa, la composición podría estar liofilizada o desecada; en este caso, el kit comprende opcionalmente, además, en un envase, una solución farmacéuticamente aceptable, preferiblemente estéril, para reconstituir el complejo para formar una solución con el
- 55 propósito de inyectarla. Las soluciones farmacéuticamente aceptables de ejemplo son la solución salina y la solución de dextrosa.

En otra realización, un kit de la invención comprende además una aguja o jeringuilla, preferiblemente envasada en forma estéril, para inyectar la composición, y/o un almohadilla de alcohol envasada. Las instrucciones se incluyen opcionalmente para la administración de la composición por un médico o por el paciente.

H. Ejemplos

La neurregulina 1 $\beta_{S177-Q237}$ recombinante de humano (rhNRG-1 $\beta_{S177-Q237}$ de la neurregulina 1) desarrollada por el presente inventor puede reparar la estructura dañada de los cardiomiocitos, reforzar la conexión entre estas células, mejorar el funcionamiento del miocardio y reforzar el efecto biológico del miocardio. Los experimentos descritos en la presente memoria demuestran que determinados fragmentos de la neurregulina, p. ej., rhNRG-1 $\beta_{S177-Q237}$, pueden tratar con eficacia diferentes formas de las enfermedades cardiovasculares, tales como la miocarditis vírica o la miocardiopatía dilatada (o congestiva) (MCPD), la cardiotoxicidad ocasionada por determinados agentes terapéuticos, o el infarto de miocardio *in vivo*, y no afectan a la hemodinámica de los animales normales.

Ejemplo 1. Producción recombinante de rhNRG-1 $\beta_{S177-Q237}$

10 Fig. 1. Esquema técnico de la construcción de una cepa manipulada genéticamente

El gen de la neurregulina de humanos se localiza en el cromosoma 8P12 con aproximadamente 13 exones. El fragmento de la neurregulina recombinante está formado por 61 aminoácidos. La masa molecular teórica es de 7.055 Da. La masa molecular que aparece en la electroforesis de SDS-PAGE es de 6.500-7.500 Da. Su punto isoelectrónico es de aproximadamente 6,5. No hay sitios de glucosilación. La estructura del péptido contiene 3 puentes disulfuro. Este gen es idóneo para la expresión en *E. coli*.

Como plásmido de expresión, se seleccionó el pET-22b. El gen de la neurregulina de humanos se introdujo en el plásmido y a continuación se transformó la cepa BL21 de *E. coli* con este plásmido. Se cribaron los recombinantes con alto nivel de expresión al producir la cepa manipulada genéticamente el fragmento de la neurregulina recombinante de humano.

20 Fig. 2. Amplificación del gen de la neurregulina de humano

Se extrajo el ARN total y el ARNm del tejido de cerebro de feto humano de 5 meses y se retrotranscribió en ADNc. La RT-PCR se realizó con el ADNc transcrito como molde, y una pareja de cebadores P1, TCG AAC ATA TGA GCC ATC TTG TAA AAT GTG CGG (SEQ ID n.º 1), y P2, TCG AAG GGC CCT CAC TGG TAC AGC TCC TCC (SEQ ID n.º 2), para amplificar el gen deseado. Se examinó el producto de la PCR por electroforesis en agarosa al 1,5%. Se encontró el fragmento de ADN específico de 183 pb en la agarosa, cuya longitud era la misma que se había anticipado.

Fig. 3. Mapa físico del plásmido pET-22b

Fig. 4. Identificación del plásmido recombinante mediante digestión con endonucleasa

Se aplicó el método de sedimentación en cloruro de calcio para clonar el gen de la neurregulina de humano en el plásmido de expresión pET-22b para construir el plásmido de expresión de la neurregulina recombinante de humano (pET22b-neurregulina de humano). Este gen se expresó con eficacia bajo el impulso del promotor de T7. El extremo amino del gen expresado se introdujo en el locus NdeI. El terminador en el extremo carboxilo está a continuación del último aminoácido. La proteína expresada no formó una proteína de fusión con ningún aminoácido. Se obtuvo un fragmento preciso de 183 pb después del análisis de digestión con endonucleasa. El transformante se caracterizó por digestión con endonucleasa. Se extrajo el ADN bicatenario para el análisis de su secuencia. Los resultados de la secuenciación confirmaron que la secuencia de la neurregulina de humano que llevaba el vector de expresión era completamente correcta. La secuencia del ADNc determinada se recoge aquí:

AGC CAT CTT GTA AAA TGT GCG GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT GGA
GGG GAG TGC TTC ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAC CCC TCG AGA TAC TTG TGC
AAG TGC CCA AAT GAG TTT ACT GGT GAT CGC TGC CAA AAC TAC GTA ATG GCC

AGC TTC TAC AAG GCG GAG GAG CTG TAC CAG (SEQ ID n.º 3). La secuencia de aminoácidos deducida basada en la secuencia del ADNc de aquí arriba es:

SHLVKCAEKEKTFVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRQNYVMASFYKAEEL
YQ (SEQ ID NO:4).

Fig. 5. Cribado por expresión de una cepa manipulada genéticamente

Después de la amplificación por PCR y el análisis por digestión con endonucleasa, una única colonia del clon manipulado genéticamente (BL21-pET22b-neurregulina de humano) se picó aleatoriamente para inocularla en 2 ml de medio líquido de LB-Amp. El cultivo se incubó durante una noche a 37 °C y se agitó a 250 rpm. A continuación, se inoculó una porción del cultivo puro en 20 ml del medio LB-Amp. El cultivo se recogió después de la incubación a

37 °C hasta una vez que la turbidez se incrementó hasta una DO_{600} de 1,0 y después se le añadió el IPTG durante 4 h para inducir la expresión. Los cuerpos de inclusión se recogieron después de que las células se destruyeran.

Después de la electroforesis en SDS-PAGE al 15%, el análisis de barrido en capa fina, la transferencia Western y la repetición del cribado, se caracterizó una cepa manipulada genéticamente (BL21-pET22b-neurregulina de humano) y se puso en marcha con una expresión estable muy elevada de la proteína neurregulina deseada. La proteína deseada que se estaba expresando representaba aproximadamente el 10% de la proteína total de esta cepa. Después del proceso del homogeneizado a alta presión, la proteína deseada se presentó en forma de cuerpos de inclusión.

- La cepa manipulada genéticamente se analizó por electroforesis en SDS-PAGE después de la inducción de 4 h con IPTG. Los cuerpos de inclusión representaban aproximadamente el 20% de las proteínas totales. La actividad específica de la neurregulina recombinante purificada era de más de 5×10^3 EU/mg, lo que indica que la construcción de la cepa productora de la neurregulina resultó satisfactoria. Además de la SDS-PAGE, de la transferencia Western, y del análisis de la actividad biológica en la etapa de cribado de la cepa, se llevaron a cabo más análisis, tal como el análisis de la composición aminoacídica de la neurregulina y el análisis de la secuencia del extremo amino. Estos resultados indican que la secuencia de aminoácidos de la neurregulina recombinante de humano que se estaba expresando es la misma que la diseñada.

Ejemplo 2. Efecto terapéutico de la neurregulina 1 β recombinante de humano sobre la insuficiencia cardíaca en las ratas ocasionada por la ligación de la arteria coronaria

1. Resumen

- Objetivos. Estudiar el efecto terapéutico de la neurregulina 1 β recombinante de humano (rhNRG-1 β) sobre la insuficiencia cardíaca en las ratas ocasionada por la ligación de la arteria coronaria. Método. Se abre el tórax de la rata, el extremo descendente de la arteria coronaria se ligó con suturas no invasivas en el sitio entre la aurícula izquierda y el cono pulmonar, lo que pone en marcha un modelo de rata con insuficiencia cardíaca subaguda. En general, aproximadamente 6 días después de la ligación, cuando la fracción de eyección del ventrículo izquierdo disminuyó hasta aproximadamente el 50%, los grupos se dividieron aleatoriamente, a saber, el grupo del modelo, el grupo del fármaco problema y el grupo de pseudooperación en el que solo se abrió el tórax, y no se ligó la arteria coronaria. Había 10-13 animales en cada grupo, se pusieron en marcha 3 grupos de niveles de dosis que tenían 5, 10 y 20 μ g/kg, respectivamente, para el grupo del fármaco de prueba, y se inyectó el fármaco en la vena de la cola una vez cada día durante 10 días consecutivos. Se realizó la determinación de la función cardíaca (ecocardiografía) 6 días antes de la administración del fármaco y después de la retirada del fármaco, se realizó la autopsia de los animales problema, se pesó el corazón, se determinó el grosor de la pared ventricular, se evaluó anatomopatológicamente y se determinó el nivel de la renina-angiotensina-aldosterona. Resultados. Después de 5 días consecutivos de administración del fármaco a los 3 grupos de nivel de dosis de rhNRG-1 β , la fracción de eyección ($71,1 \pm 12,0\%$, $64,4 \pm 12,9\%$, $62,9 \pm 8,4\%$) y la fracción del acortamiento ($36,9 \pm 9,7\%$, $32,0 \pm 9,5\%$, $30,3 \pm 6,1\%$) de los animales modelo aumentaron respectivamente todas y hubo una diferencia significativa entre la del grupo de 20 μ g/kg y 10 μ g/kg en comparación con el grupo del modelo ($P < 0,01$); además, los cambios de la fracción de eyección en el grupo del modelo con 20 μ g/kg pudieron mantenerse durante unos 35 días después de la administración del fármaco ($P < 0,05$); 20 μ g/kg de rhNRG-1 β pudieron reducir significativamente el área isquémica del miocardio, incrementar el número de capilares de la lesión fibrótica ($P < 0,05$); 20 μ g/kg y 10 μ g/kg de rhNRG-1 β pudieron reducir la cantidad periférica de angiotensina I (AI), angiotensina II (AII), renina (PRA) y aldosterona (ALD), y con una diferencia significativa cuando se comparó con la del grupo del modelo ($P < 0,01$, $P < 0,05$). No había una diferencia significativa entre el grupo con 10 días consecutivos de inyección y el grupo con 5 días consecutivos de inyección ($P < 0,05$). Conclusión: Determinadas dosis de la rhNRG-1 β inyectadas por vía intravenosa durante 5 días consecutivos pudieron tratar con eficacia la insuficiencia cardíaca en la rata ocasionada por la ligación de la arteria coronaria.

2. Objetivos del experimento

Estudiar el efecto terapéutico de la rhNRG-1 β sobre la insuficiencia cardíaca en la rata ocasionada por la ligación de la arteria coronaria.

3. Fármaco problema

- La rhNRG-1 β investigada y producida por Zensun (Shangai) Science & Technology Co Ltd., número de lote: 200110006-2; concentración: 500 μ g/ampolla; determinación de la titulación: 5.000 u/ampolla; pureza: >95% (HPLC-C8).

4. Animal para el experimento

- 4.1 Especie, origen y número de certificado de competencia; rata Sprague Dawley®, proporcionada por el Centro de Animales para Experimentos de la Academia de Ciencia China, número de certificado de competencia: Zhong Ke Yuan Dong Guan Hui 003;

4.2 Masa corporal, género: 200-220 g, macho.

5. Reactivos y equipamiento

5.1 Ecocardiógrafo: Hewlett Packard Sonos 5500, tipo de sonda: S12;

5.2 Electrofisiógrafo de seis derivaciones, SMUP-C-6, fabricado por el Departamento de Fisiología de la Universidad Médica de Shangai;

5.3 Balanza electrónica, equipo Mateler-Tolido (Shanghai) Co Ltd;

5.4 Aguja permanente arteriovenosa, 20G, producida por la compañía de equipos médicos Sino-America Weng Zhou Hua Li;

5.5 Calibradores micrononio, Harbin Measure and Knife Factory;

10 5.6 Contador y radioinmune, GC-1200, sector de equipamientos fotoeléctricos Zhong Jia de la compañía industrial de tecnología y ciencia general de la Universidad de Ciencia y Tecnología de China;

5.7 Kits de renina y angiotensina, AI: Instituto Bio-Tech de Pekín Norte, número de lote: 0210; AII: Instituto Bio-Tech de Pekín Norte, número de lote: 2028;

15 5.8 Depilatorio, sulfuro de sodio al 8%, Planta química Xi Long de la Provincia de GuangDong, número de lote: 010622;

5.9 Hidrocloruro de ketamina, fabricado por Shanghai Zhong Xi Pharmaceuticals Co Ltd, número de lote: 20020401.

6. Método del experimento

6.1 Agrupamientos para el experimento

Se pusieron en marcha el grupo de pseudooperación, el grupo del modelo y los grupos del fármaco problema.

20 Grupo de pseudooperación (n = 10), a saber, toracotomía, pero sin ligar la arteria coronaria;

Grupo del modelo (grupo de control negativo) (n = 12): se inyectó el vehículo de la preparación (PB a 10 mM, seroalbúmina humana al 0,2%, manitol al 5%);

25 Grupo del fármaco problema (n = 13): la rhNRG-1 β con 3 niveles de dosis, se pusieron en marcha 2 subgrupos para cada grupo de nivel de dosis; en donde un grupo sirvió para la monitorización a largo plazo después de la administración del fármaco.

6.2 Se puso en marcha la dosis del fármaco problema y de la preparación del fármaco, la vía de administración, los momentos de inyección, la concentración y el volumen del fármaco administrado.

30 Se pusieron en marcha los grupos de nivel de dosis alto, intermedio y bajo de 20 μ g/kg, 10 μ g/kg y 5 μ g/kg, respectivamente, de acuerdo con el resultado del experimento preliminar. El fármaco se diluyó con la solución del tampón de preparación (PB a 10 mM, seroalbúmina humana al 0,2%, manitol al 5%) a la concentración necesaria.

Vía de administración del fármaco: en el grupo del fármaco problema así como en el grupo del modelo, el fármaco se inyectó en la vena de la cola una vez al día durante 5 días consecutivos. Se realizó la ecocardiografía el 6.º día antes de la administración del fármaco, y luego se inyectó continuamente durante 5 días. El volumen de cada inyección de fármaco fue de 0,4 ml/100 g de masa corporal.

35 6.3 Método del experimento

6.3.1 Puesta en marcha del modelo de rata con insuficiencia cardíaca mediante la ligación de la rama descendente anterior de la arteria coronaria

40 Después de la anestesia con la inyección intraabdominal de ketamina a 100 mg/kg, se sujetó la rata sobre una placa para ratas en posición supina, se desinfectó la región del cuello con bromogeramina después de la depilación. Se realizó una incisión en la línea media, se halló la tráquea después de separar el músculo cervical anterior, se insertó un trocar permanente arterial de 18G en la tráquea a nivel del cartílago traqueal 3-5, se tomó el estilete, se empujó la cánula de plástico 1-2 cm hacia la tráquea, se fijó para la conexión posterior con el ventilador para animal pequeño (el volumen respiratorio era de unos 20 ml, la frecuencia era de 80/min). Después de cortar para abrir la piel de la pared torácica anterior izquierda, se separó el músculo, se expuso la 4.^a y la 5.^a costilla, se atravesó la pared
45 torácica con pinzas curvas, se separó el tejido bajo las costillas, se conectó el ventilador, se expuso el corazón, se monitorizó el inflado de los pulmones y el latido del corazón, se desgarró el pericardio para abrirlo, se descubrió la almohadilla de grasa superior, se expuso totalmente la aurícula izquierda y el cono pulmonar, se ligó la arteria coronaria izquierda entre las dos partes con una sutura no invasiva de 6/0 para el uso médico, el área infartada del

miocardio (unos 8 mm × 8 mm) mostró un color violeta, sobresalía, y se redujo significativamente la actividad después de la ligación. A continuación, se cerró la pared torácica, se bloqueó la abertura del ventilador para inflar los pulmones, se presionó con fuerza el tórax para sacar el aire, y se suturó a continuación el músculo torácico y la piel. Se monitorizó la respiración, después de que se recuperara la respiración espontánea, se retiró el ventilador, y se devolvió el animal a su jaula para la crianza. En el grupo de pseudooperación, sólo se desgarró el pericardio para abrirlo, pero no se ligó la arteria coronaria.

- Se realizó la ecocardiografía de la rata operada unos 6 días después de la operación, y los animales con una reducción de aproximadamente el 50% del valor de fracción de eyección (FE) se dividieron aleatoriamente en grupos, en donde el valor de la FE de cada grupo era aproximadamente del 50%, y a continuación comenzó la administración del fármaco.

6.3.2 Experimento farmacodinámico

- Los animales con un valor de FE de aproximadamente el 50% se dividieron aleatoriamente entre el grupo del modelo (grupo negativo) y los grupos del fármaco problema con 3 niveles de dosis, con 12-13 animales en cada grupo. La vía de administración del fármaco en el grupo del fármaco problema y en el grupo del modelo fue la inyección en la vena de la cola, una vez al día durante 5 días consecutivos. Después de la ecocardiografía el 6.º día, se administró el fármaco durante otros 5 días consecutivos. El volumen del fármaco de cada inyección fue de 0,4 ml/100 g de masa corporal.

- La ecocardiografía se realizó de nuevo después de terminar la administración del fármaco, se realizó la autopsia de los animales, se les pesó el corazón, se determinó el grosor de la pared ventricular, se realizó el examen anatomopatológico del corazón, se recogió la sangre periférica, se separó el plasma, y se determinó la renina-angiotensina-aldosterona.

Algunos animales de prueba de diferentes grupos quedaron excluidos para el seguimiento a largo plazo.

6.3.3 Índice de observación

6.3.3.1 Determinación de la función cardíaca

- Se realizó la ecocardiografía con anestesia con ketamina después de la ligación y antes de la administración del fármaco, y el 6.º día, 11.º día de la administración del fármaco, el índice principal incluía:

FE: fracción de eyección del corazón, que refleja la función de eyección del ventrículo;

FS: índice de acortamiento del eje menor del ventrículo, que refleja la función de contracción del ventrículo;

DdVI: diámetro diastólico interno máximo del ventrículo izquierdo (cm);

- DsVI: diámetro sistólico interno mínimo del ventrículo izquierdo (cm).

6.3.3.2 Determinación del contenido de renina-angiotensina-aldosterona en el plasma

Se envió a que lo realizara el departamento de radioisótopos del Hospital Zhong Shan afiliado a la Universidad de Fudan.

- Se realizó la flebotomía de la arteria carótida y se extrajo el plasma de acuerdo con las instrucciones del kit de reactivos, se congeló y se conservó a -20 °C. Se determinó por inmunoensayo el contenido de la actividad de la renina (PRA), angiotensina I (AI), angiotensina II (AII) y aldosterona (ALD).

6.3.3.3 Corte histológico del miocardio

Fue realizado por el profesor Wand Bing Seng del centro de consultas de patologías difíciles de Shanghai.

- Después de fijarlo con formaldehído al 10%, el miocardio de la rata se seccionó longitudinalmente con 3 cortes equidistantes, se incluyó de manera convencional con parafina, se efectuó el corte, se tiñó con HE, se analizó la imagen por el área de la región fibrótica del corazón, se contó el número de capilares en la lesión fibrótica (unidad de recuento: pieza/mm²); se tiñó con Nagar-Oslen, y se estudió el tamaño de la región hipóxica isquémica en el miocardio.

7. Procesamiento de los datos

- Se realizó la prueba de la *t* para los datos experimentales recogidos.

8. Resultado del experimento

8.1 Efecto de la rhNRG-1β sobre el funcionamiento del corazón isquémico en la rata

Los resultados de la ecocardiografía realizada el día 5 de la administración del fármaco mostraron que el valor de la FE ($50,2 \pm 8,4\%$) y el valor de FS ($22,4 \pm 4,6\%$) del grupo del modelo eran significativamente menores que la FE ($91,1 \pm 2,4\%$) y la FS ($57,3 \pm 3,9\%$) del grupo de pseudooperación y con una diferencia significativa ($P < 0,01$). Tanto el valor de FE ($71,1 \pm 12,0\%$, $64,3 \pm 12,8\%$, $62,9 \pm 8,4\%$) como el valor de FS ($36,9 \pm 9,7\%$, $32,0 \pm 9,5\%$, $30,3 \pm 6,1\%$) de los grupos del fármaco problema (20, 10 y 5 $\mu\text{g/kg}$) se incrementaron significativamente una vez más, y había una diferencia significativa cuando se comparó con los del grupo del modelo ($P < 0,01$).

Los resultados de la repetición de la ecocardiografía que se realizó el día 10 de la administración del fármaco mostraron que el valor de FE ($42,7 \pm 6,4\%$) y el valor de FS ($18,3 \pm 3,2\%$) seguían siendo significativamente más bajos que la FE ($95,0 \pm 2,8\%$) y la FS ($65,3 \pm 6,8\%$) del grupo de pseudooperación y con una diferencia significativa ($P < 0,01$). Aunque el valor de la FE ($75,7 \pm 10,8\%$, $61,4 \pm 15,0\%$, $59,2 \pm 12,4\%$) y el valor de FS ($41,3 \pm 11,0\%$, $30,3 \pm 10,4\%$, $28,4 \pm 8,6\%$) de los grupos del fármaco problema (20, 10, 5 $\mu\text{g/kg}$) se seguían manteniendo a un nivel relativamente alto, y había una diferencia significativa cuando se comparó con los del grupo del modelo ($P < 0,01$), no había, sin embargo, ninguna diferencia significativa cuando se comparó con los resultados a día 5 de la administración del fármaco. Las tablas 1 a 6 muestran los resultados obtenidos de los dos experimentos.

Se observó el valor de la FE del corazón de rata en el grupo de los animales modelo y el grupo del fármaco problema a los 5 días de la administración del fármaco y 35 días después de retirar el fármaco, en donde el resultado mostró que el valor de la FE del corazón de rata del grupo de rhNRG-1 β a 20 $\mu\text{g/kg}$ se mantuvo estable a un nivel relativamente alto y había una diferencia significativa cuando se comparó con el del grupo de los animales modelo ($P < 0,05$) (tabla 7).

Tabla 1. Parámetros de medición de la función cardíaca antes administrar el fármaco en los animales modelo de insuficiencia cardíaca producida por la ligación de la rama descendente anterior de la arteria coronaria (1)

Grupo	DdVI	DsVI	FE	FS
Grupo de pseudooperación (n = 6)	$0,572 \pm 0,033^*$	$0,258 \pm 0,046^{**}$	$89,5 \pm 4,4^{**}$	$55,2 \pm 5,8^{**}$
Grupo del modelo (n = 12)	$0,705 \pm 0,117$	$0,558 \pm 0,119$	$48,3 \pm 10,3$	$21,3 \pm 5,6$
Grupo de rhNRG-1 β a 20 $\mu\text{g/kg}$ (n = 13)	$0,730 \pm 0,108$	$0,575 \pm 0,119$	$49,3 \pm 11,4$	$21,7 \pm 6,4$
Grupo de rhNRG-1 β a 10 $\mu\text{g/kg}$ (n = 13)	$0,709 \pm 0,099$	$0,555 \pm 0,102$	$49,5 \pm 11,0$	$22,1 \pm 6,1$
Grupo de rhNRG-1 β a 5 $\mu\text{g/kg}$ (n = 13)	$0,761 \pm 0,075$	$0,596 \pm 0,092$	$49,3 \pm 10,6$	$22,0 \pm 5,9$

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, cuando se compara con el grupo de animales modelo.

Tabla 2. Parámetros de medición de la función cardíaca 5 días después de la administración del fármaco en los animales modelo de insuficiencia cardíaca producida por la ligación de la rama descendente anterior de la arteria coronaria (1)

Grupo	Administración del fármaco	DdVI	DsVI	FE	FS
Grupo de pseudooperación (n = 6)	i.v. cd $\times$ 5	$0,549 \pm 0,046^{**}$	$0,234 \pm 0,027^*$	$91,1 \pm 2,4^{**}$	$57,3 \pm 3,9^{**}$
Grupo del modelo (n = 12)	i.v. cd $\times$ 5	$0,79 \pm 0,08$	$0,61 \pm 0,09$	$50,24 \pm 8,41$	$22,43 \pm 4,62$
rhNRG-1 β a 20 $\mu\text{g/kg}$ (n = 13)	i.v. cd $\times$ 5	$0,70 \pm 0,07^{**}$	$0,46 \pm 0,09^{**}$	$71,07 \pm 11,99^{**}$	$36,88 \pm 9,66^{**}$
rhNRG-1 β a 10 $\mu\text{g/kg}$ (n = 13)	i.v. cd $\times$ 5	$0,71 \pm 0,05^*$	$0,51 \pm 0,09^{**}$	$64,35 \pm 12,85^{**}$	$32,01 \pm 9,54^{**}$
rhNRG-1 β a 5 $\mu\text{g/kg}$ (n = 11)	i.v. cd $\times$ 5	$0,73 \pm 0,05^*$	$0,54 \pm 0,09^*$	$62,90 \pm 8,39^{**}$	$30,32 \pm 6,11^{**}$

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, cuando se compara con el grupo del modelo.

Tabla 3. Parámetros de medición de la función cardíaca 10 días después de la administración del fármaco en los animales modelo de insuficiencia cardíaca producida por la ligación de la rama descendente anterior de la arteria coronaria (I)

Grupo	Administración del fármaco	DdVI	DsVI	FE	FS
Pseudooperación (n = 6)	i.v. cd × 10	0,466 ± 0,041**	0,159 ± 0,036**	95,0 ± 2,8**	65,3 ± 6,8**
Grupo del modelo 1 (n = 10)	i.v. cd × 10	0,8 ± 0,11	0,7 ± 0,11	42,7 ± 6,36	18,3 ± 3,19
rhNRG-1β a 20 μg/kg (n = 10)	i.v. cd × 10	0,6 ± 0,12**	0,5 ± 0,14**	75,7 ± 10,78**	41,3 ± 10,98**
rhNRG-1β a 10 μg/kg (n = 10)	i.v. cd × 10	0,7 ± 0,07**	0,51 ± 0,14**	61,4 ± 15**	30,3 ± 10,36**
rhNRG-1β a 5 μg/kg (n = 10)	i.v. cd × 10	0,72 ± 0,10*	0,55 ± 0,12*	59,2 ± 12,37**	28,4 ± 8,62**

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, cuando se compra con el grupo del modelo.

- 5 Tabla 4. Parámetros de medición de la función cardíaca 10 días después de la administración del fármaco en los animales modelo de insuficiencia cardíaca producida por la ligación de la rama descendente anterior de la arteria coronaria (II)

Grupo	DdVI	DsVI	FE	FS
Grupo de pseudooperación (n = 6)	0,544 ± 0,071*	0,215 ± 0,053**	93 ± 2,9**	60,8 ± 5,2**
Grupo del modelo (n = 12)	0,66 ± 0,10	0,52 ± 0,11	46,98 ± 14,17	20,85 ± 7,38
rhNRG-1β a 20 μg/kg (n = 12)	0,74 ± 0,12	0,56 ± 0,11	52,29 ± 12,87	23,89 ± 7,28
rhNRG-1β a 10 μg/kg (n = 12)	0,64 ± 0,11	0,49 ± 0,11	51,67 ± 11,92	23,27 ± 6,73
rhNRG-1β a 5 μg/kg (n = 12)	0,66 ± 0,11	0,51 ± 0,12	50,81 ± 12,55	22,83 ± 6,92

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, cuando se compara con el grupo del modelo.

- 10 Tabla 5. Parámetros de medición de la función cardíaca 5 días después de la administración del fármaco en los animales modelo de insuficiencia cardíaca producida por la ligación de la rama descendente anterior de la arteria coronaria (II)

Grupo	Administración del fármaco	DdVI	DsVI	FE	FS
Grupo de pseudooperación (n = 6)	i.v. cd × 5	0,553 ± 0,063**	0,215 ± 0,052**	93,1 ± 3,9**	61,4 ± 6,2**
Grupo del modelo (n = 10)	i.v. cd × 5	0,87 ± 0,11	0,74 ± 0,14	38,00 ± 12,36	16,35 ± 5,55
rhNRG-1β a 20 μg/kg (n = 9)	i.v. cd × 5	0,68 ± 0,11**	0,46 ± 0,17**	65,47 ± 20,48**	34,23 ± 15,42**
rhNRG-1β a 10 μg/kg (n = 12)	i.v. cd × 5	0,72 ± 0,13**	0,54 ± 0,14**	56,51 ± 12,68**	26,53 ± 8,48**
rhNRG-1β a 5 μg/kg (n = 10)	i.v. cd × 5	0,74 ± 0,11*	0,58 ± 0,18*	56,76 ± 16,10**	28,35 ± 10,64**

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, cuando se compara con el grupo del modelo.

Tabla 6. Parámetros de medición de la función cardíaca 10 días después de la administración del fármaco en los animales modelo de insuficiencia cardíaca producida por la ligación de la rama descendente anterior de la arteria coronaria (II)

Grupo	Administración del fármaco	DdVI	DsVI	FE	FS
Grupo de pseudooperación (n = 6)	i.v. cd × 10	0,539 ± 0,015**	0,204 ± 0,017**	93,8 ± 1,6**	62,2 ± 3,6**
Grupo del modelo (n = 10)	i.v. cd × 10	0,81 ± 0,13	0,69 ± 0,13	36,13 ± 10,10	15,18 ± 5,01
rhNRG-1β a 20 µg/kg (n = 8)	i.v. cd × 10	0,65 ± 0,09**	0,42 ± 0,13**	70,22 ± 14,15**	36,49 ± 11,27**
rhNRG-1β a 10 µg/kg (n = 12)	i.v. cd × 10	0,68 ± 0,08**	0,49 ± 0,17**	66,54 ± 15,81**	34,28 ± 12,64**
rhNRG-1β a 5 µg/kg (n = 9)	i.v. cd × 10	0,70 ± 0,08*	0,53 ± 0,16*	57,90 ± 19,54**	29,26 ± 14,19*

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, cuando se compra con el grupo del modelo.

- 5 Tabla 7. Valor de la FE de la función cardíaca medida a los 5 días de la administración del fármaco y 35 días después de la retirada del fármaco en los animales modelo

	Después de la ligación antes de la administración del fármaco	Después de 5 días de administración del fármaco	Después de 5 días de administración del fármaco y 35 días después de la retirada del fármaco
rhNRG-1β a 20 µg/kg	52,4 ± 13,8	79,2 ± 4,7*	73,0 ± 20,3*
rhNRG-1β a 10 µg/kg	52,2 ± 12,8	77,3 ± 11,6	63,8 ± 23,8
rhNRG-1β a 5 µg/kg	53,1 ± 12,8	75,8 ± 15,3	69,9 ± 28,6
Grupo del modelo	53,0 ± 12,6	62,6 ± 16,7	52,5 ± 29,9
Grupo de pseudooperación	94,4 ± 3,7**	94,1 ± 2,5**	95,1 ± 2,3**

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, cuando se compara con el grupo de animales modelo

8.2 Efecto de la rhNRG-1β sobre la histopatología del miocardio de la rata modelo

8.2.1 Efecto de la rhNRG-1β sobre la gravedad de la isquemia de miocardio y la hipoxia en los animales modelo

- 10 En el corte teñido con Nagar-Oslen, el miocardio normal se tiñó con color amarillo tenue, mientras que el área hipóxica isquémica se tiñó con más intensidad de color rojizo. Los cambios hipóxicos isquémicos se pudieron analizar con este método y se pudo realizar la comparación de la prueba cualitativa y semicuantitativa.

En las figuras 6 a 15 se muestran los cambios histológicos de diferentes grupos problema. El miocardio del grupo del modelo se tiñó de color más intenso, una gran región del miocardio se tiñó de color rojo, mientras que la del grupo de pseudooperación se tiñó de amarillo, sin ningún área teñida de rojo; las células del miocardio teñidas de rojo con la rhNRG-1β a 20 µg/kg mostraban una distribución puntiforme; el tejido teñido de rojo de los grupos con 10 µg/kg y 5 µg/kg mostró una distribución desigual, lo que demuestra que la rhNRG-1β podía aliviar la gravedad de los daños hipóxicos isquémicos.

- 15 8.2.2 Efecto de la rhNRG-1β sobre la regeneración capilar en el área fibrótica del miocardio isquémico de la rata modelo

Los cambios del número de capilares en el tejido del miocardio de diferentes grupos problema se estudiaron con el sistema de análisis de imagen de Leica. Los resultados revelaron que había un incremento del número de capilares en la lesión fibrótica del miocardio del animal modelo en el grupo del fármaco problema con la rhNRG-1β, y que había una diferencia significativa entre el grupo de nivel de dosis a 20 µg/kg y el grupo del modelo ($P < 0,01$), sin que se observara ninguna diferencia estadística entre los grupos del nivel de dosis de 10 µg/kg y 5 µg/kg y el grupo del modelo, lo que demuestra que la dosis alta de rhNRG-1β (20 µg/kg) podría favorecer la proliferación capilar en la

25

lesión fibrótica del miocardio después de la ligación de la arteria coronaria en la rata (tabla 8, figuras 16 y 17).

Tabla 8. Efecto de la rhNRG-1 β sobre la regeneración capilar en el área fibrótica del miocardio del animal modelo.

Grupo	Administración del fármaco	Número de capilares (I)	Número de capilares (II)
Grupo de pseudooperación	i.v. cd $\times$ 10	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0
Grupo del modelo	i.v. cd $\times$ 10	6,49 $\pm$ 2,17	13,7 $\pm$ 5,5
rhNRG-1 β a 20 μ g/kg	i.v. cd $\times$ 10	10,12 $\pm$ 3,0 **	24,6 $\pm$ 9,5**
rhNRG-1 β a 10 μ g/kg	i.v. cd $\times$ 10	8,99 $\pm$ 3,3	19,6 $\pm$ 8,5
rhNRG-1 β a 5 μ g/kg	i.v. cd $\times$ 10	9,35 $\pm$ 4,2	15,0 $\pm$ 6,9

** $P < 0,01$, cuando se compara con el grupo del modelo.

8.3 Efecto de la rhNRG-1 β sobre la cantidad de renina-angiotensina-aldosterona en el plasma del animal modelo

- 5 Se determinó la concentración de la renina (PRA), la angiotensina I (AI), la angiotensina II (AII) y la aldosterona (ALD) en el plasma de diferentes grupos del fármaco problema mediante radioinmunoensayo. En el grupo de animales modelo, los resultados mostraron que la PRA, la AI, la AII y la ALD eran de 3,506 $\pm$ 1,78 ng/ml.h, 10,655 $\pm$ 1,18 ng/ml, 1366,38 $\pm$ 577,33 pg/ml y 1,738 $\pm$ 0,34 ng/ml, respectivamente; en comparación con los del grupo de pseudooperación (1,315 $\pm$ 0,96 ng/ml, 8,125 $\pm$ 1,57 ng/ml, 564,37 $\pm$ 273,56 pg/ml y 1,113 $\pm$ 0,45 ng/ml), el contenido se incrementó significativamente, y la diferencia era estadísticamente significativa ($P < 0,05$).

- 15 La concentración de la AI (7,40 $\pm$ 12,15, 7,65 $\pm$ 1,40 ng/ml) y de la AII (641,47 $\pm$ 283,86, 468,58 $\pm$ 165,10 pg/ml) en el plasma se redujo significativamente en el grupo de rhNRG-1 β a 20 y 10 μ g/kg, con una diferencia significativa ($P < 0,01$); la PRA (1,337 $\pm$ 1,09, 1,075 $\pm$ 1,50 ng/ml.h) y la ALD (1,02 $\pm$ 0,27, 1,26 $\pm$ 0,38 ng/ml) se redujo significativamente también y había una diferencia significativa cuando se comparó con el grupo de animales modelo ($P < 0,05$). Sin embargo, cuando se comparó con el grupo de pseudooperación, la diferencia no tenía ninguna implicación estadística ($P > 0,05$), lo que demuestra que determinado nivel de dosis de rhNRG-1 β podía reducir el contenido de PRA, AI, AII y ALD en el plasma de la rata después de la ligación de la arteria coronaria (tabla 9).

Tabla 9. Renina (PRA), angiotensina I (AI), angiotensina II (AII) y aldosterona (ALD) en el plasma de diferentes animales modelo del grupo problema

Grupo	Administración del fármaco	AI (ng/ml)	AII (pg/ml)	ALD (ng/ml)	PRA (ng/ml.h)
Pseudooperación n = 6	i.v. cd $\times$ 10	8,125 $\pm$ 1,573*	564,370 $\pm$ 273,56*	1,113 $\pm$ 0,447*	1,315 $\pm$ 0,96*
rhNRG-1 β (n = 6)	i.v. cd $\times$ 10	10,655 $\pm$ 1,178	1366,38 $\pm$ 577,33	1,738 $\pm$ 0,337	3,506 $\pm$ 1,78
rhNRG-1 β a 20 μ g/kg (n = 6)	i.v. cd $\times$ 10	7,400 $\pm$ 2,15**	641,47 $\pm$ 283,86*	1,018 $\pm$ 0,266**	1,337 $\pm$ 1,09*
rhNRG-1 β a 10 μ g/kg (n = 6)	i.v. cd $\times$ 10	7,654 $\pm$ 1,399**	468,583 $\pm$ 165,1**	1,264 $\pm$ 0,382*	1,075 $\pm$ 1,5*
rhNRG-1 β a 5 μ g/kg (n = 6)	i.v. cd $\times$ 10	10,036 $\pm$ 2,283	807,304 $\pm$ 333,46	1,472 $\pm$ 0,413	4,032 $\pm$ 1,81

- 20 * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, cuando se compara con el grupo del modelo.

9. Conclusión

- 25 Cuando se compara con la fracción de eyección (50,2 $\pm$ 8,4%) y la fracción de acortamiento (22,4 $\pm$ 4,6%) del grupo de control con modelo, tres niveles de dosis de rhNRG-1 β inyectadas durante 5 días consecutivos pudieron elevar la fracción de eyección (71,1 $\pm$ 12,0%, 64,4 $\pm$ 12,9%, 62,9 $\pm$ 8,4%) y la fracción de acortamiento (36,9 $\pm$ 9,7%, 32,0 $\pm$ 9,5%, 30,3 $\pm$ 6,1%), y había una diferencia significativa entre el grupo con 20 μ g/kg y con 10 μ g/kg, y el grupo de animales modelo ($P < 0,01$), además, los cambios de la fracción de eyección del animal modelo del grupo del fármaco problema pudieron mantenerse durante aproximadamente 35 días después de la administración del fármaco ($P < 0,05$); 20 μ g/kg de rhNRG-1 β pudieron reducir significativamente el área hipóxica isquémica del miocardio, incrementar el número de capilares en la lesión fibrótica ($P < 0,05$); 20 μ g/kg y 10 μ g/kg de rhNRG-1 β

5 pudieron reducir la concentración de la angiotensina I (AI), de la angiotensina II (AII), de la renina (PRA) y de la aldosterona (ALD) en la sangre periférica de los animales modelo, con una diferencia significativa cuando se comparó con el grupo de animales modelo ($P < 0,01$, $P < 0,05$). No había ninguna diferencia significativa entre los que tuvieron 10 días consecutivos de administración del fármaco y los que tuvieron 5 días consecutivos de administración del fármaco ($P < 0,05$).

Los resultados del experimento mostraron que determinada dosis de 20 µg/kg de rhNRG-1β inyectados por vía intravenosa durante 5 días consecutivos pudieron tratar con eficacia la insuficiencia cardíaca de rata ocasionada por la ligadura de la arteria coronaria.

10 Ejemplo 3. Efecto terapéutico de 20 µg/kg de rhNRG-1β sobre la insuficiencia cardíaca ocasionada por la adriamicina en la rata Sprague Dawley®

1. Resumen

Objetivos. Estudiar el efecto terapéutico de 20 µg/kg de rhNRG-1β sobre la miocarditis tóxica ocasionada por la adriamicina en las ratas. Método. Se inyectaron 3,3 mg/kg de adriamicina en la vena de la cola de las ratas Sprague Dawley®, una vez a la semana durante 4 inyecciones consecutivas, este ajuste de adriamicina ocasionó el modelo de miocarditis tóxica de las ratas Sprague Dawley®. Se pusieron en marcha 3 grupos de niveles de dosis de rhNRG-1β, que fueron inyecciones intravenosas de 10, 20 y 40 µg/kg cada día (cd) durante 10 días consecutivos. Se siguió la supervivencia de los animales; al final del experimento, se determinó el índice dinámico del torrente circulatorio, la proporción de masa cardíaca/masa corporal y el examen anatomopatológico del miocardio, y también se determinó la concentración de la troponina T en el suero (cTnT). Resultados. La tasa de supervivencia de las dosis de 40, 20 y 10 µg/kg de rhNRG-1β se incrementó significativamente cuando se comparó con la tasa de supervivencia del 15% de los animales modelo, alcanzó el 85%, 90% y 60% respectivamente, la dp/dt, la -dp/dt y la PVI_{máx} de los grupos de nivel de dosis alto, intermedio y bajo del fármaco problema aumentaron significativamente, la dp/dt alcanzó 5954 ± 689, 6107 ± 418 y 4875 ± 636, respectivamente, la -dp/dt era de -4794 ± 954, -4323 ± 457 y -3672 ± 884, respectivamente, la PVI_{máx} era de 165,7 ± 22,7, 156,1 ± 17,7 y 145 ± 15,2, respectivamente, no había ninguna diferencia significativa cuando se comparó con el grupo de animales modelo ($P < 0,001$), sin que hubiera, además, ninguna diferencia significativa en dp/dt, -dp/dt, PVI_{máx} entre los grupos de dosis de 40 y 20 µg/kg y el grupo de dosis de 10 µg/kg ($P < 0,05$), y era de algún modo dependiente de la dosis; 40, 20 y 10 µg/kg de rhNRG-1β pudieron aliviar con eficacia la gravedad del daño del miocardio en los animales modelo, redujeron la cantidad de troponina T en el suero (cTnT), había 0,025 ± 0,011, 0,031 ± 0,006 y 0,074 ± 0,024, respectivamente, con una diferencia significativa cuando se comparó con la de 0,205 ± 0,072 del grupo del modelo ($P < 0,01$). Conclusión. Con 20 µg/kg de rhNRG-1β se pudo tratar con eficacia el daño del miocardio por toxicidad ocasionado por la adriamicina en la rata.

2. Objetivos del experimento

Estudiar el efecto terapéutico de la rhNRG-1β sobre la miocarditis tóxica ocasionada por la adriamicina en la rata.

3. Fármaco problema

35 La rhNRG-1β, proporcionada por Zensun (Shanghai) Science & Technology Development Co. Ltd. Número de lote: 200110006-2 Especificación: 500 µg/ampolla. Determinación del título: 5000 u/ampolla; Pureza: >95% (HPLC-C8).

4. Animal para el experimento

40 Rata Sprague Dawley®: suministrada por el Centro de Animales para Experimentos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Fudan, número de certificado de competencia animal: Yi Dong Zi 02-22-11. Masa corporal: 250 ± 30 g, macho.

Los animales se dividieron aleatoriamente en grupos, 20 animales en cada grupo, se criaron en jaulas independientes.

La temperatura ambiental de las jaulas era de 18-22 °C, con una humedad relativa del 50-70%.

5. Reactivos y equipamiento

45 Electrofisiógrafo de seis derivaciones, SMUP-C-6, fabricado por el Departamento de Fisiología de la Universidad Médica de Shanghai;

Intercambiador de energía (Japan Photoelectricity Industry Company, NIHON KOHDEN, modelo: TP-400T);

Dispositivo electroquímico para inmunoanálisis automático por luminiscencia (modelo 2010): Roche Diagnostics Co Ltd, número de lote 158468;

50 Balanza electrónica de precisión, (Mater-Tolido Equipment Co Ltd; máx: 610 g, d = 0,01 g); calibradores micrononio (Harbin Measure & Knife Factory, 0,05 mm);

Aguja permanente arteriovenosa, 20Gm producida por la compañía de productos sanitarios Sino-America Weng Zhou Hua Li;

Kit de reactivos para la determinación de la troponina en el suero (Behring Diagnostic Inc.).

6. Método del experimento

5 6.1 Agrupación del experimento

Se pusieron en marcha el grupo de control normal, el grupo de animales modelo y el grupo del fármaco problema;

Grupo del modelo (grupo de control negativo: adriamicina, fabricada por MingZhi Pharmaceuticals; prefectura de economía especial ShanTou (número del lote: 000201; fecha de caducidad: 2003.2);

Grupo del fármaco problema: grupo con rhNRG-1 β .

10 6.2 Ajuste de la dosis, preparación del fármaco problema, vía de administración del fármaco, momentos de administración del fármaco, concentración y volumen del fármaco problema

Del grupo del fármaco problema, se pusieron en marcha 3 niveles de dosis de 10, 20 y 40 μ g/kg. Se disolvieron con 1 ml de agua para la inyección y se ajustaron a la concentración necesaria con el excipiente. El componente principal del excipiente era manitol al 5% para la inyección, seroalbúmina humana al 0,2% para la inyección, solución de tampón de fosfato a 10 mM, suministrada por Zensun (Shanghai) Science & Technology Development Co Ltd. El fármaco problema se preparó antes de la inyección.

La rhNRG-1 β se inyectó en la vena de la cola en un plazo de 24 horas desde la primera inyección de adriamicina, y la inyección de rhNRG-1 β se realizó una vez al día durante 10 días. La dosis se ajustó de acuerdo con la masa corporal, y el volumen del fármaco administrado fue de 0,2 ml/100 g.

20 6.3 Método del experimento

6.3.1 Método de construcción del modelo animal de insuficiencia cardíaca

Sobre la base de la «Guidance Principle of New Drug Preclinical Experiment», 3,3 mg/kg de adriamicina se inyectaron en la vena de la cola, una vez a la semana durante 4 inyecciones consecutivas, y se puso en marcha el modelo de rata con miocarditis tóxica ocasionada por la adriamicina.

25 6.3.2 Experimento farmacodinámico

La rhNRG-1 β se inyectó en la vena de la cola en un plazo de 24 horas desde la primera inyección de adriamicina. Durante el experimento, se monitorizó dinámicamente la supervivencia animal, y los índices de la función cardíaca (tasa máxima de incremento de la presión dentro del ventrículo izquierdo, dt/dp_{máx}, tasa máxima de la disminución de la presión dentro del ventrículo izquierdo, -dp/dt, presión telesistólica del ventrículo izquierdo PVI_{máx}, presión telediastólica del ventrículo izquierdo PVI_{mín}) se monitorizaron a la 5.^a semana. Se realizó el corte histológico del tejido cardíaco y se examinaron los cambios anatomopatológicos.

6.3.3 Índice de observación

6.3.3.1 Tasa de supervivencia

La situación de la supervivencia se registró cada semana y se calculó la tasa de supervivencia de los diferentes grupos experimentales. Tasa de supervivencia (%) = número de animales supervivientes/número de animales experimentales $\times$ 100.

6.3.3.2 Razón de masa cardíaca/masa corporal, corte histológico del tejido cardíaco

Se extirpó el corazón después de la toracotomía (se debe reservar la aurícula), el pesó el corazón después de secarlo con papel absorbente, se calculó la proporción de masa cardíaca/masa corporal; se midió el diámetro externo del corazón a la mitad del corazón puesto en vertical; media parte del ventrículo izquierdo se abrió transversalmente, se midió el grosor máximo de la pared libre del ventrículo izquierdo; se fijó el corazón con formaldehído al 10%, se incluyó en parafina y se tiñó con HE, y se observó la estructura del miocardio al microscopio óptico, lo que le dio una puntuación patológica.

Criterios de la puntuación patológica:

45 Grado 0: Estructura del miocardio normal, sin atrofia ni hipertrofia de los cardiomiocitos, con vacuola, estriación transversal clara; organización regular del miocardio; endocardio y pericardio sin anomalías; ningún cambio en los vasos sanguíneos ni en el tejido intersticial.

Grado 1: Se observó una disolución focal del citoplasma del miocardio y formación de vacuolas en algunas células ocasionales del miocardio, mientras que las células del miocardio circundantes siguen pareciendo normales.

Grado 2: Se observó atrofia, disolución del citoplasma del miocardio y formación de vacuolas con una extensión de pequeña a media del agrupamiento de cardiomiocitos, y también se observó necrosis focal pequeña de los cardiomiocitos.

Grado 3: Gran extensión de la atrofia difusa de los cardiomiocitos, disolución del citoplasma o formación de vacuolas con una necrosis notable. Se pudo realizar una puntuación entre el grado 1 y el grado 2 o entre el grado 3 y el grado 3, p. ej., grado 1,5, grado 2,5, etc.

6.3.3.3 Determinación del índice hemodinámico

- 10 Se midió el índice hemodinámico, tal como tensión en la arteria carótida, tensión intraventricular. Se midió la dp/dt con un fisiógrafo de seis derivaciones. Procedimiento principal: separar la arteria carótida derecha, ligar su extremo distal y bloquear su extremo proximal con pinzas arteriales, se insertó una aguja permanente arteriovenosa de 20G en la arteria carótida, se retiró el estilete medial, se soltaron las pinzas de la arteria, en empujó el trocar de plástico hasta alcanzar la profundidad adecuada, se mantuvo durante 10 minutos, se observó el estilo de la onda registrada
- 15 mediante el fisiógrafo, después de que fuera estable, a continuación se registró la tensión en la arteria carótida y se empujó aún más el trocar al interior del ventrículo izquierdo, se mantuvo en este lugar durante 15 minutos, después de que fuera estable, y a continuación se registraron dp/dt , $-dp/dt$, $PVI_{máx}$ y $PVI_{mín}$.

6.3.3.4 Determinación de la cantidad de troponina T (cTnT) en el suero

- 20 Se extrajeron 2 ml de sangre arterial, se obtuvo el suero, se congeló y se conservó a -20°C , se determinó el contenido de cTnT en el suero con el método electroquímico irradiado enviado a que lo realice el Laboratorio Clínico del Hospital Zhong Shang.

7. Procesamiento de los datos

Los datos se expresaron como $X \pm DE$. Se analizó la diferencia entre grupos con un análisis de varianza monofactorial.

25 8. Resultados del experimento

8.1 La adriamicina pudo inducir la miocarditis tóxica complicada con insuficiencia cardíaca en las ratas

- 30 Véase la tabla 10 y la figura 18. Se inyectaron por vía intravenosa 3,3 mg/kg de adriamicina una vez a la semana durante 4 inyecciones consecutivas, 5 semanas después, la tasa de supervivencia animal era del 15%, se observó un daño significativo en la función cardíaca de las ratas supervivientes, su dp/dt , $-dp/dt$, $PVI_{máx}$, $PVI_{mín}$ eran el 43%, 47%, 58% y 37% del valor normal, respectivamente, la puntuación patológica del tejido del miocardio era $2,33 \pm 0,26$, la tasa de morbilidad relativa era del 100%, la cTnT en el suero se incrementó significativamente y alcanzó los 0,2 ng/ml, lo que demostró que se había puesto en marcha satisfactoriamente la miocarditis tóxica y la insuficiencia cardíaca resultante ocasionadas por la adriamicina en el animal modelo.

Tabla 10. Diferentes índices determinados en el modelo de rata con miocarditis tóxica inducida por la adriamicina

	Grupo de control	Grupo de animales modelo
Tasa de supervivencia (%)	100	15
Puntuación patológica del tejido del miocardio	0	$2,33 \pm 0,26^*$
dp/dt (mmHg/s)	6235 ± 423	$2674 \pm 446^{**}$
$-dp/dt$	-4590 ± 1003	$-2141 \pm 596^{**}$
$PVI_{máx}$ (mmHg)	$181,4 \pm 15,4$	$106,1 \pm 21,2^*$
$PVI_{mín}$	$-27,1 \pm 10,2$	$-10,0 \pm 4,7^{**}$
cTnT (ng/ml)	$0,001 \pm 0,000$	$0,205 \pm 0,072^{**}$
Masa cardíaca/masa corporal	$0,0032 \pm 0,0002$	$0,0031 \pm 0,0001$

Grosor de la pared del ventrículo izquierdo (mm)	1,88 ± 0,15	1,73 ± 0,16
Perímetro del corazón (mm)	31,0 ± 1,1	30,6 ± 0,1

n = 20, X ± DE, cuando se comparó con el grupo normal, análisis de varianza, * $P < 0,05$, ** $P < 0,001$.

En la figura 18 se ilustra el corte histológico del miocardio de la miocarditis tóxica de la rata Sprague Dawley® inducida por la adriamicina; a: grupo de control normal: la puntuación patológica del miocardio era 0, sin atrofia ni hipertrofia de los cardiomiocitos, con formación de vacuolas, se pudo observar con claridad las estrías transversales; el miocardio tenía una organización regular; ninguna anomalía del endocardio ni del pericardio; ningún cambio de los vasos ni del tejido intersticial; b: grupo de los animales modelo: la puntuación patológica del miocardio era 3, gran área de necrosis y disolución de los cardiomiocitos.

8.2 Efecto de la rhNRG-1β sobre la tasa de supervivencia de los animales modelo

Los resultados mostraban que, al extender la duración del experimento, los tres niveles de dosis de rhNRG-1β pudieron reducir significativamente la mortalidad de los animales modelo, y la tasa de supervivencia de los animales modelo del grupo de dosificación de 20 µg/kg llegó a alcanzar el 90% ($P < 0,01$) (figura 19).

8.3 Efecto de la rhNRG-1β sobre la función cardíaca de los animales modelo

Después de la administración del fármaco, aumentó un poco la dp/dt y la PVI_{máx} en todos los animales del grupo del fármaco problema. Mediante el análisis de varianza monofactorial con el programa informático SPSS, la comparación entre grupos mostró que la dp/dt y la -dp/dt de los animales del grupo del fármaco problema eran significativamente mayores que las del grupo de animales modelo ($P < 0,001$), si bien la diferencia no era significativa cuando se compararon con las del grupo de control ($P > 0,05$). Las de los grupos de dosis de 40 y 20 µg/kg eran significativamente más altas que las del grupo de 10 µg/kg ($P < 0,01$); la PVI_{máx} del grupo del fármaco problema (40, 20 y 10 µg/kg) era significativamente más alta que la del grupo de animales modelo ($P < 0,001$), y también, además, la diferencia entre los diferentes grupos del fármaco problema era estadísticamente significativa ($P < 0,05$), lo que demostraba que la rhNRG-1β podía mejorar con eficacia la función cardíaca de los animales modelo y era dependiente de la dosis. Los resultados de los dos experimentos eran coincidentes (tablas 11 y 12).

Tabla 11. Efecto de la rhNRG-1β sobre la función cardíaca de los animales modelo (I)

Grupo	Administración del fármaco	+dp/dt (mmHg/s)	-dp/dt (mmHg/s)	PVI _{máx} (mm Hg)	PVI _{mín} (mmHg)
Grupo de control normal (n = 8)		6235 ± 423**	-4590 ± 1003**	181,4 ± 15,4**	-27,1 ± 10,2**
Grupo del modelo (n = 6)	i.v. cd × 10 d	2674 ± 446	-2141 ± 596	106,1 ± 21,2	-10 ± 4,7
rhNRG-1β a 40 µg/kg (n = 8)	i.v. cd × 10 d	5954 ± 689**	-4794 ± 954**	165,7 ± 22,7**	-27,4 ± 10**
rhNRG-1β a 20 µg/kg (n = 8)	i.v. cd × 10 d	6107 ± 418**	-4323 ± 457**	156,1 ± 17,7**	-26,9 ± 9,7**
rhNRG-1β a 10 µg/kg (n = 8)	i.v. cd × 10 d	4875 ± 636**	-3672 ± 884**	145 ± 15,2**	-24,5 ± 9,6**

* $P < 0,05$; ** $P < 0,001$, cuando se compara con el grupo de los animales modelo.

Tabla 12. Efecto de la rhNRG-1β sobre la función cardíaca de los animales modelo (II)

Muestra	Administración del fármaco	+dp/dt (mmHg/s)	-dp/dt (mmHg/s)	PVI _{máx} (mm Hg)	PVI _{mín} (mmHg)
Grupo normal (n = 8)		5872 ± 342**	-4626 ± 896**	159 ± 25**	-22,7 ± 12*
Grupo de animales modelo (n = 8)	i.v. cd × 10 d	2675 ± 359	-2137 ± 334	103,9 ± 11,5	-11,3 ± 5,4
rhNRG-1β a 40 µg/kg (n = 7)	i.v. cd × 10 d	6041 ± 461**	-4529 ± 274**	166,3 ± 12,4**	-22,2 ± 11,4*

rhNRG-1 β a 20 μ g/kg (n = 7)	i.v. cd $\times$ 10 d	5833 $\pm$ 416**	-4345 $\pm$ 807**	157,7 $\pm$ 12**	-26,6 $\pm$ 7,4*
rhNRG-1 β a 10 μ g/kg (n = 8)	i.v. cd $\times$ 10 d	4956 $\pm$ 352**	-3626 $\pm$ 1056**	158,2 $\pm$ 22,9**	-22,4 $\pm$ 18

* $P < 0,05$; ** $P < 0,001$, cuando se compara con los animales modelo.

8.4 Efecto de la rhNRG-1 β sobre la estructura del miocardio de los animales modelo

La rhNRG-1 β pudo reducir significativamente la gravedad del daño de las células del miocardio en los animales modelo, pudo reducir significativamente la puntuación patológica y la diferencia era estadísticamente significativa cuando se comparó con la del grupo del modelo ($P < 0,01$, $P < 0,05$). En las tablas 13 y 14 y en la figura 20 se muestran los resultados de los dos experimentos.

Figura 20. Efecto de la rhNRG-1 β sobre la estructura del miocardio de los animales modelo

a: La puntuación patológica del miocardio del modelo animal era de 3, con gran área de necrosis y disolución de las células del miocardio; b: grupo del fármaco problema a 40 μ g/kg, la puntuación patológica del miocardio era 1, la mayoría de las células del miocardio eran normales, había disolución local y esporádica del citoplasma del miocardio en algunas de las células del miocardio; c: grupo del fármaco problema a 20 μ g/kg, la puntuación patológica del miocardio era 1, la mayoría de las células del miocardio eran normales, había una disolución local y esporádica del citoplasma del miocardio en algunas de las células del miocardio; d: grupo del fármaco problema a 130 μ g/kg, la puntuación patológica del miocardio era 1,5, se observó degeneración de las vacuolas en un agrupamiento pequeño de células del miocardio.

Tabla 13. Efecto de la rhNRG-1 β sobre los cambios patológicos del miocardio de los animales modelo (I)

Grupo	Administración del fármaco	Puntuación patológica
Grupo normal (n = 6)		0,00 $\pm$ 0,00**
Grupo de modelo (n = 6)	i.v. cd $\times$ 10 d	2,33 $\pm$ 0,26
rhNRG-1 β a 40 μ g/kg (n = 6)	i.v. cd $\times$ 10 d	0,33 $\pm$ 0,41**
rhNRG-1 β a 20 μ g/kg (n = 6)	i.v. cd $\times$ 10 d	1,17 $\pm$ 0,93*
rhNRG-1 β a 10 μ g/kg (n = 6)	i.v. cd $\times$ 10 d	1,83 $\pm$ 0,41*

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ cuando se compara con el grupo de los animales modelo.

Tabla 14. Efecto de la rhNRG-1 β sobre los cambios patológicos del miocardio de los animales modelo (II)

Grupo	Administración del fármaco	Puntuación patológica
Grupo normal (n = 6)		0 $\pm$ 0**
Grupo del animal modelo (n = 6)	i.v. cd $\times$ 10 d	2,75 $\pm$ 0,274
rhNRG-1 β a 40 μ g/kg (n = 6)	i.v. cd $\times$ 10 d	0,583 $\pm$ 0,204**
rhNRG-1 β a 20 μ g/kg (n = 6)	i.v. cd $\times$ 10 d	1,667 $\pm$ 0,931*
rhNRG-1 β a 10 μ g/kg (n = 6)	i.v. cd $\times$ 10 d	2,167 $\pm$ 0,516*

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$, cuando se compara con el grupo de los animales modelo.

20 8.5 Efecto de la rhNRG-1 β sobre la cTnT del suero de los animales modelo

Después de la administración del fármaco, el contenido de cTnT en el suero se redujo significativamente en cada grupo de animales, y la cTnT en el suero de los grupos de nivel de dosis alto, intermedio y bajo era significativamente más baja que la del grupo del modelo ($P < 0,001$). Los resultados de los dos experimentos eran coincidentes (tablas 15 y 16).

Tabla 15. Efecto de la rhNRG-1 β sobre la cTnT del suero de los animales modelo (I)

Grupo	Administración del fármaco	cTnT (ng/ml)
Grupo normal (n = 5)		0,001 $\pm$ 0,000**
Grupo del modelo (n = 6)	i.v. cd $\times$ 10 d	0,205 $\pm$ 0,072
rhNRG1 β a 40 μ g/kg (n = 6)	i.v. cd $\times$ 10 d	0,025 $\pm$ 0,011**
rhNRG-1 β a 20 μ g/kg (n = 6)	i.v. cd $\times$ 10 d	0,031 $\pm$ 0,006**
rhNRG-1 β a 10 μ g/kg (n = 6)	i.v. cd $\times$ 10 d	0,074 $\pm$ 0,024**

** $P < 0,001$ cuando se compara con el grupo del modelo.

Tabla 16. Efecto de la rhNRG-1 β sobre la cTnI del suero de los animales modelo (II)

Grupo	Administración del fármaco	cTnI (ng/ml)
Grupo normal (n = 6)		0,433 $\pm$ 0,079**
Grupo del modelo (n = 6)	i.v. cd $\times$ 10 d	20,525 $\pm$ 20,638
rhNRG-1 β a 40 μ g/kg (n = 6)	i.v. cd $\times$ 10 d	0,874 $\pm$ 0,108**
rhNRG-1 β a 20 μ g/kg (n = 6)	i.v. cd $\times$ 10 d	1,677 $\pm$ 0,589**
rhNRG-1 β a 10 μ g/kg (n = 6)	i.v. cd $\times$ 10 d	8,342 $\pm$ 13,537**

** $P < 0,001$ cuando se compara con el grupo de los animales modelo.

5 8.6 Efecto de la rhNRG-1 β sobre el tamaño del corazón de los animales modelo

En las tablas 17 y 18 se muestran los resultados de los dos experimentos. No había un cambio significativo en los parámetros físicos del corazón de los grupos del fármaco problema, y la diferencia no era estadísticamente significativa entre los grupos ($P > 0,05$).

Tabla 17. Efecto de la rhNRG-1 β sobre el tamaño del corazón de los animales modelo (I)

Grupo	Administración del fármaco	Masa cardíaca/masa corporal	Grosor de la pared del ventrículo izquierdo (mm)
Grupo normal (n = 20)		0,0032 $\pm$ 0,0002	2,01 $\pm$ 0,07**
Grupo de animales modelo (n = 6)	i.v. cd $\times$ 10 d	0,0031 $\pm$ 0,0001	1,717 $\pm$ 0,154
rhNRG-1 β a 40 μ g/kg (n = 16)	i.v. cd $\times$ 10 d	0,0031 $\pm$ 0,0002	1,813 $\pm$ 0,12
rhNRG-1 β a 20 μ g/kg (n = 18)	i.v. cd $\times$ 10 d	0,0032 $\pm$ 0,0001	1,789 $\pm$ 0,133
rhNRG-1 β a 10 μ g/kg (n = 13)	i.v. cd $\times$ 10 d	0,00301 $\pm$ 0,0002	1,773 $\pm$ 0,115

10 ** $P < 0,01$, cuando se compara con el grupo de los animales modelo.

Tabla 18. Efecto de la rhNRG-1 β sobre el tamaño del corazón de los animales modelo (II)

Grupo	Administración del fármaco	Masa cardíaca/masa corporal	Grosor de la pared del ventrículo izquierdo (mm)
Grupo normal (n = 20)		0,00310 $\pm$ 0,000	2,19 $\pm$ 0,2**
Grupo del modelo (n = 10)	i.v. cd $\times$ 10 d	0,00298 $\pm$ 0,000	2,065 $\pm$ 0,17
rhNRG-1 β a 40 μ g/kg (n = 18)	i.v. cd $\times$ 10 d	0,00297 $\pm$ 0,000	2,06 $\pm$ 0,2
rhNRG-1 β a 20 μ g/kg (n = 19)	i.v. cd $\times$ 10 d	0,00303 $\pm$ 0,000	2,15 $\pm$ 0,24
rhNRG-1 β a 10 μ g/kg (n = 16)	i.v. cd $\times$ 10 d	0,00307 $\pm$ 0,000	2,18 $\pm$ 0,21

** $P < 0,01$, cuando se compara con el grupo de los animales modelo.

9. Conclusión

- La tasa de supervivencia se pudo mejorar significativamente con 40, 20 y 10 μ g/kg de rhNRG-1 β , que alcanzó el 85%, 90% y 60%, respectivamente, cuando se comparó con la tasa de supervivencia del 15% del grupo del modelo; se incrementaron significativamente la dp/dt, la -dp/dt y la PVI máx del grupo de nivel de dosis alto, intermedio y bajo, en donde la dp/dt era 5954 $\pm$ 689, 6107 $\pm$ 418, 4875 $\pm$ 636, respectivamente, la -dp/dt era -4794 $\pm$ 954, -4323 $\pm$ 457, -3672 $\pm$ 884, respectivamente, y la PVI máx era 165,7 $\pm$ 22,7, 156,1 $\pm$ 17,7, 145 $\pm$ 15,2, respectivamente, había una diferencia significativa cuando se comparó con la del grupo de control ($P < 0,001$), además, dp/dt, -dp/dt y PVI máx del grupo de dosis de 40 y 20 μ g/kg diferían significativamente de los del grupo de 10 μ g/kg ($<0,05$) y era en cierto modo dependiente de la dosis; los tres niveles de dosis de 40, 20 y 10 μ g/kg de rhNRG-1 β pudieron aliviar con eficacia la gravedad del daño del miocardio en el animal modelo, reducir el contenido de troponina T en el suero (cTnT), que era de 0,025 $\pm$ 0,011, 0,031 $\pm$ 0,006 y 0,074 $\pm$ 0,024, respectivamente; cuando se comparó con 0,205 $\pm$ 0,072 del grupo de los animales modelo, había una diferencia significativa ($P < 0,01$).
- Los resultados del experimento mostraban que la rhNRG-1 β podía tratar con eficacia la lesión tóxica del miocardio ocasionada por la adriamicina en las ratas a través de la reducción de la liberación al suero de la cTnT y la necrosis de las fibras del miocardio, mejora de la función contráctil del corazón, y reducción de la mortalidad animal.

Ejemplo 4. Efecto terapéutico de la rhNRG-1 β sobre la lesión aguda del miocardio ocasionada por la infección vírica en los ratones.

20 1. Resumen

- Objetivos. Estudiar el efecto terapéutico de la rhNRG-1 β sobre la lesión aguda del miocardio ocasionada por la infección vírica del Coxsackie B3. Método. Se puso en marcha el modelo de miocarditis vírica aguda en los ratones mediante inyección intraabdominal del virus Coxsackie B3 (CVB $_3$). Los animales modelo se dividieron aleatoriamente en grupos, a saber, grupo de control normal, grupo del modelo, grupo del fármaco problema, con 20 animales en cada grupo. Se estableció la concentración de las tres dosis en 30, 15 y 7,5 μ g/kg de rhNRG-1 β , y se llevó a cabo la inyección en la vena de la cola el mismo día, durante 5 días consecutivos. Durante el experimento, se vigiló la tasa de supervivencia en los animales. Se comprobó el funcionamiento del corazón (ecocardiografía) el 7.º día y se sacrificaron los animales el 8.º día, se extrajo el suero para determinar la concentración de troponina I (cTnI) y se realizó el examen anatomopatológico del corazón. Resultados. El valor de la FE (90,2 $\pm$ 2,5%, 86,0 $\pm$ 2,9%) y el valor de la FS (55,7 $\pm$ 2,1%, 50,7 $\pm$ 4,3%) del grupo de 30 μ g/kg y el de 15 μ g/kg se incrementó significativamente; había una diferencia significativa cuando se comparó con el grupo del modelo ($P < 0,001$), valor de DdVI (0,187 $\pm$ 0,006, 0,189 $\pm$ 0,008) y el valor de DsVI (0,085 $\pm$ 0,009, 0,099 $\pm$ 0,027) eran significativamente más bajos que los del grupo del modelo (0,208 $\pm$ 0,015, 0,142 $\pm$ 0,020) ($P < 0,05$); la rhNRG-1 β pudo aliviar la gravedad de la lesión patológica del miocardio, reducir de manera eficaz la concentración de troponina (cTnI) en el suero, la cTnI del grupo de dosis de 30 μ g/kg (7,98 $\pm$ 6,07 ng/ml) y del grupo de 15 μ g/kg (19,43 $\pm$ 10,76 ng/ml) eran significativamente más bajas que la del grupo del modelo (44,44 $\pm$ 12,39 ng/ml), y la diferencia entre ellas era estadísticamente significativa ($P < 0,001$, $P < 0,005$); 30 μ g/kg de rhNRG-1 β pudieron mejorar significativamente la tasa de supervivencia de los animales modelo, y alcanzar el 80%, $P < 0,05$. Conclusión. Determinada dosis de rhNRG-1 β pudo tratar con eficacia la lesión aguda del miocardio ocasionada por la infección vírica.

40 2. Objetivos del experimento

Estudiar el efecto terapéutico de la rhNRG-1 β sobre la lesión aguda del miocardio ocasionada por la infección vírica en los ratones y averiguar la dosis eficaz opcional.

3. Fármaco problema

La rhNRG-1 β , proporcionada por Zensun (Shanghai) Science & Technology Development. Número de lote: 20110006-2. Título: 5000u; pureza: >95% (HPLC-C8).

4. Animal para el experimento

- 5 4.1 Especie, origen y certificado de competencia: ratones BALB/C de raza pura de 4 semanas de edad, suministrados por el Departamento de Animales para Experimentos de la Universidad de Fudan, número de certificado de la competencia del animal: Yi Dong Zi 22-9.

4.2 Masa corporal y sexo: 10-12 g, macho.

4.3 Número de animales en cada grupo: 20 animales en cada grupo experimental, 10 en el grupo de control normal.

10 5. Virus

Virus Coxsackie B3, CVB₃, cepa Nancy, suministrada por el Laboratorio Ministerial de Cardiopatías Víricas (Instituto Municipal de Enfermedades Cardiovasculares de Shanghai).

6. Reactivos y equipamiento

6.1 Ecocardiógrafo, Hewlett Packard sonos 5500; tipo de la sonda: S12';

- 15 6.2 Sistema de inmunoensayo Opus® Plus, producido por Behring Diagnostic Inc. para determinar la troponina I en el suero (cTnl), número de lote: CTE8;

6.3 Balanza electrónica de precisión, KERN 822;

6.4 Agua para inyección, Zang Jiang Andus Bioproduct Co Ltd, 10 × 5 ml, número de lote: 0112180;

6.5 Depilador, sulfuro de sodio al 8%, planta química de GuangDong XiLong, número de lote: 010622.

20 7. Método del experimento

7.1 Grupos para el experimento

Se pusieron en marcha el grupo de control normal, el grupo del modelo, el grupo del fármaco problema y el grupo de control con placebo;

- 25 El grupo del modelo era el grupo de control negativo (n = 20): se le administró la solución del tampón preparado (PB a 10 mN, seroalbúmina humana al 0,2%, manitol al 5%);

Grupo del fármaco problema (n = 20): se dividió en los grupos de los niveles de dosis alto, intermedio y bajo de rhNRG-1 β ;

Grupo de control con placebo (n = 20): inyección intraabdominal de sobrenadante celular congelado y descongelado sin CVB₃, 0,2 ml/animal.

- 30 7.2 Ajuste de la dosis, preparación del fármaco problema, vía de administración del fármaco, momentos de administración del fármaco, concentración y volumen del fármaco problema

Se pusieron en marcha tres niveles de dosis de 30, 15 y 7,5 μ g/kg del grupo del fármaco problema basándose en los resultados del experimento preliminar. Se diluyó con la solución del tampón de preparación (PB a 10 mM, seroalbúmina humana al 0,2%, manitol al 5%) hasta la concentración necesaria. La administración del fármaco al

- 35 grupo del fármaco problema y al grupo del modelo era por inyección intravenosa en la vena de la cola de los ratones, una vez cada día (cd), durante 5 días consecutivos, y el volumen de cada uno de los fármacos administrados era de 0,2 ml/animal.

7.3 Método del experimento

7.3.1 Puesta en marcha del modelo animal de miocarditis vírica aguda en los ratones

- 40 Se inyectaron por vía intraabdominal 0,2 ml de CVB₃ a 100 × TCID₅₀ proporcionado por el Hospital de Zhong Shan afiliado a la Universidad de Fudan y se puso en marcha el modelo de miocarditis. A la semana siguiente, el ratón manifestó horripilación, depilación, escualidez, torpeza y muerte, y aproximadamente la mitad de los animales probados murieron el 8.º día.

7.3.2 Experimento farmacodinámico

- 45 La inyección intravenosa del fármaco problema en la vena de la cola se realizó el mismo día de la infección vírica

intraabdominal en los ratones, la inyección se realizó durante 5 días consecutivos, se monitorizó la tasa de supervivencia de los animales, después de completar el experimento, se llevaron a cabo la ecocardiografía, el examen anatomopatológico del miocardio y la cantidad de troponina en el suero.

7.3.3 Índice de observación

5 7.3.3.1 Medición de la función cardíaca en los ratones

Se les depiló el tórax al 7.º día de la inyección vírica, a continuación, el ratón se sujetó a un soporte fijo fabricado especialmente y se le realizó la ecocardiografía con una sonda de alta frecuencia S12, en donde el índice principal incluía:

10 FE: fracción de eyección del ventrículo izquierdo, que es el índice que mejor refleja la función de eyección del ventrículo izquierdo;

FS: fracción de acortamiento del ventrículo, índice que refleja la función de contracción del ventrículo izquierdo;

DdVI: diámetro diastólico interno máximo del ventrículo izquierdo (cm);

DsVI: diámetro sistólico interno mínimo del ventrículo izquierdo (cm).

7.3.3.2 Determinación de la troponina I (cTnI) en el suero de los ratones

15 Se evaluó la gravedad de la lesión del miocardio mediante la determinación de la cantidad de cTnI liberada al suero, con la ventaja de la alta especificidad y de la alta sensibilidad cuando se compara con otro índice tradicional, tal como CK, LDH y AST. Por lo tanto, se utilizó la determinación del contenido de cTnI en el suero como un índice objetivo que refleja la gravedad de la lesión del miocardio.

20 Al 8.º día de la inyección vírica, se midió la masa corporal de los ratones y se extrajo sangre de la órbita ocular, se separó el suero, se conservó en un congelador a -20°C y se determinó la cTnI sérica mediante una reacción luminosa.

7.3.3.3 Examen anatomopatológico del miocardio de los ratones

El examen anatomopatológico lo realizó el Departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de Shanghai afiliada a la Universidad de Fudan.

25 Los ratones que sobrevivieron se sacrificaron por dislocación de la columna cervical, se les realizó la toracotomía aséptica y se les extirpó el corazón, se pesó dicho corazón y se colocó el miocardio en formaldehído para la fijación, se incluyó en parafina, se realizaron cortes consecutivos y se les realizó el examen anatomopatológico, se observó una infiltración de las células inflamatorias en el miocardio, degeneración y necrosis. Basándose en el Principio de las Directrices de Evaluación de Nuevos Fármacos, los criterios de puntuación patológica se definieron como sigue:

30 Puntuación 0: El área de la lesión representa el 0%;

Puntuación 1: El área de la lesión representa el 25%;

Puntuación 2: El área de la lesión representa el 50%;

Puntuación 3: El área de la lesión representa el 75%;

Puntuación 4: El área de la lesión representa el 100%;

35 La puntuación se pudo realizar entre la puntuación 1 y la puntuación 2, o entre la puntuación 2 y la puntuación 3, p. ej., cuando el área de la lesión era del 80%, se puntuó como puntuación 3,2.

7.3.3.4 Observación de la supervivencia de los ratones

Se monitorizó los animales modelo que morían entre los diferentes grupos del fármaco problema.

8. Procesamiento de datos

40 Para el procesamiento de los datos se utilizó la prueba de la t por parejas de los datos relevantes.

9. Resultados

9.1 Efecto de la rhNRG-1 β sobre la función cardíaca de los ratones infectados con virus

Los resultados mostraron que tanto el valor de la FE ($67,1 \pm 9,9\%$) como el valor de la FS ($32,0 \pm 7,2\%$) eran significativamente más bajos que el valor normal (FE, $92,5 \pm 2,3\%$ / FS, $59,2 \pm 3,1\%$), $P < 0,05$; se incrementaron

45 significativamente el valor de la FE ($90,2 \pm 2,5\%$, $86,0 \pm 2,9\%$) y el valor de la FS ($55,7 \pm 2,1\%$, $50,7 \pm 4,3\%$) de los

grupos de 30 µg/kg y de 15 µg/kg de rhNRG-1β, había una diferencia significativa cuando se comparó con los del grupo del modelo ($P < 0,01$). La FE/FS del grupo de 7,5 µg/kg no tenía ninguna diferencia significativa con la del grupo del modelo ($P > 0,05$).

- El valor del DdVI ($0,208 \pm 0,015$ cm) y el valor del DsVI ($0,142 \pm 0,020$ cm) del grupo del modelo eran significativamente mayores que los del grupo de control normal (DdVI, $0,179 \pm 0,007$ cm / DsVI, $0,073 \pm 0,006$ cm) y había una diferencia significativa entre ellos ($P < 0,01$). El DdVI y el DsVI de los grupos de 30 µg/kg y de 15 µg/kg de rhNRG-1β eran significativamente más bajos que los del grupo del modelo ($P < 0,05$), mientras que los de 7,5 µg/kg diferían de manera insignificante de los del grupo del modelo ($P > 0,05$). Las tablas 19 y 20 muestran los resultados de los 2 experimentos repetidos.
- 10 Tabla 19. Determinación de los parámetros de la función cardíaca tras 5 días de administración del fármaco en los ratones infectados con virus (I)

Grupo	Pauta de administración del fármaco	DdVI (cm)	DsVI (cm)	FE (%)	FS (%)
Grupo del control normal		$0,179 \pm 0,007^{**}$	$0,073 \pm 0,006^{**}$	$92,5 \pm 2,3^{**}$	$59,2 \pm 3,1^{**}$
Grupo del modelo	i.v. cd × 5	$0,208 \pm 0,015$	$0,142 \pm 0,020$	$67,1 \pm 9,9$	$32,0 \pm 7,2$
rhNRG-1β a 30 µg/kg	i.v. cd × 5	$0,187 \pm 0,006^{**}$	$0,085 \pm 0,009^{**}$	$90,2 \pm 2,5^{**}$	$55,7 \pm 2,1^{**}$
rhNRG-1β a 15 µg/kg	i.v. cd × 5	$0,189 \pm 0,008^{*}$	$0,099 \pm 0,027^{*}$	$81,3 \pm 6,28^{*}$	$44,5 \pm 8,27^{*}$
rhNRG-1β a 7,5 µg/kg	i.v. cd × 5	$0,191 \pm 0,012$	$0,114 \pm 0,028$	$78,1 \pm 9,3$	$41,7 \pm 9,6$

En cada uno de los datos descritos más arriba, cada grupo (n = 6) se analizó mediante ANOVA de un factor con SPSS y se comparó con el grupo del modelo, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

- Tabla 20. Determinación de los parámetros de la función cardíaca tras 5 días de administración del fármaco en los ratones infectados con virus (II)

Grupo	Pauta de administración del fármaco	DdVI (cm)	DsVI (cm)	FE (%)	FS (%)
Grupo del control normal		$0,189 \pm 0,008^{**}$	$0,069 \pm 0,006^{**}$	$94,5 \pm 0,56^{**}$	$63,7 \pm 3,01^{**}$
Grupo del modelo	i.v. cd × 5	$0,232 \pm 0,023$	$0,159 \pm 0,031$	$63,1 \pm 18,47$	$30,3 \pm 10,75$
rhNRG-1β a 30 µg/kg	i.v. cd × 5	$0,196 \pm 0,011^{**}$	$0,094 \pm 0,011^{**}$	$87,7 \pm 3,76^{**}$	$51,8 \pm 5,24^{**}$
rhNRG-1β a 15 µg/kg	i.v. cd × 5	$0,201 \pm 0,011^{*}$	$0,114 \pm 0,018^{*}$	$81,6 \pm 4,59^{*}$	$44,9 \pm 5,68^{*}$
hNRG-1β a 7,5 µg/kg	i.v. cd × 5	$0,213 \pm 0,009$	$0,133 \pm 0,015$	$71,9 \pm 6,69$	$35,7 \pm 5,60$

En cada uno de los datos descritos más arriba, cada grupo (n = 6), se analizó mediante ANOVA de un factor con SPSS y se comparó con el grupo del modelo, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

9.2 Efecto de la rhNRG-1β sobre la cTnI sérica de ratones infectados con virus

- Los resultados mostraron que la cTnI del grupo del modelo ($44,44 \pm 12,39$ ng/ml) era significativamente más alta que la del grupo de control ($3,28 \pm 4,55$ ng/ml), que la del grupo de 30 µg/kg de rhNRG-1β ($7,98 \pm 6,07$ ng/ml) era significativamente más baja que la del grupo del modelo ($P < 0,01$); la cTnI del grupo de rhNRG-1β a 15 µg/kg ($19,43 \pm 10,76$ ng/ml) difería significativamente de la del grupo del modelo ($P < 0,05$), mientras que no había ninguna diferencia estadísticamente significativa entre la cTnI del grupo de rhNRG-1β a 7,5 µg/kg ($29,05 \pm 17,06$ ng/ml) y la del grupo del modelo. En las tablas 21 y 22 se muestran los resultados de los dos experimentos.

Tabla 21. Efecto de la rhNRG-1 β sobre el contenido de cTnI en el suero (ng/ml) en los ratones infectados con virus (I)

Grupo	Pauta de administración del fármaco	cTnI (ng/ml) Media $\pm$ DE
Grupo de control normal		3,28 $\pm$ 4,55**
Grupo del modelo	i.v. cd $\times$ 5	44,44 $\pm$ 12,39
rhNRG-1 β a 30 μ g/kg	i.v. cd $\times$ 5	7,98 $\pm$ 6,07**
rhNRG-1 β a 15 μ g/kg	i.v. cd $\times$ 5	19,43 $\pm$ 10,76*
rhNRG-1 β a 7,5 μ g/kg	i.v. cd $\times$ 5	29,05 $\pm$ 17,06
Grupo de control con placebo		3,75 $\pm$ 2,36**

En cada uno de los datos descritos más arriba, cada grupo n = 6, se analizó mediante pruebas no paramétricas con SPSS (pruebas de muestras independientes) y se comparó con el grupo del modelo, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

5 Tabla 22. Efecto de la rhNRG-1 β sobre el contenido de cTnI en el suero (ng/ml) en los ratones infectados con virus (II)

Grupo	Pauta de administración del fármaco	cTnI (ng/ml) Media $\pm$ DE
Grupo normal		0,19 $\pm$ 0,06**
Grupo del modelo	i.v. cd $\times$ 5	34,05 $\pm$ 16,50
rhNRG-1 β a 30 μ g/kg	i.v. cd $\times$ 5	0,54 $\pm$ 0,53**
rhNRG-1 β a 15 μ g/kg	i.v. cd $\times$ 5	15,59 $\pm$ 14,94*
rhNRG-1 β a 7,5 μ g/kg	i.v. cd $\times$ 5	26,85 $\pm$ 15,20
Grupo de control con placebo		14 $\pm$ 0,03**

En cada uno de los datos descritos más arriba, cada grupo n = 6, se analizó mediante pruebas no paramétricas con SPSS (pruebas de muestras independientes) y se comparó con el grupo del modelo, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

9.3 Efecto de la rhNRG-1 β sobre la lesión del miocardio de los ratones infectados con virus

10 Los resultados del experimento mostraron que la puntuación patológica del miocardio del grupo normal era de 0,0 $\pm$ 0,00, la puntuación patológica del miocardio del grupo del modelo era de 2,22 $\pm$ 0,97, y había una diferencia significativa entre ellos ($P < 0,01$). La puntuación patológica del nivel de dosis alto e intermedio de la rhNRG-1 β disminuyó significativamente (0,56 $\pm$ 0,47 y 0,73 $\pm$ 0,58, respectivamente) y era significativamente diferente de la del grupo del modelo ($P < 0,001$), sin que hubiera ninguna diferencia significativa entre la del grupo de nivel de dosis bajo y la del grupo del modelo ($P > 0,05$). En las tablas 23 y 24 y en las figuras 21 y 22 se muestran resultados de
15 los dos experimentos.

Tabla 23. Efecto de la rhNRG-1 β sobre los cambios patológicos del miocardio en los ratones infectados con virus (I)

Grupo	Pauta de administración del fármaco	Puntuación patológica Media $\pm$ DE
Grupo de control normal (n = 10)		0,00 $\pm$ 0,00**
Grupo del modelo (n = 10)	i.v. cd $\times$ 5	2,22 $\pm$ 0,97
rhNRG-1 β a 30 μ g/kg (n = 17)	i.v. cd $\times$ 5	0,56 $\pm$ 0,47**

rhNRG-1 β a 15 μ g/kg (n = 13)	i.v. cd $\times$ 5	0,73 $\pm$ 0,58**
rhNRG-1 β a 7,5 μ g/kg (n = 10)	i.v. cd $\times$ 5	1,52 $\pm$ 0,74
Grupo de control con placebo (n = 10)		0,00 $\pm$ 0,00**

En cada uno de los datos descritos más arriba, cada grupo n = 6, se analizó mediante pruebas no paramétricas con SPSS (pruebas de muestras independientes) y se comparó con el grupo del modelo, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Tabla 24. Efecto de la rhNRG-1 β sobre los cambios patológicos del miocardio en los ratones infectados con virus (II)

Grupo	Pauta de administración del fármaco	Puntuación patológica Media $\pm$ DE
Grupo de control normal (n = 10)		0,00 $\pm$ 0,00**
Grupo del modelo (n = 10)	i.v. cd $\times$ 5	2,03 $\pm$ 1,44
rhNRG-1 β a 30 μ g/kg (n = 17)	i.v. cd $\times$ 5	0,23 $\pm$ 0,26**
rhNRG-1 β a 15 μ g/kg (n = 13)	i.v. cd $\times$ 5	0,57 $\pm$ 0,58**
rhNRG-1 β a 7,5 μ g/kg (n = 10)	i.v. cd $\times$ 5	1,34 $\pm$ 1,16
Grupo de control con placebo (n = 10)		0,00 $\pm$ 0,00**

En cada uno de los datos descritos más arriba, cada grupo n = 6, se analizó mediante pruebas no paramétricas con SPSS (pruebas de muestras independientes) y se comparó con el grupo del modelo, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

9.4 Efecto de la rhNRG-1 β sobre la tasa de supervivencia de los ratones infectados con virus

En las tablas 25 y 26 se muestran los resultados de los dos experimentos. Una semana después de la inyección del virus, la tasa de supervivencia de los ratones en el grupo del modelo era del 50% y del 55%, respectivamente, mientras que después de la inyección de la rhNRG-1 β , aumentaron hasta el 85% y el 80% (30 μ g/kg) y el 70% y el 65% (15 μ g/kg).

Tabla 25. Efecto de la rhNRG-1 β sobre la tasa de supervivencia de los ratones infectados con virus (I)

Grupo	Administración del fármaco	Número de animales supervivientes (tasa en % de la supervivencia relativa)							
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Sacrif.
Grupo de control normal (n = 10)		10 100%	10 100%	10 100%	10 100%	10 100%	10 100%	10 100%	10** 100%
Grupo del moldeo (n = 20)		20 100%	20 100%	20 100%	18 90%	17 85%	14 70%	11 55%	10 50%
rhNRG-1 β a 30 μ g/kg (n = 20)	i.v. cd $\times$ 5	20 100%	20 100%	20 100%	20 100%	20 100%	18 90%	17 85%	16* 80%
rhNRG-1 β a 15 μ g/kg (n = 20)	i.v. cd $\times$ 5	20 100%	20 100%	20 100%	20 100%	19 95%	17 85%	14 70%	13 65%
rhNRG-1 β a 5 μ g/kg (n = 20)	i.v. cd $\times$ 5	20	20	20	19	18	15	13	10

		100%	100%	100%	95%	90%	75%	65%	50%
Grupo de control con placebo (n = 20)		20	20	20	20	20	20	20	20**
		100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Los datos descritos más arriba se procesaron con el programa informático SPSS, análisis de tablas de supervivencia, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, cuando se compararon con los del grupo de control.

Tabla 26. Efecto de la rhNRG-1 β sobre la tasa de supervivencia de los ratones infectados con virus (II)

Grupo	Administración del fármaco	Número de animales supervivientes (tasa en % de la supervivencia relativa)							
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Sacrif.
Grupo de control normal (n = 10)		10	10	10	10	10	10	10	10**
		100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Grupo del modelo (n = 20)	i.v. cd $\times$ 5	20	20	20	18	15	13	10	10
		100%	100%	100%	90%	75%	65%	50%	50%
rhNRG-1 β a 30 μ g/kg (n = 20)	i.v. cd $\times$ 5	20	20	20	20	19	18	17	17*
		100%	100%	100%	100%	95%	90%	85%	85%
rhNRG-1 β a 15 μ g/kg (n = 20)	i.v. cd $\times$ 5	20	20	20	19	18	16	13	13
		100%	100%	100%	95%	90%	80%	65%	65%
rhNRG-1 β a 7,5 μ g/kg (n = 20)	i.v. cd $\times$ 5	20	20	20	18	17	14	11	10
		100%	100%	100%	90%	85%	70%	55%	50%
rhNRG-1 β a 7,5 μ g/kg (n = 20)		20	20	20	20	20	20	20	20**
		100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Los datos descritos más arriba se procesaron con el programa informático SPSS, análisis de tablas de supervivencia, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, cuando se compararon con el grupo de control.

9. Conclusión

Se incrementaron significativamente el valor de la FE ($90,2 \pm 2,5\%$, $86,0 \pm 2,9\%$) y el valor de la FS ($55,7 \pm 2,1\%$, $50,7 \pm 4,3\%$) de los grupos de rhNRG-1 β a 30 μ g/kg y a 15 μ g/kg, y había una diferencia significativa cuando se comparó con el grupo del modelo ($P < 0,02$), tanto el valor del DdVI ($0,187 \pm 0,006$, $0,189 \pm 0,008$) como el valor del DsVI ($0,085 \pm 0,009$, $0,099 \pm 0,027$) eran más bajos que los del grupo del modelo ($0,208 \pm 0,015$, $0,142 \pm 0,020$), $P < 0,05$; la rhNRG-1 β pudo aliviar la gravedad del daño patológico del miocardio de los animales del grupo del modelo, redujo con eficacia la concentración de troponina I (cTnI) en el suero, el contenido de cTnI del grupo de nivel de dosis de 30 μ g/kg ($7,98 \pm 6,07$ ng/ml) y del grupo de nivel de dosis de 15 μ g/kg ($19,43 \pm 10,76$ ng/ml) eran significativamente más bajos que los del grupo del modelo ($44,44 \pm 12,39$ ng/ml) y había una diferencia significativa entre ellos ($P < 0,001$, $P < 0,005$); la rhNRG-1 β a 30 μ g/kg pudo mejorar significativamente la tasa de supervivencia de los animales del grupo del modelo y alcanzó el 80% cuando se comparó con la tasa de supervivencia del 50% de los animales del grupo del modelo, $P < 0,05$.

Los resultados del experimento mostraron que un nivel de dosis de 30 μ g/kg de rhNRG-1 β podría tratar con eficacia la lesión aguda del miocardio ocasionada por la infección vírica en los ratones

Ejemplo 5. Observación del efecto terapéutico de la rhNRG-1 β sobre la lesión aguda del miocardio de los ratones ocasionada por una infección vírica (II)

1. Resumen

Objetivos. Estudiar el tiempo de administración eficaz del fármaco de la rhNRG-1 β para el tratamiento de la lesión aguda del miocardio en los ratones ocasionada por una infección vírica. Método. Se puso en marcha el modelo animal de lesión aguda del miocardio mediante una inyección intraabdominal del virus Coxsackie B₃ (CVB₃) en los ratones. Los animales modelo se dividieron aleatoriamente en grupos, a saber, grupo de control normal, grupo del modelo, grupo del fármaco problema, y se asignaron 20 animales a cada grupo. Se inyectaron 30 μ g/kg de rhNRG-1 β en la vena de la cola durante 3, 5 y 7 días consecutivos, respectivamente. Durante el experimento, se monitorizó la tasa de supervivencia de los animales, se realizó la ecocardiografía el 7.º día y los animales se sacrificaron el 8.º día, se separó el suero para determinar la concentración de cTnI, y se realizó el examen anatomopatológico del corazón. Resultados. La inyección consecutiva de 30 μ g/kg de rhNRG-1 β durante 3, 5 y 7 días pudo incrementar el valor de la FE/FS y había una diferencia significativa ($P < 0,001$) al comparar el valor de la FE/FS de los grupos del fármaco problema durante 5 días y durante 7 días ($86,8 \pm 4,4\%$ / $51,9 \pm 5,8\%$, $87,0 \pm 3,3\%$ / $51,8 \pm 5,1\%$) con el valor de la FE/FS del grupo del modelo ($66,5 \pm 5,6$ / $31,8 \pm 3,7$), el valor del DsVI del grupo del fármaco problema durante 5 días y durante 7 días disminuyó significativamente (al ser $0,090 \pm 0,011$, $0,092 \pm 0,012$ cm, respectivamente) y había una diferencia significativa ($P < 0,01$) cuando se compara con la del grupo del modelo ($0,133 \pm 0,012$); la rhNRG-1 β pudo aliviar la gravedad del daño patológico del miocardio, redujo con eficacia la concentración de troponina I (cTnI) en el suero de los animales modelo, la cTnI del grupo del fármaco problema durante 5 días ($1,06 \pm 1,32$ ng/ml) y del grupo del fármaco problema durante 7 días ($1,05 \pm 1,2$ ng/ml) eran significativamente más bajas que en el grupo del modelo ($23,54 \pm 16,96$ ng/ml) $P < 0,01$; la inyección 5 y 7 días consecutivos de rhNRG-1 β pudo mejorar significativamente la tasa de supervivencia de los animales, al alcanzar el 85% cuando se comparó con la tasa de supervivencia del 50% de los animales modelo, $P < 0,05$. Conclusión. 30 μ g/kg de rhNRG-1 β inyectados durante 5 días consecutivos pudo tratar con eficacia la lesión aguda del miocardio ocasionada por una infección vírica en los ratones.

2. Objetivos

Dejar claro el momento eficaz de la administración del fármaco de rhNRG-1 β en el tratamiento de la lesión aguda del miocardio ocasionada por la infección vírica en los ratones.

3. Fármaco problema

La rhNRG-1 β , proporcionada por Zensun (Shanghai) Science & Technology Development. Número de lote: 20110006-2, titulación: 500u; pureza: >95% (HPLC-C8).

5. Animal para el experimento

5.1 Especie, origen y certificado de competencia: ratones BALB/C de pura raza de 4 semanas de edad, suministrados por el Departamento de Animales para Experimentos de la Universidad de Fudan, número de certificado de la competencia animal: Yi Dong Zi 22-9.

5.2 Masa corporal y sexo: 13-15 g, macho.

5.3 Número de animales en cada grupo: 20 animales en cada grupo experimental, 10 en el grupo de control normal.

5. Virus

Lo mismo que está descrito en el apartado anterior.

6. Reactivos y equipamiento

Lo mismo como está descrito en el apartado anterior.

10. Método del experimento

10.1 Grupos para el experimento

Se pusieron en marcha el grupo del control normal de los ratones, el grupo del modelo y el grupo del fármaco problema;

Grupo del control de ratones normal (n = 10);

Grupo del modelo (n = 20): se le inyectó la solución de tampón de preparación;

Grupo del fármaco problema (n = 20); se administraron 30 μ g/kg de rhNRG-1 β durante 3, 5 y 7 días consecutivos como tres ciclos terapéuticos diferentes con 20 animales asignados a cada grupo;

Grupo de control con placebo (n = 20): inyección intraabdominal del sobrenadante celular congelado y descongelado sin CVB₃, 0,2 ml/animal.

10.2 Ajuste de la dosis, preparación del fármaco problema, vía de administración del fármaco, momentos de administración del fármaco, concentración y volumen del fármaco problema

- 5 Se diluyó la rhNRG-1 β con la solución de tampón de preparación (PB a 10 mM, seroalbúmina humana al 0,2%, manitol al 5%) para la concentración necesaria;

Se pusieron en marcha tres grupos de administración del fármaco, inyección intravenosa durante 3, 5 y 7 días consecutivos, y el volumen de fármaco para cada dosis fue de 0,2 ml/animal;

- 10 La administración del fármaco del grupo del modelo fue por inyección intravenosa en la vena de la cola de los ratones, una vez cada día (cd), durante 7 días consecutivos, y el volumen del fármaco para cada dosis fue de 0,2 ml/animal.

7.3 Método del experimento

7.3.1 Puesta en marcha del modelo animal de miocarditis vírica aguda en los ratones

- 15 Se inyectaron por vía intraabdominal 0,2 ml de CVB₃ a 100 $\times$ TCID₅₀, suministrado por el Hospital Zhong Shan afiliado a la Universidad de Fudan, y se puso en marcha el modelo de miocarditis. A la semana siguiente, el ratón manifestó horripilación, depilación, escualidez, torpeza y muerte, y aproximadamente la mitad de los animales analizados murieron el 8.º día.

7.3.2 Experimento farmacodinámico

Lo mismo que está descrito en el apartado anterior.

- 20 7.3.3 Índice de observación

Lo mismo que está descrito en el apartado anterior.

8. Procesamiento de los datos

Para el procesamiento de los datos se utilizó la prueba de la *t* por parejas de los datos relevantes

9. Resultados

- 25 9.1 Efecto de la rhNRG-1 β administrada durante 3, 5 y 7 días sobre la función cardíaca de los ratones infectados por virus

- 30 Los resultados mostraron que el valor de FE/FS (66,5 $\pm$ 5,6% / 31,8 $\pm$ 3,7%) era significativamente menor que el del grupo normal (93,5 $\pm$ 0,9% / 68,1 $\pm$ 1,3%); la diferencia era estadísticamente significativa ($P < 0,001$). El valor de FE/FS de los 5 y 7 días consecutivos de inyección de rhNRG-1 β (86,8 $\pm$ 4,4% / 51,9 $\pm$ 5,8%, 87,0 $\pm$ 3,3% / 51,8 $\pm$ 5,1%) difería significativamente del del grupo del modelo ($P < 0,001$).

El valor de la FE de 3 días consecutivos de inyección de rhNRG-1 β se incrementó de nuevo (73,1 $\pm$ 6,6%), aunque, sin diferencia significativa cuando se comparó con el del grupo del modelo ($P < 0,05$).

- 35 El valor del DsVI (0,133 $\pm$ 0,012 cm) era más elevado que el del grupo normal (0,059 $\pm$ 0,006 cm) y había una diferencia significativa entre ellos ($P < 0,01$). El valor del DsVI de la rhNRG-1 β administrada a los grupos de los 5 y 7 días se redujo significativamente (0,090 $\pm$ 0,011, 0,092 $\pm$ 0,012 cm, respectivamente) y difería significativamente del del grupo del modelo ($P < 0,001$). El valor del DsVI de la rhNRG-1 β administrada al grupo de 3 días (0,123 $\pm$ 0,012 cm) difería insignificamente del del grupo del modelo ($P < 0,05$). En la tabla 27 y en 17-28 se muestran los resultados de los dos experimentos.

- 40 Tabla 27. Efecto de la rhNRG-1 β administrada durante un número de días diferente sobre la función cardíaca de los ratones infectados por virus (I)

Grupo	Pauta de administración del fármaco	DdVI (cm)	DsVI (cm)	FE (%)	FS (%)
Grupo de control normal		0,179* $\pm$ 0,007	0,059** $\pm$ 0,006	93,5** $\pm$ 0,9	68,1** $\pm$ 1,3
Grupo del modelo	i.v. cd $\times$ 7	0,194 $\pm$ 0,012	0,133 $\pm$ 0,012	66,5 $\pm$ 5,6	31,8 $\pm$ 3,7

rhNRG-1 β a 30 μ g/kg	i.v. cd $\times$ 3	0,194 $\pm$ 0,008	0,123 $\pm$ 0,012	73,1 $\pm$ 6,6	36,7 $\pm$ 4,7
rhNRG-1 β a 30 μ g/kg	i.v. cd $\times$ 5	0,187 $\pm$ 0,006	0,090** $\pm$ 0,011	86,8** $\pm$ 4,4	51,9** $\pm$ 5,8
rhNRG-1 β a 30 μ g/kg	i.v. cd $\times$ 7	0,192 $\pm$ 0,008	0,092** $\pm$ 0,012	87,0** $\pm$ 3,3	51,8** $\pm$ 5,1

En cada uno de los datos descritos más arriba, cada grupo n = 6, se analizó por ANOVA de un factor con SPSS y se comparó con el grupo del modelo, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Tabla 28. Efecto de la rhNRG-1 β administrada durante un número diferente de días sobre la función cardíaca de los ratones infectados por virus (II)

Grupo	Pauta de administración del fármaco	DdVI (cm)	DsVI (cm)	FE (%)	FS (%)
Grupo de control normal		0,189** $\pm$ 0,008	0,080** $\pm$ 0,007	90,9** $\pm$ 2,6	57,5** $\pm$ 3,5
Grupo del modelo	i.v. cd $\times$ 7	0,206 $\pm$ 0,008	0,126 $\pm$ 0,006	75,4 $\pm$ 5,2	39,0 $\pm$ 4,3
rhNRG-1 β a 30 μ g/kg	i.v. cd $\times$ 3	0,211 $\pm$ 0,016	0,121 $\pm$ 0,016	81,0 $\pm$ 5,4	43,9 $\pm$ 5,1
rhNRG-1 β a 30 μ g/kg	i.v. cd $\times$ 5	0,199 $\pm$ 0,000	0,100* $\pm$ 0,014	85,8** $\pm$ 4,205	50,0** $\pm$ 6,350
rhNRG-1 β a 30 μ g/kg	i.v. cd $\times$ 7	0,194 $\pm$ 0,017	0,092** $\pm$ 0,008	87,283** $\pm$ 1,694	52,367** $\pm$ 1,847

- 5 En cada uno de los datos descritos más arriba, cada grupo n = 6, se analizó por ANOVA de un factor con SPSS y se comparó con el del grupo del modelo, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

9.2 Efecto de la rhNRG-1 β en la cTnl en el suero de los ratones infectados por virus

- 10 Los resultados mostraban que la media de la cTnl del grupo normal (0,12 $\pm$ 0,03 ng/ml) y la media de la cTnl del grupo del modelo aumentaban significativamente (23,54 $\pm$ 16,96 ng/ml) y había una diferencia significativa entre ellas ($P < 0,001$). El valor de cTnl de la rhNRG-1 β administrada al grupo durante 5 y 7 días se redujo significativamente (al ser 1,06 $\pm$ 1,32 ng/ml, 1,05 $\pm$ 1,20 ng/ml, respectivamente), y difería significativamente en el grupo del modelo ($P < 0,001$), y la diferencia era insignificante entre el grupo de administración de 3 días y el grupo del modelo ($P > 0,05$). En las tablas 29 y 30 se muestran los resultados de los dos experimentos.

Tabla 29. Efecto de la rhNRG-1 β sobre la cTnl del suero (ng/ml) en los ratones infectados por virus (I)

Grupo (n = 9)	Pauta de administración del fármaco	cTnl (ng/ml) Media $\pm$ DE
Grupo de control normal		0,12 $\pm$ 0,03**
Grupo del modelo	i.v. cd $\times$ 7	23,54 $\pm$ 16,96
rhNRG-1 β a 30 μ g/kg	i.v. cd $\times$ 3	13,37 $\pm$ 9,53
rhNRG-1 β a 30 μ g/kg	i.v. cd $\times$ 5	1,06 $\pm$ 1,32**
rhNRG-1 β a 30 μ g/kg	i.v. cd $\times$ 7	1,05 $\pm$ 1,20**

- 15 Cada uno de los grupos de más arriba se analizó con pruebas no paramétricas (pruebas de muestras independientes) con el programa informático SPSS, cuando se comparó con el grupo del modelo, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Tabla 30. Efecto de la rhNRG-1 β sobre la cTnl del suero (ng/ml) en los ratones infectados por virus (II)

Grupo (n = 8)	Pauta de administración del fármaco	cTnl (ng/ml) Media $\pm$ DE
Grupo de control normal		0,15 $\pm$ 0,03**
Grupo del modelo	i.v. cd $\times$ 7	30,13 $\pm$ 21,75
rhNRG-1 β a 30 μ g/kg	i.v. cd $\times$ 3	12,32 $\pm$ 18,36
rhNRG-1 β a 30 μ g/kg	i.v. cd $\times$ 5	0,44 $\pm$ 0,24**
rhNRG-1 β a 30 μ g/kg	i.v. cd $\times$ 7	0,51 $\pm$ 0,28**

Cada uno de los grupos de más arriba se analizó con pruebas no paramétricas (pruebas de muestras independientes) con el programa informático SPSS, cuando se comparó con el grupo del modelo, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

- 5 9.3 Efecto de la rhNRG-1 β administrada durante un número diferente de días sobre la lesión patológica del miocardio de los ratones infectados con virus

Los resultados del experimento mostraban que la puntuación patológica del grupo normal era $0,0 \pm 0,00$, que la puntuación patológica del grupo del modelo estaba incrementada ($1,44 \pm 1,19$), que había una diferencia significativa entre ellas ($P < 0,01$), que la puntuación patológica de la rhNRG-1 β administrada a los grupos durante 5 y 7 días se redujo significativamente (al ser $0,11 \pm 0,14$ y $0,13 \pm 0,13$, respectivamente), y que difería significativamente de la del grupo del modelo ($P < 0,01$). También había una mejora de la lesión del miocardio del grupo de administración del fármaco durante 3 días ($0,33 \pm 0,155$), y había una diferencia significativa cuando se comparó con la del grupo del modelo; sin embargo, la mejora de las células del miocardio del grupo de administración del fármaco durante 5 días era notablemente mejor que la del grupo de administración del fármaco durante 3 días y había una diferencia

- 10 significativa entre ellos ($P < 0,01$), mientras que no había ninguna diferencia significativa en la puntuación patológica entre los grupos de administración del fármaco durante 5 días y durante 7 días.

En las tablas 31, 32 y en las figuras 21 y 24 se muestran los resultados de los dos experimentos.

Tabla 31. Efecto de la rhNRG-1 β administrada durante un número diferente de días sobre los cambios patológicos del miocardio en los ratones infectados por virus (I)

Grupo	Pauta de administración del fármaco	Puntuación patológica (Media $\pm$ DE)
Grupo de control normal		0,00 $\pm$ 0,00**
Grupo del modelo	i.v. cd $\times$ 7	1,44 $\pm$ 1,19
rhNRG-1 β a 30 μ g/kg	i.v. cd $\times$ 3	0,33 $\pm$ 0,155*
rhNRG-1 β a 30 μ g/kg	i.v. cd $\times$ 5	0,11 $\pm$ 0,140**
rhNRG-1 β a 30 μ g/kg	i.v. cd $\times$ 7	0,13 $\pm$ 0,132**

- 20 Cada uno de los grupos de más arriba se analizó con pruebas no paramétricas (pruebas de muestras independientes) con el programa informático SPSS, cuando se comparó con el grupo del modelo, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

Tabla 32. Efecto de la rhNRG-1 β administrada durante un número diferente de días sobre los cambios patológicos del miocardio en los ratones infectados por virus (II)

Grupo (n = 10)	Pauta de administración del fármaco	Puntuación patológica (Media $\pm$ DE)
Grupo de control normal		0,00 $\pm$ 0,00**
Grupo del modelo	i.v. cd $\times$ 7	1,86 $\pm$ 1,20

rhNRG-1 β a 30 μ g/kg	i.v. cd $\times$ 3	0,55 $\pm$ 0,476*
rhNRG-1 β a 30 μ g/kg	i.v. cd $\times$ 5	0,17 $\pm$ 0,157**
rhNRG-1 β a 30 μ g/kg	i.v. cd $\times$ 7	0,19 $\pm$ 0,168**

Cada uno de los grupos de más arriba se analizó con pruebas no paramétricas (pruebas de muestras independientes) con el programa informático SPSS, cuando se comparó con el grupo del modelo, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

9.4 Efecto de la rhNRG-1 β sobre la tasa de supervivencia de los ratones infectados por virus

- 5 En las tablas 33 y 34 se muestran los resultados de los dos experimentos, la tasa de supervivencia de los ratones en el grupo del modelo era del 50% y del 55%, respectivamente, mientras que la de la rhNRG-1 β administrada en el grupo de los 5 días como en de los 7 días se elevó hasta el 85% y el 80%, y había una diferencia significativa cuando se comparó con el grupo del modelo, $P < 0,05$. La tasa de supervivencia del grupo de 3 días se elevó hasta el 65% y el 75%, aunque no había ninguna diferencia significativa cuando se comparó con la del grupo del modelo ($P < 0,05$).
- 10

Tabla 33. Efecto de la rhNRG-1 β administrada durante un número diferente de días sobre la tasa de supervivencia de los ratones infectados por virus (I)

Grupo	Administración del fármaco	Número de animales supervivientes (tasa en % de supervivencia relativa)							
		1. ^{er} día	2. ^o día	3. ^{er} día	4. ^o día	5. ^o día	6. ^o día	7. ^o día	Sacrif.
Grupo de control normal (n = 10)		10 100%	10 100%	10 100%	10 100%	10 100%	10 100%	10 100%	10** 100%
Grupo del modelo n = 20	i.v. cd $\times$ 7	20 100%	20 100%	20 100%	18 90%	16 80%	13 65%	10 50%	10 50%
rhNRG-1 β a 30 μ g/kg (n = 20)	i.v. cd $\times$ 3	20 100%	20 100%	20 100%	19 95%	18 90%	16 80%	14 70%	13 65%
rhNRG-1 β a 30 μ g/kg (n = 20)	i.v. cd $\times$ 5	20 100%	20 100%	20 100%	20 100%	19 95%	19 95%	18 90%	17* 85%
rhNRG-1 β a 30 μ g/kg (n = 20)	i.v. cd $\times$ 7	20 100%	20 100%	20 100%	20 100%	20 100%	19 90%	19 90%	17* 85%

Cada uno de los grupos anteriores se analizó mediante las tablas de supervivencia con el programa informático SPSS, cuando se comparó con el grupo del modelo, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

- 15 Tabla 34. Efecto de la rhNRG-1 β administrada durante un número diferente de días sobre la tasa de supervivencia de los ratones infectados por virus (II)

Grupo	Administración del fármaco	Número de animales supervivientes (tasa en % de supervivencia relativa)							
		1. ^{er} día	2. ^o día	3. ^{er} día	4. ^o día	5. ^o día	6. ^o día	7. ^o día	Sacrif.
Grupo normal (n = 10)		10 100%	10 100%	10 100%	10 100%	10 100%	10 100%	10 100%	10** 100%

Grupo del modelo (n = 20)	i.v. cd × 7	20 100%	20 100%	20 100%	18 90%	17 85%	14 70%	12 60%	12 60%
rhNRG-1β a 30 µg/kg (n = 20)	i.v. cd × 3	20 100%	20 100%	20 100%	20 100%	19 95%	16 80%	15 75%	15 75%
rhNRG-1β a 30 µg/kg (n = 20)	i.v. cd × 5	20 100%	20 100%	20 100%	20 100%	19 95%	19 95%	18 90%	18* 90%
rhNRG-1β a 30 µg/kg (n = 20)	i.v. cd × 7	20 100%	20 100%	20 100%	20 100%	20 100%	19 95%	18 90%	18* 90%

Cada uno de los grupos anteriores se analizó mediante las tablas de supervivencia con el programa informático SPSS, cuando se comparó con el grupo del modelo, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$.

10. Conclusión

- La inyección por vía intravenosa de 30 µg/kg de rhNRG-1β durante 3, 5 y 7 días consecutivos pudo incrementar el valor de FE/FS, el valor de FE/FS de la administración del fármaco a los grupos de 5 y 7 días ($86,8 \pm 4,4\%$ / $51,9 \pm 5,8\%$, $87,0 \pm 3,3\%$ / $51,8 \pm 5,1\%$) difería significativamente del valor de FE/FS del grupo del modelo ($66,5 \pm 5,6$ / $31,8 \pm 3,7$) ($P < 0,01$), el DdVI de los grupos de los 5 días y de los 7 días se redujo significativamente (al ser $0,090 \pm 0,011$ y $0,092 \pm 0,012$ cm, respectivamente) y difería significativamente del grupo del modelo ($0,133 \pm 0,012$) ($P < 0,01$); la rhNRG-1β pudo aliviar la gravedad del daño patológico del miocardio en los animales modelo, redujo con eficacia la concentración de troponina I en el suero (cTnI), la cTnI de la administración del fármaco al grupo durante 5 días ($1,06 \pm 1,32$ ng/ml) y al grupo durante 7 días ($1,05 \pm 1,2$ ng/ml) eran significativamente más bajas que las del grupo del modelo ($23,54 \pm 16,96$ ng/ml), ($P < 0,01$); la rhNRG-1β inyectada por vía intravenosa durante 5 y 7 días consecutivos pudo incrementar significativamente la tasa de supervivencia de los animales modelo, y alcanzar el 85%. $P < 0,05$.
- Los resultados del experimento demostraban que la administración de 30 µg/kg de rhNRG-1β durante 5 días consecutivos podía tratar con eficacia la lesión aguda del miocardio en los ratones infectados por virus.

Ejemplo 6. Efecto terapéutico de la rhNRG-1β sobre la insuficiencia cardíaca congestiva ocasionada por la constricción de la vena cava inferior

1. Resumen

- Objetivos. Estudiar el efecto terapéutico de la rhNRG-1β sobre la insuficiencia cardíaca congestiva ocasionada por la constricción de la vena cava inferior en los perros. Métodos. Al cabo de aproximadamente 1 semana de constricción de la vena cava inferior en un 50%, se redujo el valor de la FE hasta aproximadamente el 20% o se redujo el gasto cardíaco hasta el 20%, según se determinó por ecocardiografía, lo que demostró que se había puesto en marcha el modelo animal de insuficiencia cardíaca congestiva con gasto cardíaco bajo estable. A continuación, se dividió aleatoriamente a los animales en grupos con 6 perros por cada grupo, tres niveles de dosis de rhNRG-1β, a saber, 1, 3 y 10 µg/kg, se inyectaron por vía intravenosa cada día durante 5 días consecutivos. Se determinó la función cardíaca (ecocardiografía) después de la administración del fármaco; se analizaron diferentes parámetros hemodinámicos en los animales modelo a través de la vena cervical y la cateterización de la arteria carótida, respectivamente. Resultados. Los tres niveles de dosis de rhNRG-1β (1, 3 y 10 µg/kg) administrados durante 5 días consecutivos pudieron incrementar el valor de FE/FS y del gasto cardíaco de los animales modelo, había una diferencia significativa entre los valores antes y después de la administración del fármaco y los del grupo del modelo ($P < 0,05$, $P < 0,01$); 1, 3 y 10 µg/kg de rhNRG-1β pudieron incrementar con eficacia la dp/dt del ventrículo izquierdo en los animales modelo, había una diferencia significativa cuando se comparó con la del grupo del modelo ($P < 0,01$), pudieron incrementar con eficacia la PVImáx de los animales modelo, reducir el valor de la PVImín y $P < 0,04$ cuando se comparó con el grupo del modelo, mientras que el efecto sobre el ventrículo izquierdo no resultaba evidente. Conclusión. La rhNRG-1β pudo tratar con eficacia la insuficiencia cardíaca congestiva ocasionada por la constricción de la vena cava inferior en los perros.

2. Objetivos

- Demostrar el efecto terapéutico de la rhNRG-1β sobre la insuficiencia cardíaca congestiva ocasionada por la constricción de la vena cava inferior en el perro.

3. Muestra problema

La rhNRG-1 β , proporcionada por Zensun (Shanghai) Science & Technology Development. Número de lote: 200110006-2; Concentración: 500 μ g/ampolla; título: 5000 u/ampolla; pureza: >95% (HPLC-C8).

6. Animal para el experimento

- 5 6.1 Especie, origen y certificado de competencia: perro de casta cruzada, proporcionado por el Hospital Zhong Shan de la Universidad de Fudan, que reúne los requisitos garantizados por el Departamento de Animales para Experimentación de la Universidad de Fudan.

6.2 Masa corporal y sexo: 13-18 kg, macho.

6.3 Número de animales en cada grupo: 6 animales en cada grupo experimental.

10 5. Materiales y equipo

5.1 Ecocardiógrafo, Hewlett Packard sonos 5500; tipo de la sonda: S4

5.2 Agua para inyección, Zang Jiang Antus Bioproduct Co Ltd, 10 $\times$ 5 ml, número de lote: 0112180;

5.3 Cuchillo eléctrico de alta frecuencia, fábrica de equipamiento electrónico de Shanghai Hu Tong, GD350-D;

5.4 Electrocardiógrafo, Nihon Kohden ECG-6511;

- 15 5.5 Electrodo de monitorización, Ludlow Company de Canadá, modelo: MT-200;

5.6 Fisiógrafo, equipamiento del Centro de Investigación de la Universidad de Medicina de Shanghai, SMUP-B;

5.7 Ventilador eléctrico, Shanghai n.º 4, fábrica de equipamiento médico;

5.8 Catéter flotante con globo trífido, Edwards 114F7.

6. Método del experimento

20 6.1 Grupos para el experimento

Se pusieron en marcha el grupo de pseudooperación, el grupo del modelo y el grupo del fármaco problema.

Grupo de pseudooperación (n = 6): sólo se les realizó la toracotomía sin constricción de la vena cava inferior.

Grupo del modelo (n = 6): se inyectó la solución de tampón de preparación después de poner en marcha el modelo de insuficiencia cardíaca.

- 25 Grupo del fármaco problema: se inyectó la rhNRG-1 β después de poner en marcha el modelo de insuficiencia cardíaca.

6.2 Ajuste de la dosis, preparación del fármaco problema, pauta de administración del fármaco

Los niveles de dosis alto, intermedio y bajo de 1, 3 y 10 μ g/kg, respectivamente, de rhNRG-1 β se obtuvieron por dilución con la solución de tampón de preparación (vehículo) para dar la concentración necesaria, inyección intravenosa una vez cada día durante 5 días consecutivos.

- 30

La solución del tampón de preparación se inyectó por vía intravenosa una vez al día durante 5 días consecutivos para el grupo del modelo.

El volumen del fármaco administrado era 0,8 ml/kg de masa corporal.

6.3 Método del experimento

- 35 6.3.1 Puesta en marcha de la insuficiencia cardíaca ocasionada por la constricción de la vena cava inferior en el modelo animal del perro

Se inyectó pentobarbital de sodio al 3% (30 mg/kg) en la vena periférica para anestesiarse al perro y después se le intubó por la tráquea. Se le realizó una toracotomía aséptica a través del lado derecho del tórax entre la 4.^a y la 5.^a costilla, se midió el perímetro de la vena cava inferior a 3 cm de la aurícula derecha. Se selecciona una bovina fuerte con un perímetro igual a 1/3-1/2 del de la vena cava inferior, se ajusta la bovina y la vena cava inferior entre sí con hilo de seda n.º 7, se retira la bovina, se cauteriza la hemorragia, y se cierra el tórax. Se cría durante 1 semana, se realiza una ecocardiografía de acuerdo con la cantidad de ascitis, cuando la FE se redujo hasta un 20% o la dilatación del lado izquierdo del corazón hasta un 20%, se puso en marcha el modelo animal estable de insuficiencia cardíaca congestiva con gasto cardíaco bajo. A continuación, la inyección intravenosa del perro se realizó durante 5

- 40

días consecutivos. Se realizó la toracotomía sin constricción de la vena cava inferior para el grupo de pseudooperación.

6.3.2 Experimento farmacodinámico

- Después de identificar la puesta en marcha del modelo animal, el experimento se realizó de acuerdo con los grupos de animales y la pauta de administración de los fármacos

6.3.3 Índice de observación

- Se realizó la determinación del índice de la función cardíaca con anestesia del perro antes de la operación, antes de la administración del fármaco y 5 días después de la misma. El índice principal incluía: FE (fracción de eyección): fracción de eyección del corazón, a saber, razón de la diferencia entre el volumen telediastólico (VTD) del ventrículo y el volumen telesistólico (VTS) del ventrículo, y el volumen telediastólico del ventrículo, que es el índice general utilizado por reflejar el funcionamiento del bombeo del ventrículo; en concreto, por reflejar la función sistólica;

FS: fracción de acortamiento del eje menor del ventrículo, que es el índice que refleja el funcionamiento de la contracción del ventrículo,

GC: gasto cardíaco, a saber, volumen de sangre eyectado por el corazón por minuto.

- ### 6.3.3.2 Determinación del índice hemodinámico

- Se insertó un catéter flotante con globo trifido 7F en la vena yugular derecha, y se registraron la presión de la aurícula derecha, la presión del ventrículo derecho, la presión pulmonar y la presión de enclavamiento pulmonar. De nuevo se insertó un catéter flotante con globo trifido 6F en la arteria carótida izquierda, y se registraron la presión aórtica y la presión del ventrículo izquierdo con un fisiógrafo con los siguientes índices principales: PVI_{máx}, PVI_{mín}, +dp/dt y -dp/dt.

7. Procesamiento de los datos

Para los datos recogidos se utilizó la prueba de la *t* por parejas o una prueba no paramétrica con el programa informático SPSS.

8. Resultados

- ### 8.1 Efecto de la rhNRG-1 β sobre la función cardíaca del perro con CVCIT

8.1.1 Efecto de la rhNRG-1 β sobre el valor de FE/FS del ventrículo izquierdo del perro con CVCIT

- El valor de FE y FS antes de la constricción en los animales modelo era de $82,3 \pm 1,6\%$ y $49,2 \pm 2,6\%$, respectivamente, según el examen por ecocardiografía, y se redujo a $59,1 \pm 7,3\%$ y $29,3 \pm 3,9\%$, respectivamente, después de la operación, había una diferencia significativa entre los valores de antes y de después de la constricción ($P < 0,01$, $P < 0,05$), y el valor de FE y FS se mantuvo continuamente en el nivel de $55,5 \pm 10,9\%$ y $28,5 \pm 6,6\%$ 5 días después, lo que demuestra que, gracias a la constricción de la vena cava inferior, se puso en marcha el modelo de perro de insuficiencia cardíaca congestiva y que era relativamente estable.

- Se incrementó significativamente el valor de FE y FS de los tres grupos de nivel de dosis después de la inyección de la rhNRG-1 β , la FE y la FS del grupo del nivel de dosis bajo ($1 \mu\text{g/kg}$) se incrementó de $57,7 \pm 10,9$ y $30,6 \pm 8,0$ a $70,4 \pm 8,4$ y $39,7 \pm 5,7$, había una diferencia significativa entre el antes y el después de la administración del fármaco ($P < 0,05$), mientras que había una diferencia significativa cuando se comparó con el grupo del modelo ($P < 0,05$). Además, también se incrementó significativamente el valor de FE/FS de los animales modelo de los grupos de nivel de dosis intermedio y alto, y había una diferencia significativa cuando se compararon los niveles del antes y del después de la administración del fármaco con respecto al grupo del modelo ($P < 0,01$). En la tabla 35 se muestran los resultados.

Tabla 35. Efecto de la rhNRG-1 β sobre el FE/FS del ventrículo izquierdo en el perro con CVCIT

Grupo	FS (%)			FE (%)		
	Preoperación	Antes de la administración del fármaco	Después de la administración del fármaco	Preoperación	Antes de la administración del fármaco	Después de la administración del fármaco
Grupo de pseudooperación	$51,7 \pm 2,2$	$47,4 \pm 1,3^{**}$	$50,3 \pm 2,2^{**}$	$84,1 \pm 1,4$	$81,4 \pm 1,1^{**}$	$83,1 \pm 1,6^{**}$

Grupo del modelo	49,2 ± 2,6	29,3 ± 3,9	28,5 ± 6,6	82,3 ± 1,6	59,1 ± 7,3	55,5 ± 10,9
rhNRG-1β a 10 µg/kg	50,5 ± 3,3	27,7 ± 5,6	41,5 ± 3,1***▲	82,9 ± 2,6	55,8 ± 10,0	74,7 ± 3,2***▲
rhNRG-1β a 3 µg/kg	51,7 ± 2,9	29,9 ± 6,4	42,4 ± 4,4***▲	84,7 ± 2,8	58,0 ± 8,3	74,7 ± 4,6***▲
rhNRG-1β a 1 µg/kg	50,8 ± 4,0	30,6 ± 8,0	39,7 ± 5,7*▲	82,8 ± 3,0	57,7 ± 10,9	70,4 ± 8,4*▲

En todos los grupos que se acaban de describir, n = 6

* $P < 0,05$, cuando se compara con el grupo del modelo; ** $P < 0,01$, cuando se compara con el grupo del modelo: ▲ $P < 0,05$, cuando se compara el valor antes de la administración del fármaco con el valor de después.

▲▲ $P < 0,01$, cuando se compara el valor antes de la administración del fármaco con el valor de después.

5 8.1.2 Efecto de la rhNRG-1β sobre el gasto cardíaco del perro con CVCIT

- En la tabla 36 se muestra que la rhNRG-1β pudo incrementar significativamente el gasto cardíaco de los animales modelo, el gasto cardíaco del grupo de rhNRG-1β a 1 µg/kg se incrementó de $2,4 \pm 0,5$ a $3,7 \pm 0,8$ y había una diferencia significativa cuando se compara el valor antes de la administración del fármaco con el valor de después ($P < 0,05$), mientras que había una diferencia significativa también cuando se comparó con el de los animales modelo ($P < 0,05$). Los cambios del gasto cardíaco de los grupos de nivel de dosis de 3 y 10 µg/kg eran incluso significativos ($P < 0,01$). Los resultados de la determinación de los cambios de la frecuencia cardíaca mostraban que la rhNRG-1β tiene menos efecto sobre la frecuencia cardíaca (no se reveló ningún dato).

Tabla 36. Efecto de la rhNRG-1β sobre el gasto cardíaco del perro con CVCIT (L/min)

Gasto cardíaco (L/min)			
Grupo	Preoperación	Antes de la administración del fármaco	Después de la administración del fármaco
Grupo de pseudooperación	$4,3 \pm 0,7$	$3,9 \pm 0,6$	$4,0 \pm 0,6^{**}$
Grupo del modelo	$4,7 \pm 1,3$	$2,5 \pm 0,8$	$2,7 \pm 0,5$
rhNRG-1β a 10 µg/kg	$4,3 \pm 0,6$	$1,9 \pm 0,3$	$3,6 \pm 0,7^{**} \blacktriangle \blacktriangle$
rhNRG-1β a 3 µg/kg	$4,3 \pm 0,8$	$2,1 \pm 0,7$	$4,0 \pm 0,9^{*} \blacktriangle \blacktriangle$
rhNRG-1β a 1 µg/kg	$4,2 \pm 0,6$	$2,4 \pm 0,5$	$3,7 \pm 0,8^{*} \blacktriangle$

En todos los grupos que se acaban de describir, n = 6.

- 15 * $P < 0,05$, cuando se compara con el grupo del modelo; ** $P < 0,01$, cuando se compara con el grupo del modelo; ▲ $P < 0,05$, cuando se compara el valor antes de la administración del fármaco con el valor de después.

▲▲ $P < 0,01$, cuando se compara el valor antes de la administración del fármaco con el valor de después.

8.2 Efecto de la rhNRG-1β sobre la dinámica del torrente circulatorio del perro con CVCIT

- Se determinaron los cambios de la dp/dt del ventrículo izquierdo y derecho y la presión telesistólica/presión telediastólica con la técnica de cateterismo flotante. Los resultados mostraban que 1, 3 y 10 µg/kg de rhNRG-1β podían incrementar con eficacia la dp/dt del ventrículo izquierdo de los animales, había una diferencia significativa cuando se comparaba con la del grupo del modelo ($P < 0,05$); incrementaron eficazmente la PVImáx, redujeron el valor de la PVImín, cuando se comparaba con el grupo del modelo, $P < 0,05$; la rhNRG-1β tiene menos efecto sobre la dp/dt del lado izquierdo del corazón, sobre la +dp/dt del ventrículo derecho y sobre presión televentricular, y en las tablas 37 y 38 se muestran los resultados en detalle.

Tabla 37. Efecto de la rhNRG-1β sobre la dp/dt del ventrículo izquierdo del perro con CVCIT

Grupo	L (+dp/dt) (mmHg/s)	L (-dp/dt) (mmHg/s)
Grupo de pseudooperación	5088,99 ± 982,87**	-3233,39 ± 923,82
Grupo del modelo	2017,75 ± 295,25	-2384,94 ± 1062,31
rhNRG-1β a 10 µg/kg	5104,88 ± 1332,05**	-3658,34 ± 1390,97
rhNRG-1β a 3 µg/kg	5000,45 ± 1535,88**	-3249,52 ± 973,32
rhNRG-1β a 1 µg/kg	4024 ± 1006 635,63**	-2933 ± 613,44

En todos los grupos que se acaban de describir, n = 6

* $P < 0,05$, cuando se compara con el grupo del modelo, ** $P < 0,01$, cuando se compara con el grupo del modelo.

Tabla 38. Efecto de la rhNRG-1β sobre la PVI_{máx}/PVI_{mín} del ventrículo izquierdo del perro con CVCIT

Grupo	PVI _{máx} (mmHg)	PVI _{mín} (mmHg)
Grupo de pseudooperación	145,04 ± 15,17**	-0,03 ± 6,48
Grupo del modelo	95,07 ± 11,62	2,42 ± 2,86
rhNRG-1β a 10 µg/kg	122,87 ± 17,37*	-0,69 ± 1,05*
rhNRG-1β a 3 µg/kg	114,68 ± 17,12*	-1,12 ± 1,34*
rhNRG-1β a 1 µg/kg	102,12 ± 12,42	0,59 ± 3,05

En todos los grupos que se acaban de describir, n = 6

5 * $P < 0,05$, cuando se compara con el grupo del modelo; ** $P < 0,01$, cuando se compara con el grupo del modelo.

10. Conclusión

Los tres niveles de dosis (1, 3 y 10 µg/kg) de rhNRG-1β administrados durante 5 días consecutivos pudieron incrementar el valor de FE/FS y el gasto cardíaco del animal del modelo, había una diferencia significativa cuando se compara el valor antes de la administración del fármaco con el valor de después ($P < 0,005$, $P < 0,01$); 1, 3 y 10 µg/kg de rhNRG-1β pudieron incrementar con eficacia la dp/dt del ventrículo izquierdo y había una diferencia significativa cuando se comparó con el grupo del modelo ($P < 0,05$), al ser capaz de incrementar con eficacia la PVI_{máx}, reducir la PVI_{mín} de los animales del modelo, y había una diferencia significativa cuando se comparó con el grupo del modelo, $P < 0,05$, mientras que había menos efecto sobre el ventrículo derecho.

15 Los resultados del experimento mostraban que la rhNRG-1β podía tratar con eficacia la insuficiencia cardíaca congestiva ocasionada por la constricción de la vena cava inferior.

Ejemplo 7. Estudio de la neurregulina-1β S177-Q237 recombinante de humano para inyección sobre la toxicidad a largo plazo del macaco *Rhesus*

Resumen

20 Experimento de toxicidad a largo plazo al inyectar por vía intravenosa 7,5, 15, y 75 µg/kg al día de la neurregulina 1β_{S177-Q237} recombinante de humano para inyección al macaco *Rhesus* (la dosificación utilizada se basó en la dosis eficaz en el modelo farmacodinámico de ratón y se convirtió en una dosificación equivalente a 2, 4, 20 veces la de la dosificación para el mono; y se basó en el modelo farmacodinámico del perro y se convirtió a una dosificación equivalente a 4, 5, 9 y 45 veces la de la dosificación para el mono), se utilizó excipiente como control; el seguimiento se llevó a cabo continuamente durante 3 semanas después de la retirada del fármaco. Se estudiaron las reacciones tóxicas de la neurregulina-1β_{S177-Q237} recombinante de humano para inyección y su gravedad para el organismo con el fin de buscar órganos diana de las reacciones tóxicas y la reversibilidad del daño, y para determinar la dosificación que no ocasiona ninguna reacción tóxica y para que la dosificación sirva como referencia para la dosificación segura a utilizar en los humanos.

Los animales del experimento se dividieron al azar en 4 grupos basándose en su masa corporal, con 6 animales, 3 machos y 3 hembras, en cada grupo. El volumen del fármaco administrado era 1 ml/kg de masa corporal. La masa corporal se midió cada semana y la dosis se reguló de acuerdo con la masa corporal medida. El fármaco se administró cada día por la mañana durante 3 semanas consecutivas. Se llevó a cabo el electrocardiograma, pruebas hemáticas, bioquímicas, de orina y de heces, así como la determinación de anticuerpos, se realizaron antes de la administración del fármaco, y 10 días y 21 días después de comenzar la administración del fármaco, respectivamente. El examen del fondo de ojo se realizó con anestesia los días 22 y 42 (contados desde el primer día que se administró el fármaco), respectivamente, a continuación, se sacrificaron 2/3 y 1/3 de los animales, se les realizó la autopsia y se estudiaron desde el punto de vista anatomopatológico, y se preparó un frotis de la médula ósea al mismo tiempo. La ecocardiografía se realizó con anestesia un día antes de la autopsia.

Durante el experimento, no se asoció ninguna muerte animal al fármaco problema. Se produjeron vómitos, náuseas y salivación en parte de los animales en cada perro tomado del grupo 1 semana después de comenzar la administración del fármaco; se observó horripilación, pelaje sin lustre, reducción de la actividad, y anorexia 2 semanas después de la administración del fármaco; se descubrió palidez leve, un endurecimiento regional de la piel y de los vasos en el sitio de inyección del fármaco; los síntomas y los signos mencionados más arriba desaparecieron o se redujeron 3 semanas después de la retirada del fármaco. No se observaron manifestaciones anormales en los animales del grupo de control durante el periodo de administración del fármaco y el periodo de convalecencia después de retirar el fármaco.

La ingestión de alimento se redujo significativamente y la masa corporal disminuyó notablemente en el grupo de dosis alta (la autocomparación antes y después de la administración del fármaco mostró que la diferencia era significativa: mientras que no había ninguna diferencia significativa cuando se comparó con el grupo de control). No había ningún cambio significativo de la temperatura corporal en todos los animales antes y después de la administración del fármaco.

Los análisis hemáticos, bioquímicos, de orina y de las heces no mostraron cambios toxicológicos significativos.

Electrocardiografía: no se observó ninguna desaceleración significativa de la frecuencia cardíaca en los animales conscientes a 10 días de la administración del fármaco, mientras que se produjo una reducción significativa de la frecuencia cardíaca a las 3 semanas de la administración del fármaco en los animales conscientes de cada grupo que tomaba el fármaco, probablemente debido al efecto farmacológico del fármaco problema; además, había voltaje relativamente alto de las ondas R y S en las derivaciones V1 y V3 del electrocardiograma, probablemente asociado a la variación de las derivaciones del tórax de los animales; no se observó ninguna anomalía patológica significativa en el ecocardiograma, frecuencia cardíaca ni ningún otro índice, ni cambios hipertróficos del miocardio.

No se observaron cambios anormales en el examen del fondo de ojo.

No se observaron cambios patológicos tóxicos significativos en el frotis de la médula ósea.

La autopsia realizada a las 3 semanas de la administración del fármaco mostró derrame pericárdico en 3 animales de los grupos de dosis intermedio y bajo, y se pudieron extraer 2-3 ml de trasudado en cada uno de ellos; se descubrió hidrocefalia en el espacio subaracnoideo en 2 animales del grupo de dosis alta, y se les extrajeron 0,5 y 3 ml de trasudado de cada uno de ellos, respectivamente.

Aparecieron diferentes grados de vacuolas en el citoplasma del miocardio, se observó congestión vascular y edema leve bajo la piamadre en los que tenían hidrocefalia. Todos ellos tenían algo que ver con el fármaco problema.

El análisis de anticuerpos dio resultados negativos.

Los síntomas digestivos, tales como vómitos, náuseas y anorexia, de estos animales, y la resultante reducción de masa corporal en el grupo con la dosis alta se debieron probablemente a la distribución y eliminación del fármaco problema en el tubo digestivo. Síntomas tales como palidez, endurecimiento de la piel en el sitio de la inyección, derrame pericárdico e hidrocefalia, y sin recuperación total de la hidrocefalia en los animales del grupo con la dosis alta 3 semanas después de la retirada del fármaco, demostraron que el exudado capilar y el síndrome de trasudado en el macaco *Rhesus* pueden estar ocasionados por la dosis intermedia y alta de la neurregulina-1 β ^{S177-Q237} recombinante de humano para inyección. Además, la desaceleración de la frecuencia cardíaca en los animales conscientes y la vacuola en el citoplasma del miocardio que se observa en los animales del grupo de dosis alta se asociaron todos ellos al fármaco problema.

Conclusión: se llevó a cabo la inyección intravenosa diaria de 7,5, 15 y 75 μ g/kg al día de neurregulina 1 β ^{S177-Q237} recombinante de humano para inyección al macaco *Rhesus* durante un total de 3 semanas y se vigiló continuamente durante 3 semanas. Los resultados demostraron que más de 10 días de inyección consecutiva de la neurregulina 1 β ^{S177-Q237} recombinante de humano para inyección podían ocasionar la desaceleración de la frecuencia cardíaca en los animales conscientes; podría conducir a la reacción digestiva; ocasionó derrame pericárdico, hidrocefalia, y congestión y edema leves bajo la piamadre en el macaco *Rhesus* del grupo de dosis intermedia y alta, la hidrocefalia no se recuperó totalmente 3 semanas después de la retirada del fármaco en los animales del grupo de dosis alta; la palidez y el endurecimiento de la piel y los vasos en el sitio de la inyección se recuperaron gradualmente después de

retirar el fármaco. Estas manifestaciones demostraron que la posible causa era el síndrome de trasudado-exudación capilar. Una dosis alta de la neurregulina 1 β _{S177-Q237} recombinante de humano para inyección podía ocasionar las vacuolas en el citoplasma del miocardio; la prueba de anticuerpos dio resultados negativos. El nivel de la dosis que no provocó derrame pericárdico e hidrocefalia por la administración del fármaco durante 3 semanas y un periodo de convalecencia de 3 semanas fue de 7,5 μ g/kg al día.

1. Objetivos del experimento

Estudiar las reacciones tóxicas de la neurregulina 1 β _{S177-Q237} recombinante de humano para inyección y su gravedad para el organismo, buscar órganos diana de la reacción tóxica y la reversibilidad del daño, determinar la dosis que no provoca reacciones tóxicas y ofrecer la dosis como una referencia para la dosis segura a utilizar en los humanos.

2. Fármaco problema:

2.1 Nombre del fármaco: neurregulina 1 β _{S177-Q237} recombinante de humano para inyección.

2.2 Número del lote: 200210024

2.3 Institución que proporcionó el fármaco: Zensun (Shangai) Science & Technology Development Company Ltd., Dirección: 2.^a planta del edificio C, 328 Bi Bo Road, Zhang Jiang High Tech Zoon.

2.4 Contenido: 3,75 mg/ml.

2.5 Actividad específica: $1,12 \times 10^4$ U/mg.

2.6 Naturaleza: solución incolora y transparente

2.7 Conservación: conservar a 4 °C.

2.8 Excipiente: NaCl a 0,15 M, fosfato de sodio a 10 mM, pH 6,0.

2.9 Preparación: Diluir con solución salina normal a la concentración necesaria.

3. Animales:

3.1 Especie de los animales: macaco *Rhesus*

3.2 Origen de los animales: Granja de crianza de macaco *Rhesus* Da Li Ji, Condado Li Xing, Provincia de Anhui, certificado de competencia: Wan Fa Xun Fan N.º 2002-6.

3.3 Fecha de recepción de los animales: 13 de octubre de 2002.

3.4 Masa corporal: 2,6 a 5,9 kg al comienzo de la administración del fármaco.

3.5 Sexo: Una mitad eran machos y la otra mitad, hembras.

3.6 Número de animales: 24 animales.

3.7 Marcas en los animales: se utilizó un chip torácico para identificar cada animal.

3.8 Condiciones de alimentación: un animal por jaula, alimentado con pienso granulado para animales (suministrado por Shanghai Shi Ling Science & Technology Company Ltd.). Los animales se alimentaron con 100 g de pienso para consumo animal dos veces al día, además de unos 100 g de fruta. La temperatura ambiental se mantuvo a 20-25 °C, la humedad relativa al 50-70%, y se iluminaron durante 12 horas al día.

3.9 Tiempo de adaptación al entorno: cría durante 25 días para la adaptación al entorno.

4. Dosis

4.1 Ajuste de la dosis:

Grupo de control: 0 μ g/kg al día (inyectado con un volumen igual de excipiente);

Grupo de dosis baja; 7,5 μ g/kg al día (comparable a dos veces la dosis equivalente del mono);

Grupo de dosis intermedia: 15 μ g/kg al día (comparable a 4 veces la de la dosis equivalente del mono);

Grupo de dosis alta: 75 μ g/kg al día (comparable a 20 veces la de la dosis equivalente del mono).

4.2 Fundamentos del ajuste de la dosis:

La indicación programada para la neurregulina 1 β _{S177-Q237} recombinante de humano para inyección era para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. El modelo farmacodinámico de ratones era el modelo de miocarditis inducida por el virus Coxsackie B3 procardíaco, la dosis utilizada era 7,5, 15 y 30 $\mu\text{g/kg}$ al día (equivalente a 1,875, 3,75 y 7,5 $\mu\text{g/kg}$ al día cuando se use en el mono), inyectado por vía intravenosa durante 5 días consecutivos, la puntuación patológica era 1,5, 0,7 y 0,56 respectivamente (los criterios para la puntuación patológica eran: puntuación 0: área de lesiones = 0%, puntuación 1: área de lesiones = 25%, puntuación 2: área de lesiones = 50%, puntuación 3: área de lesiones = 100%). Por lo tanto, las dosis de 15 y 30 $\mu\text{g/kg}$ al día podían reducir significativamente el daño al corazón. La vía de administración programada del fármaco era la inyección intravenosa, una vez al día durante 3 a 5 días consecutivos. La DMT del experimento de toxicidad aguda con la inyección por vía intravenosa de la neurregulina 1 β _{S177-Q237} recombinante de humano para inyección era 35 mg/kg. Se toma una dosis equivalente para el mono de 3,75 $\mu\text{g/kg}$ al día como dosis significativamente eficaz, la dosis tóxica a largo plazo para los animales se ajustará tentativamente a 2, 4 y 20 veces la dosis eficaz de los animales.

5. Ciclo de administración del fármaco:

Una vez al día durante 3 semanas consecutivas.

6. Periodo de convalecencia

3 semanas.

7. Volumen de fármaco administrado:

1,0 ml/kg de masa corporal.

8. Vía de administración del fármaco:

Inyección intravenosa lenta, la misma que la utilizada en la práctica clínica.

9. Método del experimento:

Se utilizó el albendazol para acabar con los parásitos intestinales y se realizó la prueba de la tuberculina antes de comprar el animal para el experimento, y a continuación se realizó la adaptación al entorno; se realizaron análisis hemáticos, bioquímicos y de orina, y electrocardiografía, dos veces para garantizar que los animales del experimento estaban sanos. Se formaron 4 grupos basándose en la masa corporal y el sexo de los animales, con 6 animales en cada grupo, la mitad machos y la mitad hembras. El volumen del fármaco administrado era 1,0 ml/kg de masa corporal, la masa corporal se midió cada semana antes de cada administración del fármaco y el volumen del fármaco a administrar se ajustará de acuerdo con la masa corporal medida, 2/3 y 1/3 de los animales (2 monas y 1 mono en cada uno) en cada grupo se sacrificaron a las 24 horas al cabo de 3 semanas de la administración del fármaco y al final de 3 semanas después del periodo de convalecencia, se realizó la autopsia, se pesaron los órganos, se calculó el coeficiente de los órganos y se realizó el examen anatomopatológico. Se extrajo sangre para el examen hemático y bioquímico, y se realizó el frotis de la médula ósea a los 10 días de la administración del fármaco y antes de la autopsia.

9.1 Reactivos:

9.1.1 Reactivo para el análisis hemático.

9.1.2 Reactivo para el análisis bioquímico del suero: reactivo para bioquímica con contaminaciones insignificantes.

9.1.3 Principal reactivo para la detección de anticuerpos.

1. Líquido de recubrimiento: NaHCO_3 0,293 g, Na_2CO_3 0,159 g, disolver en 100 ml de agua.

2. Solución de tampón de sustrato: pH 5,0, ácido cítrico 1,02 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3,68 g, disolver en agua.

3. Solución de limpieza: PBS a 0,01 M más Tween-20 a 1:2000

4. Solución de bloqueo: leche desnatada en polvo 5 g, disolver en 100 ml, pH 7,4, PBS a 0,01 M.

5. Segundo anticuerpo de rata contra mono marcado con HRP: producto de Sigma Company con el número de lote de los EE. UU.: A-2054.

6. Tween-20: paquete separado de material bruto importado, proporcionado por Zensun (Shanghai), Science & Technology Company Ltd.

7. Tetrametilaminobenceno (TMB): envase separado de material bruto importado, proporcionado por Shanghai Huamei Bioengineering Company.

8. H₂SO₄: reactivo analítico, Shanghai Ling Feng Chemical Reagent Co Ltd.

9.2 Equipamiento:

Contador de células sanguíneas Roche Hematology Vet.

Máquina automática de análisis bioquímicos Hitachi-7060.

5 Máquina de marcación de enzimas 550: producto de BIO-RAD de los EE. UU.

Centrifugadora refrigerada Heraeus, Compañía Heraeus de Alemania.

Ecocardiógrafo sonos 5500 de Hewlet Packard, con sonda S4.

9.3 Métodos de análisis bioquímicos del suero y la sangre: véase la tabla que viene a continuación.

Método de análisis de la sangre

Materia a analizar	Método del análisis
Glóbulos blancos	Análisis instrumental
Glóbulos rojos	Análisis instrumental
PLT Plaquetas	Análisis instrumental
Ht Hematocrito	Análisis instrumental
Hb Hemoglobina	Análisis instrumental
VCM Volumen corpuscular medio	Análisis instrumental
HCM Hemoglobina corpuscular media	Análisis instrumental
CHCM Concentración de hemoglobina corpuscular media	Análisis instrumental
Ret Número de reticulocitos	Método de azul de cresilo brillante
Fórmula leucocítica	Tinción de Wright
TC Tiempo de coagulación	Método de portaobjetos

10

Método de análisis bioquímico del suero

Análisis	Método
ALT/GPT alanina aminotransferasa	IFCC sin P-5-P
AST/GOT aspartato aminotransferasa	IFCC sin P-5-P
ALP fosfatasa alcalina	Tris/Carb
LDH ácido láctico deshidrogenasa	L → P método enzimático
CPK creatina fosfocinasa	NAC método enzimático
NUS nitrógeno ureico sanguíneo	Ureasa-GLDH-cinético
CRE creatinina	Jaffe-cinético
GLU glucosa	oxidasa
Bil-T bilirrubina total	Método del sulfóxido de dimetilo
COL-T colesterol total	Enzimático
PT proteína total	Biuret

ALB albúmina	Método del verde de bromcresol
K ⁺ potasio	Método de electrodos
Na ⁺ sodio	Método de electrodos
Cl ⁻ cloruro	Método de electrodos
P ⁺⁺⁺ /PHOS fósforo inorgánico	Fosfomolibdato-UV
Ca ⁺⁺ calcio	Método de complexona de ortocresol- ftaleína
Mg ⁺⁺ magnesio	Indicador compexométrico de calmagita

9.4 Método de detección de anticuerpos

Antígeno de recubrimiento: la neurregulina 1 β _{S177-Q237} recombinante de humano para inyección se diluyó a 6 μ g/ml con la solución tamponante de recubrimiento, se añade en la placa de 96 pocillos marcada con enzima con 100 μ l/pocillo, 37 °C durante 1 hora.

Bloqueo: se lava la placa 5 veces, se prepara leche desnatada en polvo al 5% con la solución de lavado.

Se diluye lo programado para el suero a analizar; se diluye la muestra con la solución de dilución de la muestra, el gradiente de dilución es 1:100.

Se añade la muestra: se lava 3 veces la placa bloqueada marcada con enzima, se añade lo programado para el suero a analizar, 100 μ l/pocillo, 37 °C durante 1 hora.

Se añade el anticuerpo marcado con la enzima: se lava la placa 5 veces, se añade la inmunoglobulina antimonio de rata marcada con HRP diluida a 1:1000, 100 μ l/pocillo, 37 °C durante 1 hora.

Sustrato: se lava la placa 5 veces, se le añade la solución de reacción del sustrato recién preparada, 100 μ l/pocillo, 37 °C durante 10 minutos.

15 Finalización: se añade H₂SO₄ a 2 N, 50 μ l/pocillo para parar la reacción.

Detección de valores dispares: el resultado positivo se definió como el valor de DO de la muestra problema que era 2,1 veces mayor que el del control negativo (el suero se diluyó a 1:100).

10. Periodo de observación e investigación

10.1 Estado de la muerte:

20 Se llevó a cabo la monitorización una o dos veces al día y se registrará el momento de la muerte del animal si se produce la muerte de algún animal.

10.2 Síntomas generales:

Entre ellos se incluyen aspecto general, signos, actividad del comportamiento, sangre o exudación pegadas a la superficie de la jaula, lustre del pelaje. La observación se realizó una o dos veces al día.

25 10.3 Masa corporal:

Se midió la masa corporal una vez al día antes de la administración del fármaco.

10.4 Temperatura corporal:

Se tomó la temperatura corporal antes de la administración del fármaco, y 1 hora después, los días 1, 3 y 5 de la administración del fármaco.

30 10.5 Ingestión de productos alimenticios para consumo animal:

Se le dio a cada mono 200 g de pienso para consumo animal al día, con 100 g de frutas, y se calcula el consumo de alimento por animal al día.

10.6 Electrocardiografía:

35 Se realizaron 2 electrocardiogramas antes de la administración del fármaco y también a los 10 días de comenzar la administración del fármaco, al final de la administración del fármaco, y durante el periodo de convalecencia,

respectivamente, y se calcularon los valores de los intervalos PR, QRS, QT y ST.

10.7 Ecocardiografía:

- Tras terminar la administración del fármaco y 1 día antes de la autopsia al final del periodo de convalecencia, los animales programados para realizarles la autopsia se anestesiaron con una inyección por vía intravenosa de pentobarbital al 3% (30 mg/kg), a continuación se realizará la ecocardiografía para determinar el grosor intraventricular (GIV), la pared posterior (PP) del ventrículo izquierdo, volumen telediastólico del ventrículo izquierdo (DdVI), volumen telesistólico del ventrículo izquierdo (DsVI), fracción de eyección (FE), fracción de acortamiento (FS), valor máximo del torrente circulatorio por la válvula mitral (VM), valor máximo del torrente circulatorio por la válvula aórtica (VA) y frecuencia cardíaca (FC).

10 10.8 Índices hemáticos:

- Dos veces antes de la administración del fármaco, 10 días después del comienzo de la administración del fármaco, al final de la administración del fármaco, y al final del periodo de convalecencia de 3 semanas antes de la autopsia, se les extrajeron 0,5 ml de sangre de la vena safena, se trataron con EDTA al 3,8% contra la coagulación, y se les analizaron los índices siguientes: número de glóbulos rojos, número de reticulocitos (Ret), hemoglobina (Hb), número glóbulos blancos y fracción leucocitaria que incluye: neutrófilos (N), eosinófilos (E), linfocitos (L) y monocitos (M), número de plaquetas (PLT), tiempo de coagulación (TC), hematocrito (Ht), volumen corpuscular medio (VCM), concentración de hemoglobina media (CHM) y concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM).

10.9 Índices bioquímicos del suero:

- Dos veces antes de la administración del fármaco, 10 días después del comienzo de la administración del fármaco, al final de la administración del fármaco y 3 semanas después del periodo de convalecencia antes de la autopsia, se les extrajeron 5 ml de sangre de la vena safena, se separó el suero después de la centrifugación y se analizó lo siguiente: aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (ALP), lactato deshidrogenasa (LDH), creatina fosfoquinasa (CPK), nitrógeno ureico sanguíneo (NUS), proteína total (PT), albúmina (ALB), glucosa (GLU), bilirrubina total sérica (Bil-T), creatinina (CRE), colesterol total (Col-T), sodio (Na^+), potasio (K^+), cloruro (Cl^-), calcio (Ca^{++}), magnesio (Mg^{++}) y fósforo (P^{+++}).

10.9 Análisis de orina

- Dos veces antes de la administración del fármaco, 10 días después del comienzo de la administración del fármaco, al final de la administración del fármaco, 3 semanas después del periodo de convalecencia antes de la autopsia, se recogió una muestra de orina para analizar los glóbulos blancos, nitritos, valor del pH, proteínas en la orina, glucosa, cuerpos cetónicos, urobilinógeno, bilirrubina en la orina y hemoglobina.

10.11 Análisis de heces

Se analizaron los huevos de parásitos y sangre oculta en las heces antes de la administración del fármaco. También se realizó un análisis de sangre oculta en las heces 10 días después del comienzo de la administración del fármaco, al final de la administración del fármaco y 3 semanas después del periodo de convalecencia.

35 10.12 Examen del fondo de ojo:

Se realizó el examen del fondo de ojo con anestesia antes de la autopsia.

10.13 Autopsia sistémica:

- Se sacrificaron 2/3 y 1/3 de los animales de cada grupo (con 2 hembras y 1 macho en cada uno) 24 horas después de 3 semanas de administración del fármaco y al final del periodo de convalecencia tras finalizar la administración del fármaco, y se realizó la autopsia.

10.14 Coeficiente de órganos:

Se extrajeron corazón, cerebro, hígado, bazo, pulmones, riñones, glándulas suprarrenales, timo, ganglios linfáticos, tiroides, testículos o útero, ovario o próstata, se pesaron y se les calculó el coeficiente.

10.15 Examen histopatológico:

- 45 Se realizó el examen histopatológico de los órganos siguientes: corazón (pared anterior del ventrículo izquierdo, ventrículo derecho, tabique, aurícula izquierda, aurícula derecha), hígado, bazo, pulmones, cerebro, estómago, duodeno, íleon, colon, riñones, vejiga urinaria, glándulas suprarrenales, hipófisis, tiroides, timo, páncreas, testículos, próstata, ovario, útero, ganglios linfáticos (cervical, mesenterio), vasos y tejido subcutáneo del sitio de la inyección.

10.16 Examen de la médula ósea:

- 50 Se utilizó anestesia para tomar las muestras de la médula ósea del hueso femoral antes de la autopsia, se realizaron

frotis, tinción y el examen al microscopio óptico para estudiar los sistemas de macrófagos, granulocitos y eritrocitos, linfocitos, plasmocitos y otro tipo de células. Se contarán 5 × 100 células nucleadas en los cuatro cuadrantes y la parte central, se calcula la razón de GE y se toman fotografías.

- 10.17 Detección de anticuerpos contra la neurregulina 1β_{S177-Q237} recombinante de humano para inyección en el suero: 1, 2 y 3 semanas después del comienzo de la administración del fármaco y al final del periodo de convalecencia, se detectaron anticuerpos contra la neurregulina 1β_{S177-Q237} recombinante de humano para inyección en el suero, y se detendrá la administración del fármaco siempre que se detecte algún anticuerpo y el anticuerpo detectado sea un anticuerpo neutralizante.

10.18 Procesamiento de datos y análisis estadístico:

- 10 Se realiza el análisis de varianza como prueba estadística para los datos recogidos de diferentes grupos de dosis y grupo de control.

11. Resultados del experimento:

11.1 Estado de la muerte:

- 15 No se produjo la muerte de ningún animal asociada al fármaco problema mientras duró el experimento. Al finalizar las 3 semanas de administración del fármaco, se observó una desaceleración significativa de la frecuencia cardíaca (20-30 latidos/min) de 1 animal de cada grupo (n.^{os} 5 y 6) en el grupo de control y en el grupo con dosis baja mediante el examen ecocardiográfico con anestesia al finalizar el periodo de convalecencia de 3 semanas; al manifestarse una sobreenestesia, se realizó, por lo tanto, la autopsia una día antes de lo programado.

11.2 Manifestaciones generales:

- 20 Se produjeron vómitos en un mono macho en el grupo con dosis alta 30 minutos después de la inyección intravenosa en el día 2 de la administración del fármaco. Durante 2-7 días de la administración del fármaco, 1 animal de cada uno de los grupos con dosis alta e intermedia vomitó a los 20-30 minutos de la inyección intravenosa. Se produjo salivación en parte de los animales en cada grupo después de 1 semana de administración del fármaco, la tasa de aparición era significativamente más alta en el grupo con dosis alta que en los otros grupos que tomaron el fármaco; solo 1 animal del grupo con dosis baja mostró salivación a los 9 días de la administración del fármaco. Apareció horripilación, pérdida de lustre del pelaje, reducción de la actividad, anorexia en el grupo con dosis alta a las 2 semanas de administración del fármaco. Desde el 3.^{er} día de la administración del fármaco comenzó palidez leve, endurecimiento de la región de la piel y de los vasos en el sitio de la inyección, que se exageró progresivamente y era dependiente de la dosis. Los síntomas y signos mencionados más arriba desaparecieron o mejoraron a la 3.^a semana del periodo de convalecencia después de la retirada del fármaco. Se produjo diarrea con heces de color amarillo claro y sin regularidad en el animal n.º 21 del grupo con dosis alta. No apareció ninguna manifestación anormal en los animales del grupo de control durante el periodo de administración del fármaco y el periodo de convalecencia después de la retirada del fármaco.

11.3 Cambios en la masa corporal:

- 35 No se observó ninguna diferencia significativa ($P > 0,05$) de la masa corporal entre los animales del grupo de control y los diferentes grupos que tomaron el fármaco; la autocomparación de los animales antes y después de la administración del fármaco mostró una reducción significativa de la masa corporal de los animales del grupo con dosis alta ($P < 0,01$).

11.4 Temperatura corporal:

- 40 No se observó ninguna diferencia significativa de la temperatura corporal tomada antes de la administración del fármaco y 1 hora después de la administración del fármaco al cabo de 1, 3 y 5 días de la administración del fármaco.

11.5 Ingestión de productos alimentarios para consumo animal:

- 45 Se observó un remanente significativo de productos alimentarios para consumo animal y se observaron diferentes cantidades de ingestión de 50 a 150 g de productos alimentarios para consumo animal en los animales de los grupos de dosis intermedia y alta después de 1 semana de administración del fármaco. No se observó ningún remanente de productos alimentarios para consumo animal en los animales del grupo de control y del grupo de dosis baja, y no apareció ningún remanente de productos alimentarios para consumo animal en todos los animales durante el periodo de convalecencia.

11.6 Resultados del examen mediante electrocardiografía:

- 50 No se observó ninguna desaceleración significativa de la frecuencia cardíaca en ninguno de los animales conscientes de cada grupo que tomó el fármaco a día 10 de la administración del fármaco ($P > 0,05$, cuando se compara con el grupo de control) y se produjo una desaceleración significativa de la frecuencia cardíaca en los animales conscientes de cada grupo que tomó el fármaco, y $P < 0,05$, $P < 0,01$, cuando se compara con el grupo de

control; al mismo tiempo, el intervalo PR, el intervalo del complejo QRS y el intervalo QT se prolongaron en consonancia, lo que es más destacado en los grupos de dosis baja e intermedia, volvieron a la normalidad 3 semanas después de retirar el fármaco; el voltaje de Rv1 en los animales del grupo de dosis intermedia y alta era más alto, mientras que Sv1 en el grupo de dosis alta, intermedia y baja era más profundo, y el voltaje de Rv3 en cada grupo que tomó el fármaco era más alto ($P < 0,05$; $P < 0,01$ y $P < 0,001$). Había una fluctuación leve en otro parámetro individual recogido en otro momento, aunque todos estaban dentro del margen normal.

11.7 Resultados de la ecocardiografía:

No se observó ninguna diferencia significativa en los parámetros del ecocardiograma del grupo de control y de los grupos que tomaron diferentes cantidades de fármaco a las 3 semanas de la administración del fármaco ni al final de las 3 semanas del periodo de convalecencia. ($P < 0,05$).

11.8 Resultados del examen hemático:

No se observaron cambios anormales significativos además de la fluctuación dentro del margen normal de cada uno de los parámetros a lo largo de todo experimento.

11.9 Resultados del análisis bioquímico del suero:

No se observaron cambios anormales significativos además de la fluctuación dentro del margen normal de cada uno de los parámetros a lo largo de todo el experimento.

11.10 Resultados del análisis de orina:

Se observó un incremento de proteínas en la orina, presencia de cuerpos cetónicos, pero sin regularidad, en el análisis de orina de cada uno de los animales de cada grupo que tomó el fármaco y del grupo de control antes de la administración del fármaco, a los 10 días y a las 3 semanas de comenzar la administración del fármaco, y a las 3 semanas del periodo de convalecencia antes de la autopsia. Se observó un incremento transitorio de glóbulos rojos en la orina en determinados animales del grupo de control y en cada grupo que tomó el fármaco. No se observó ninguna otra anomalía significativa.

11.11 Resultados del análisis de heces:

El análisis de sangre oculta en las heces dio negativo y no se observaron huevos de parásitos en las heces en ninguno de los animales antes de la administración del fármaco, a los 10 días y a las 3 semanas del comienzo de la administración del fármaco, y a las 3 semanas del periodo de convalecencia antes de la autopsia.

11.12 Resultados del examen del fondo de ojo:

No se observó ninguna anomalía en el examen del fondo de ojo realizado a las 3 semanas de la administración del fármaco y a las 3 semanas del periodo de convalecencia antes de la autopsia.

11.13 Anatomía sistémica:

Se descubrió un pequeño derrame en la cavidad del pericardio del mono macho n.º 2 y las monas hembra n.º 23 y 24 del grupo de dosis intermedia, y se extrajeron 2-3 ml de líquido transparente de color ligeramente amarillo de cada animal a las 3 semanas de la administración del fármaco; se observó hidrocefalia en el espacio subaracnoideo de los animales n.º 1 y n.º 21 del grupo de dosis alta, y se extrajeron 1-2 ml de líquido transparente de color ligeramente amarillo de cada animal; hay derrame en la cavidad del peritoneo, manchas de sangre en la superficie de la mucosa del colon del animal n.º 21 junto con un foco de úlcera en el animal n.º 21. Se observó congestión y lesión hemorrágica en el lóbulo pulmonar del mono macho n.º 22 del grupo de dosis alta. El mono n.º 8 del grupo de control se murió antes de la autopsia debido a un exceso de anestesia, se observó congestión significativa y hemorragia desigual en los pulmones durante la autopsia, sin observar ninguna otra anomalía significativa.

Al final del periodo de convalecencia de 3 semanas, se observó hidrocefalia en el espacio subaracnoideo en un animal macho y otro hembra (n.º 10, n.º 14) del grupo de dosis alta, y se extrajeron 0,5 ml y 3 ml de líquido de ellos, respectivamente; no se observó ninguna anomalía significativa en el animal que recibió el exceso de anestesia y al que se realizó la autopsia por adelantado.

No se observó ninguna anomalía en los otros órganos.

Los resultados del análisis para el derrame antes mencionado demostraron que todos eran trasudados.

11.14 Masa de los órganos y su coeficiente

Se pesaron los órganos principales y el coeficiente de los órganos se calculó durante la autopsia de los animales. No se observaron cambios anormales en la masa de los órganos, lo que tiene que ver con el fármaco problema.

11.15 Resultados del examen histopatológico:

Aparecieron vacuolas ligeramente teñidas en el citoplasma del miocardio de la aurícula y del ventrículo de los monos macho n.º 1, n.º 11 y de la mona hembra n.º 21 del grupo de dosis alta, cuya gravedad era de «+» o «+ a ++», y se mantuvo la estructura estriada; había una degeneración extensa de tipo vacuola, sin anomalía significativa en el endocardio ni en el pericardio. Por otra parte, se observó congestión vascular y edema leve en el espacio subaracnoideo de los monos n.º 11 y n.º 21; había infiltración de células inflamatorias en parte de la mucosa del colon del animal n.º 21; se observó engrosamiento del tabique de los alvéolos, congestión, hemorragia desigual del pulmón, llenado de líquido edematoso en parte de los alvéolos, autocitólisis parcial de los tejidos de los riñones, estómago, colon, intestino y páncreas durante la autopsia del animal n.º 8, que murió antes de la autopsia. No se observó ninguna otra anomalía.

Se observaron microvacuolas en el citoplasma del miocardio, congestión vascular en el espacio subaracnoideo en la mona hembra n.º 14 del grupo de dosis alta. No se observó ninguna anomalía significativa en los animales a los que se les realizó la autopsia antes debido a una sobreutilización de la anestesia.

No se observó ninguna reacción significativa al estímulo, además de cambios hemorrágicos en los vasos dentro del sitio de inyección en todos los grupos de administración del fármaco. En los restantes animales se observaron lesiones esporádicas accidentales, tales como reacción inflamatoria en los pulmones y el tubo digestivo, la mayoría de las cuales eran lesiones espontáneas.

11.16 Resultados del examen de médula ósea:

Se aspiró la médula ósea del hueso de la cadera derecha antes de la autopsia con anestesia a las 3 semanas de la administración del fármaco y a la 3.ª semana del periodo de convalecencia, se hizo el frotis, se tiñó y se examinaron al microscopio óptico el sistema de megacariocitos, el sistema de granulocitos, el sistema de eritrocitos, los linfocitos y plasmocitos, y otros tipos de células. Se contaron 5 × 100 células nucleadas en los cuatro cuadrantes y la parte central, y se realizó el recuento de la fórmula leucocitaria, se calculó la proporción de GE y se llevó a cabo la microfotografía.

Resultados: se observó proliferación normal en todos los sistemas de granulocitos, eritrocitos y megacariocitos, con una proporción normal del sistema granulocitos por eritrocitos; no se observaron células patológicas anormales y no se ocasionó ningún daño anatomopatológico tóxico a la médula ósea.

11.17 Resultados de la detección en el suero de anticuerpos contra la neurregulina 1β_{S177-Q237} recombinante de humano para inyección:

Todas las detecciones de anticuerpos en el suero contra la neurregulina 1β_{S177-Q237} recombinante de humano para inyección en todos los grupos que tomaron el fármaco a 1, 2, y 3 semanas de comenzar la administración del fármaco y al final de la 3.ª semana del periodo de convalecencia mostraron unos resultados negativos.

12. Discusión:

La inyección por vía intravenosa de 7,5, 15 y 75 µg/kg al día de la neurregulina 1β_{S177-Q237} recombinante de humano para inyección al macaco *rhesus* (la dosis utilizada era equivalente a 2, 4, 20 veces la de la dosis para el mono); se utilizó el excipiente como control; se realizó el seguimiento durante 3 semanas tras retirar el fármaco.

No se produjo ninguna muerte de animal relacionada con el fármaco problema durante el experimento. Se produjeron vómitos, náuseas y salivación en parte de los animales de cada grupo del fármaco problema 1 semana después del comienzo de la administración; se observó horripilación, pelaje sin lustre, reducción de la actividad y anorexia en los animales del grupo de dosis alta 2 semanas después de la administración del fármaco; palidez leve, endurecimiento regional de la piel y de los vasos en el sitio de la inyección del fármaco; los síntomas y signos antes mencionados desaparecieron o se redujeron 3 semanas después de retirar el fármaco. No se observaron manifestaciones anormales en los animales del grupo de control durante el periodo de administración del fármaco ni durante el periodo de convalecencia después de la retirada del fármaco.

La ingestión de alimentos se redujo significativamente y la masa corporal disminuyó notablemente en el grupo de dosis alta en la autocomparación del antes y del después de la administración del fármaco. No había cambios significativos de temperatura corporal en ningún animal antes y después de la administración del fármaco.

Los análisis hemáticos, de bioquímica, de orina y de heces no mostraron cambios toxicológicos significativos.

Electrocardiograma: no se observó ninguna desaceleración significativa de la frecuencia cardíaca en los animales conscientes a los 10 días de la administración del fármaco, mientras que la reducción significativa de la frecuencia cardíaca se produjo a las 3 semanas de la administración del fármaco en los animales conscientes de cada grupo que tomó el fármaco, probablemente debido al efecto farmacológico del fármaco problema; además, se observó un voltaje relativamente alto de las ondas R y S en las derivaciones V1 y V3 del electrocardiograma, probablemente asociado a la variación de la derivación torácica de los animales; no se descubrieron otras anomalías significativas

en el ecocardiograma, en la frecuencia cardíaca ni en otros índices; no se observaron cambios hipertróficos del miocardio en el examen anatomopatológico.

No se observaron cambios anormales en el examen del fondo de ojo.

No se observaron cambios anatomopatológicos tóxicos significativos en el frotis de la médula ósea.

- 5 La autopsia realizada a la 3.^a semana de la administración del fármaco mostró derrame pericárdico en 3 animales, cada uno en los grupos de dosis intermedia y alta, y se pudieron extraer 2-3 ml de trasudado; se descubrió hidrocefalia en el espacio subaracnoideo en 2 animales del grupo de dosis alta y se extrajeron 1-3 ml del trasudado.

En el citoplasma del miocardio aparecieron diferentes cantidades de vacuolas, y se observó congestión vascular y edema leve bajo la piamadre en los que tenían hidrocefalia. Todo ello estaba relacionado de alguna forma con el

- 10 fármaco problema.

El análisis de anticuerpos dio resultados negativos.

Los síntomas digestivos de los animales, tales como vómitos, náuseas y anorexia, pudieron conducir a la reducción adicional de la masa corporal en el grupo de dosis alta debido probablemente a la distribución y a la eliminación del fármaco problema en el tubo digestivo. Se observaron síntomas, tales como palidez, endurecimiento de la piel en el

- 15 sitio de la inyección, derrame pericárdico e hidrocefalia, y sin recuperación total de la hidrocefalia en los animales del grupo de dosis alta 3 semanas después de la retirada, lo que demuestra que el exudado capilar y síndrome de trasudado en el macaco *Rhesus* puede producirse en los grupos de la dosis intermedia y alta de la neurregulina 1 β S177-Q237 recombinante de humano para inyección. Además, quedaron asociadas al fármaco problema la desaceleración de la frecuencia cardíaca en los animales conscientes y las vacuolas en el citoplasma del miocardio de los animales del grupo de dosis alta.

Conclusión: se realizó la inyección por vía intravenosa diaria de 7,5, 15 y 75 μ g/kg al día de la neurregulina 1 β S177-Q237 recombinante de humano para inyección al macaco *Rhesus* durante un total de 3 semanas y se vigiló continuamente durante 3 semanas. Los resultados demostraban que más de 10 días de inyección consecutiva de la neurregulina 1 β S177-Q237 recombinante de humano para inyección podía ocasionar la desaceleración de la frecuencia

25 cardíaca en los animales conscientes; podría conducir a una reacción digestiva, ocasionar derrame pericárdico, hidrocefalia y congestión leve y edema bajo la piamadre en el macaco *Rhesus* en los animales de los grupos de dosis intermedia y alta, sin que se recuperara la hidrocefalia de todo 3 semanas después de retirar el fármaco en los animales del grupo de dosis alta; la palidez y el endurecimiento de la piel y los vasos en el sitio de la inyección se recuperaron gradualmente después de retirar el fármaco. Estas manifestaciones demostraban que la posible causa

30 era el síndrome de exudación-trasudado capilar. La dosis alta de la neurregulina 1 β S177-Q237 recombinante de humano para inyección pudo ocasionar las vacuolas del citoplasma del miocardio; todos los análisis de anticuerpos dieron resultados negativos. El nivel de la dosis que no causó derrame pericárdico ni hidrocefalia durante las 3 semanas de administración del fármaco y el periodo de convalecencia de 3 semanas fue de 7,5 μ g/kg al día.

- 35 Ejemplo 8. Determinación *in vitro* de la actividad de NGR-1 (prueba de ELISA para la activación del receptor con actividad cinasa)

1. Principio del experimento

El gen HER2/neu codifica una proteína transmembranaria p185, que es una proteína cinasa en tirosinas. La fijación de la neurregulina-1 con ErbB3 o ErbB4 induce la formación del heterodímero ErbB3-ErbB2 y de ErbB4-ErbB2, y activa la proteína cinasa en tirosinas codificada por HER2, lo que transmite la señal de funcionamiento de la

40 neurregulina 1. Basándose en el hecho de que la fijación de la neurregulina 1 a sus receptores desencadena la fosforilación de la proteína ErbB2, establecemos un método rápido, sensible y de alto rendimiento para determinar cuantitativamente *in vitro* la actividad biológica de la neurregulina 1 recombinante.

2. Material del experimento

- 2.1 Placa de cultivo de células de 96 pocillos (Corning Company); placa de detección por ELISA de 96 pocillos de
- 45 Costar.

2.2 La línea de células de cáncer de mama humano, adquirida a la ATCC de EE. UU., se cultivó en el medio de cultivo de base a 37 °C y CO₂ al 50%.

2.3 Se pesa una cantidad dada de DMEM, se cuantifica al volumen correspondiente, se le añaden 3,7 g/l de NaHCO₃, 0,1 g/l de glutamina y 5,5 g/l de HEPES.

- 50 2.4 Medio de cultivo de base

Medio de cultivo DMEM con suero de ternera fetal al 10% y 9 mg/l de insulina, conservado a 4 °C.

2.5 PBS esterilizado (0,01 M, pH 7,4).

2.6 Enzima pancreática al 0,5%

Se prepara con Ca^{2+} y Mg^{2+} sin PBS.

2.7 Solución de tampón de recubrimiento del anticuerpo monoclonal anti-ErbB2, loción.

- 5 Se selecciona el anticuerpo monoclonal de ratón contra el dominio extracelular funcional H4 de la ErbB2 de humano que no da reacción cruzada con ErbB3 ni con ErbB4.

Solución de tampón de recubrimiento; pH 9,6, solución de tampón de carbonato a 0,05 M.

Loción: PBS a 0,01 M + Tween-20 al 0,05%.

- 10 2.8 Anticuerpo monoclonal de ratón contra proteasa fosforilada de humano marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (anti-P-tyr-HRP)

2.9 Sustrato, solución de tampón de sustrato

Sustrato (TMB): TMB a 2 mg/ml (preparar con alcohol absoluto).

Tampón del sustrato: ácido cítrico a 0,2 M + Na_2HPO_4 a 0,1 M (pH 5,0).

- 15 Sustrato operativo: 9 ml de la solución de tampón de sustrato + 1 ml de TMB + 10 μl de H_2O_2 al 3% (preparado según se necesita).

2.10 Solución de parada: H_2SO_4 a 2 N.

2.11 Solución de lisis celular

- 20 NaCl a 150 mM + Hepes a 50 mM + Triton-X 100 al 1% + (ortovanadato de sodio) a 2 mM + (tiomersal) al 0,01%. Se le añade un comprimido con mezcla de inhibidores de proteasas (cóctel Tabletten, Proteasen-Inhibitoren) cada 25 ml antes de la operación.

2.12 Material estándar y muestra esperados para el análisis

3. Procedimiento experimental

El procedimiento 3.1 se llevó a cabo el primer día, el del 3.2~3.3, el segundo día, el del 3.4~3.12 se realizó el tercer día; en donde el procedimiento de 3.1 y 3.2 se debe realizar en condiciones estériles.

- 25 3.1 Inoculación de las células

Se amplificaron las células MCF-7 hasta una cantidad dada, se lavaron con la solución de PBS esterilizada, y se digirió a continuación con tripsinasa al 0,25%. Después del recuento, la concentración de las células se reguló con el medio de cultivo de base. Las células se añadieron a una placa de cultivo de células de 96 pocillos, 5×10^4 /pocillo, 100 μl /pocillo, y se cultivaron durante una noche en la estufa de cultivo a 37 °C y CO_2 al 5%.

- 30 3.2 Ayuno celular

Se retira todo el medio de cultivo en la placa de 96 pocillos, se lava cada pocillo con PBS calentado a 37 °C, y se le añaden a continuación 100 μl del medio de cultivo DMEM (sin suero de ternera y sin insulina). Las células se cultivaron durante 24 horas en la estufa de cultivo a 37 °C y CO_2 al 5%.

3.3 Recubrimiento

- 35 Se diluye el anticuerpo contra el dominio extracelular funcional H4 de ErbB2 con la solución de tampón de recubrimiento a 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$, se le añaden a continuación 50 μl /pocillo a la placa para ELISA de 96 pocillos, y se deja reposar durante una noche (16-18 horas) a 4 °C.

3.4 Dilución de la solución de control y de la solución de la muestra que se espera analizar

- 40 Se diluye la solución de control y la muestra que se espera analizar con el medio de cultivo DMEM, respectivamente (sin suero de ternera y sin insulina) para que quede a 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, y se realiza a continuación de nuevo 3 veces la dilución seriada con un total de 9 diluciones.

3.5 Fosforilación de las células

Tras el ayuno, se retira el medio de cultivo de las células de los 96 pocillos, se añade el material estándar y la muestra que se espera analizar, 100 μl /pocillo, y se ponen en marca 2 pocillos en réplica para cada concentración.

Se pone en marcha un control negativo al mismo tiempo (a saber, control con placebo en el medio de cultivo DMEM). Se dejan reaccionar durante 20 minutos a 37 °C.

3.6 Descomposición de las células

- 5 Se retira rápidamente la muestra y se lava una vez con PBS, se le añaden 100 µl de la solución de lisis a cada pocillo, y se lisan durante 30 minutos en un refrigerador a 4 °C. Se agita horizontalmente en un baño con hielo hasta que se despegan las células dependientes del anclaje, 4 °C, 15.000 rpm, centrifugación durante 15 minutos.

3.7 Bloqueo de la placa de detección por ELISA

Se lava la placa 5 veces. Se prepara leche desnatada en polvo al 5% con la solución de lavado, se añaden 200 µl a cada pocillo de la placa, se deja reposar a 37 °C durante 2 horas.

10 3.8 Adición de la muestra

Tras lavar 3 veces la placa para ELISA bloqueada, se le añade la solución estándar de lisis de células y la solución de lisis con la muestra problema con 90 µl/pocillo, se pone en marcha un control negativo al mismo tiempo, y se deja reposar durante 1 hora a 37 °C.

3.9 Adición del anticuerpo marcado con enzima

- 15 Se lava la placa 5 veces, el anticuerpo de ratón contra la tirosina proteica fosforilada unido a la enzima HRP se diluye con la solución 1:500 (se determina mediante el producto utilizando la guía y el tiempo de uso), y se le añaden 100 µl a cada pocillo de la placa. Se deja reposar durante 1 hora a 37 °C.

3.10 Revelado del color del sustrato

- 20 Se lava la placa 5 veces, se le añaden 100 µl/pocillo de la solución de trabajo del sustrato preparada, y se deja reposar durante 10 minutos a 37 °C.

3.11 Finalización

Se le añadió el H₂SO₄ a 2 N a razón de 50 µl/pocillo para finalizar la reacción.

3.12 Lectura del valor de la DO

- 25 Análisis colorimétrico en el lector de ELISA, la longitud de onda de determinación es de 450 nm, longitud de la onda de referencia es de 655 nm, y se guardan los resultados.

4. Cálculos

La construcción con la concentración de la neurregulina 1 recombinante de humano frente al valor de la DO y el análisis se realizó con un método de regresión lineal, y se calcula la dosis semieficaz de cada muestra esperada para el análisis.

30 5. Fórmula de los reactantes necesarios

1. Medio de cultivo de base DMEM

Suero de ternera fetal 100 ml

Insulina 9,2 mg

se añade en 1 l del medio de cultivo DMEM, y se mezcla bien.

35 2. Solución de lisis celular

NaCl 4,38 g

HEPES 5,96 g

ortovanadato de sodio 0,368 g

tiomersal 0,05 g

40 Triton-X 100 5 ml

Se disuelve en 500 ml de H₂O.

3. Solución de recubrimiento (pH 9,6)
NaHCO₃ 0,293 g
Na₂CO₃ 0,159 g
Se disuelve en 100 ml de H₂O.
- 5 4. 10 ml de solución de tampón de sustrato (pH 5,0)
Ácido cítrico 1,02 g
Na₂HPO₄·12H₂O 3,68 g
Se disuelve en H₂O.
5. Solución bloqueo (leche desnatada al 5%)
10 Leche desnatada en polvo 5 g
Disolver en 100 ml de PBS a 0,01 M, pH 7,4
6. PBS a 0,01 M (pH 7,4)
NaHPO₄·12H₂O 2,9014 g
NaH₂PO₄·4H₂O 0,2964 g
15 NaCl 8,5 g
Disolver en 1000 ml de H₂O.
7. PBS-T a 0,01 M (pH 7,4)
Se añade 1 ml de Tween 20 en 2.000 ml de PBS a 0,01 M, se mezcla bien.
8. TMB a 2 mg/ml
20 TMB 20 mg
Se disuelve en 10 ml de alcohol absoluto.
9. PBS a 20× (1000 ml)
Na₂HPO₄·12 H₂O 58 g
NaH₂PO₄·4 H₂O 5,9 g
25 NaCl 170 g
Disolver en 1000 ml de H₂O.

Lista de secuencias

- <110> Zensun (Shanghai) Sci & Tech. Ltd
30
- <120> Métodos y composiciones basados en la neurregulina para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares
- <130>
35
- <140>
<141> 15-5-2003
- <150>
40 <151>
- <160> 2
- <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
45

ES 2 627 547 T3

<210> 1
 <211> 183
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 1

```

agccatcttg taaaatgtgc ggagaaggag aaaactttct gtgtgaatgg aggggagtg 60
ttcatgggtga aagacctttc aaaccctcgc agatacttgt gcaagtgcc aaatgagtt 120
actggtgatc gctgccaaaa ctacgtaatg gccagcttct acaaggcgga ggagctgtac 180
cag 183
  
```

10 <210> 2
 <211> 61
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 2

```

Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 1      5      10
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
  
```

REIVINDICACIONES

1. Una composición para uso en un método para prevenir, tratar o retrasar una enfermedad o trastorno cardiovascular en los mamíferos, en donde la composición comprende una proteína neurregulina o un fragmento funcional de la misma que comprende un dominio de tipo factor de crecimiento epidérmico, o un ácido nucleico que codifica una proteína neurregulina o un fragmento funcional de la misma que comprende un dominio de tipo factor de crecimiento epidérmico, y en donde dicho método comprende la administración de dicha proteína neurregulina durante 21 días, o menos de 21 días, en una pauta posológica total que es igual o menor que 3600 U/kg.
2. La composición para ser usada de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la neurregulina se selecciona del grupo que consiste en neurregulina 1, neurregulina 2, neurregulina 3 y neurregulina 4.
- 10 3. La composición para ser usada de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la neurregulina 1 es la neurregulina $\alpha 2$ o la neurregulina $\beta 2$.
4. La composición para ser usada de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el fragmento de neurregulina $\beta 2$ comprende una secuencia de aminoácidos presentada en la SEQ ID n.º 4.
5. La composición para ser usada de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la neurregulina lleva a cabo su actividad a través de la fijación a un receptor ErbB2, ErbB3 o ErbB4, o una combinación de los mismos.
- 15 6. La composición para ser usada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la composición comprende además un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
7. La composición para ser usada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el mamífero es un humano.
- 20 8. La composición para ser usada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la enfermedad o trastorno cardiovascular es insuficiencia cardíaca, miocarditis vírica o miocardiopatía dilatada (o congestiva) (MCPD).
9. La composición para ser usada de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el método comprende además la administración de un agente profiláctico o terapéutico contra la miocarditis vírica o la miocardiopatía dilatada (o congestiva) (MCPD).
- 25 10. La composición para ser usada de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el agente profiláctico o terapéutico contra la miocarditis vírica se selecciona del grupo que consiste en:
 - (i) un antibiótico, preferiblemente penicilina;
 - (ii) un cardioprotector, preferiblemente taurina;
 - 30 (iii) un antioxidante, preferiblemente vitamina C, vitamina E o la coenzima Q10; y
 - (iv) un nutriente para el miocardio.
11. La composición para ser usada de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el agente profiláctico o terapéutico contra la miocardiopatía dilatada (o congestiva) (MCPD) se selecciona del grupo que consiste en:
 - (i) un cardiotónico, preferiblemente digoxina o Cedilanid;
 - 35 (ii) un diurético, preferiblemente un inhibidor de la anhidrasa carbónica, un diurético osmótico, un inhibidor del simporte de $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$, un inhibidor del simporte de $\text{Na}^+ - \text{Cl}^-$, un inhibidor de los canales de Na^+ del epitelio renal, un antagonista de los receptores de mineralocorticoides;
 - (iii) un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina I (IECA);
 - (iv) un antagonista del calcio, preferiblemente amlodipino; y
 - 40 (v) un antagonista del receptor β , preferiblemente carvedilol.
12. La composición para ser usada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la enfermedad o trastorno cardiovascular es infarto de miocardio, o insuficiencia cardíaca asociada a infarto de miocardio.



Fig. 1

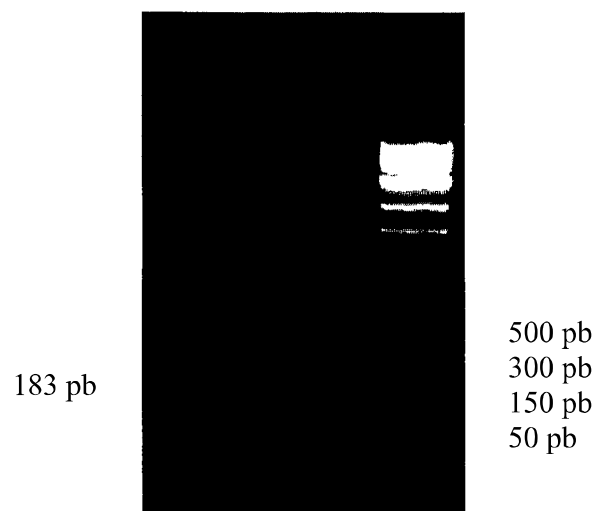


Fig.2

Puntos de referencia de pET-22b(+)

Promotor de T7	361-377
Inicio de transcripción de T7	360
Secuencia codificante de <i>pelB</i>	224-289
Sitios de clonación múltiple (<i>NcoI</i> - <i>XhoI</i>)	158-225
Secuencia codificante de His-Tag	140-157
Terminador de T7	26-72
Secuencia codificante de <i>lacI</i>	764-1843
Origen de pBR322	3277
Secuencia codificante de <i>bla</i>	4038-4895
Origen de fl	5027-5482

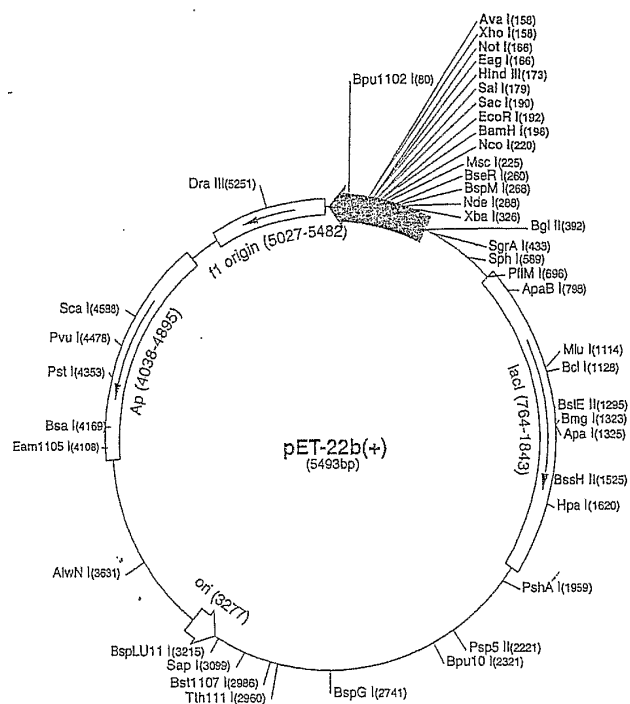


Fig. 3

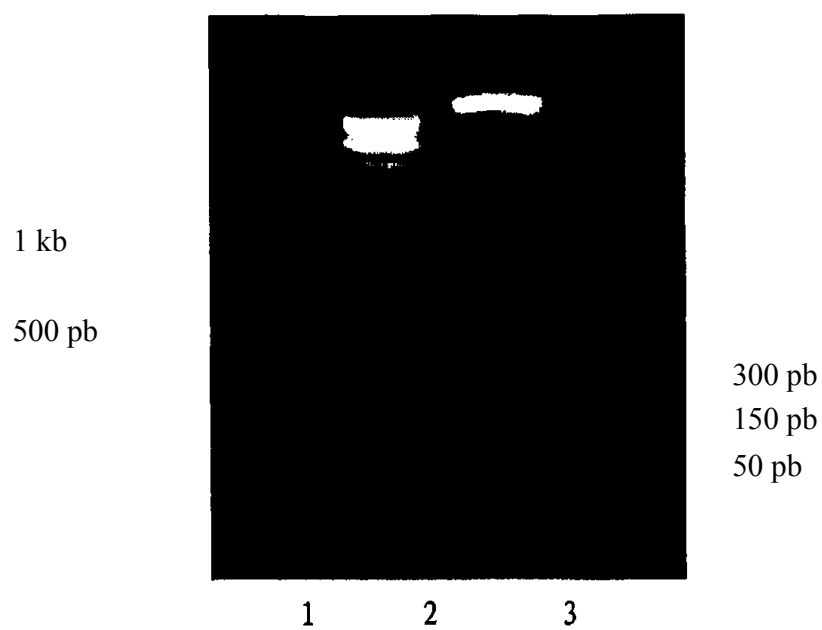


Fig.4

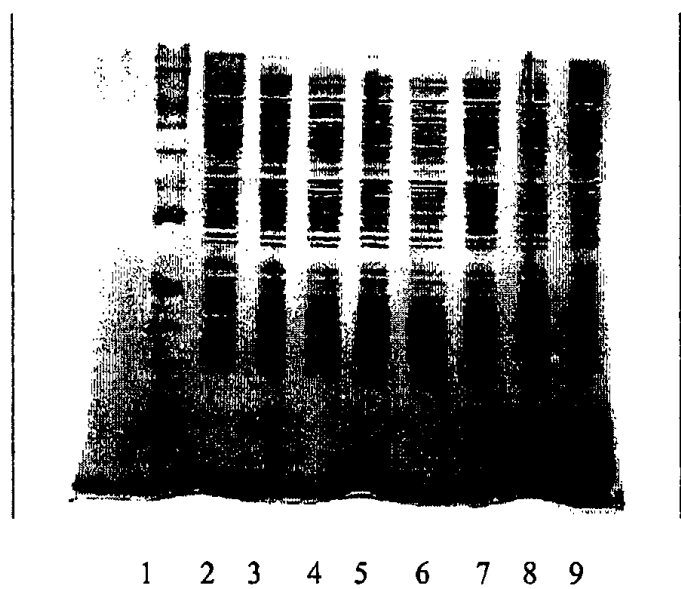


Fig.5

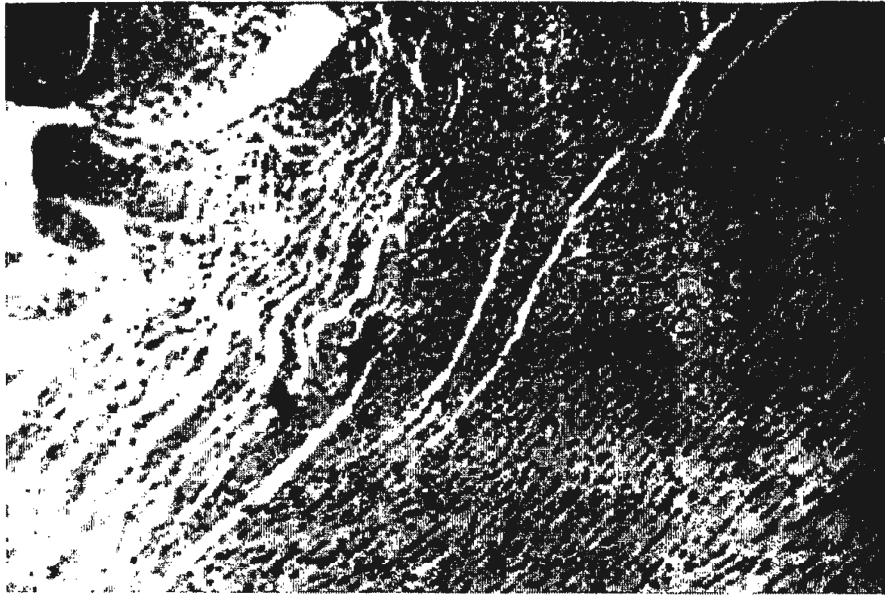


Fig. 6

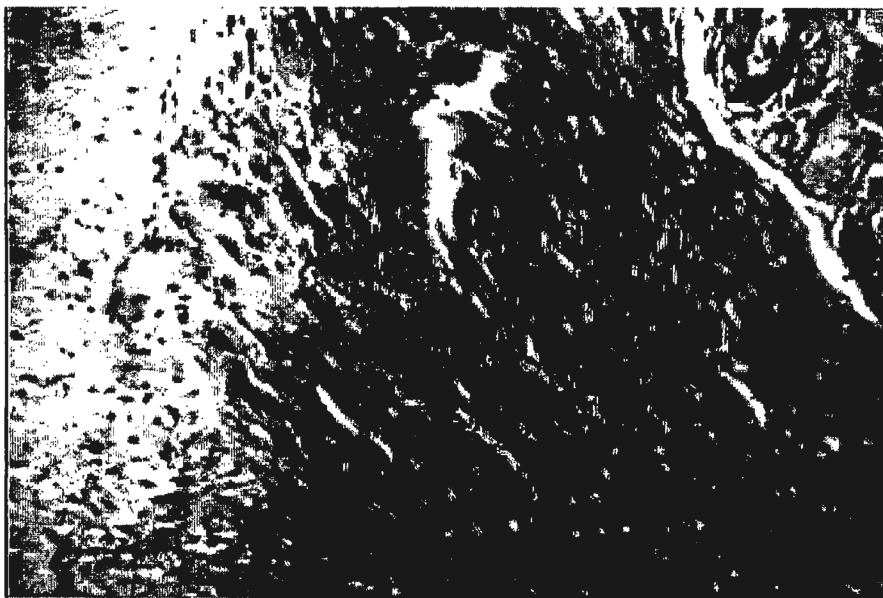


Fig.7



Fig. 8



Fig. 9

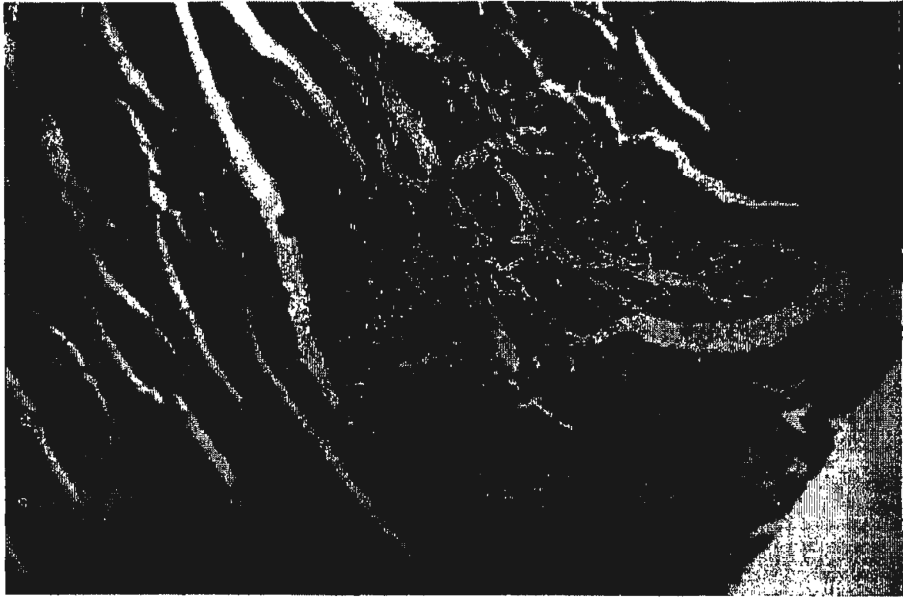


Fig. 10

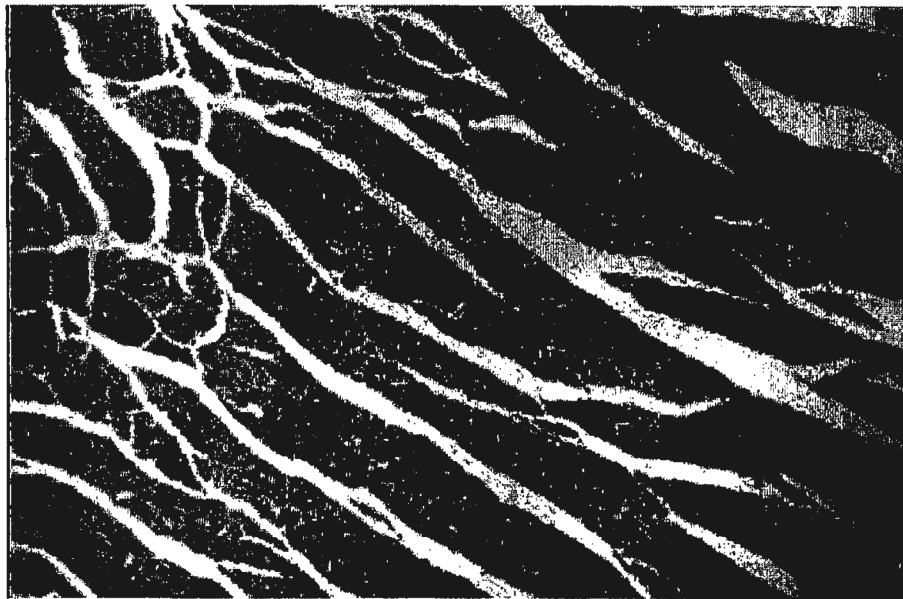


Fig. 11



Fig. 12

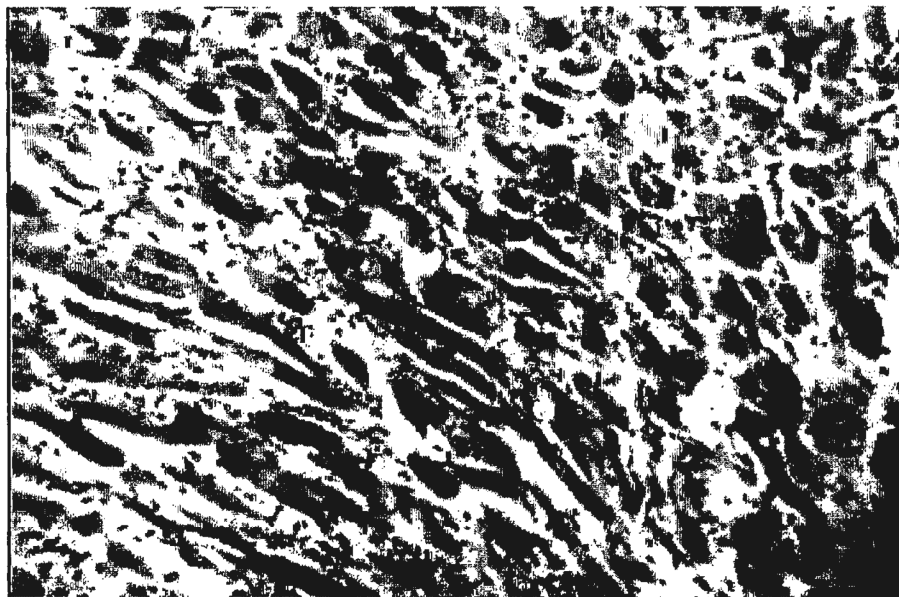


Fig. 13



Fig.14

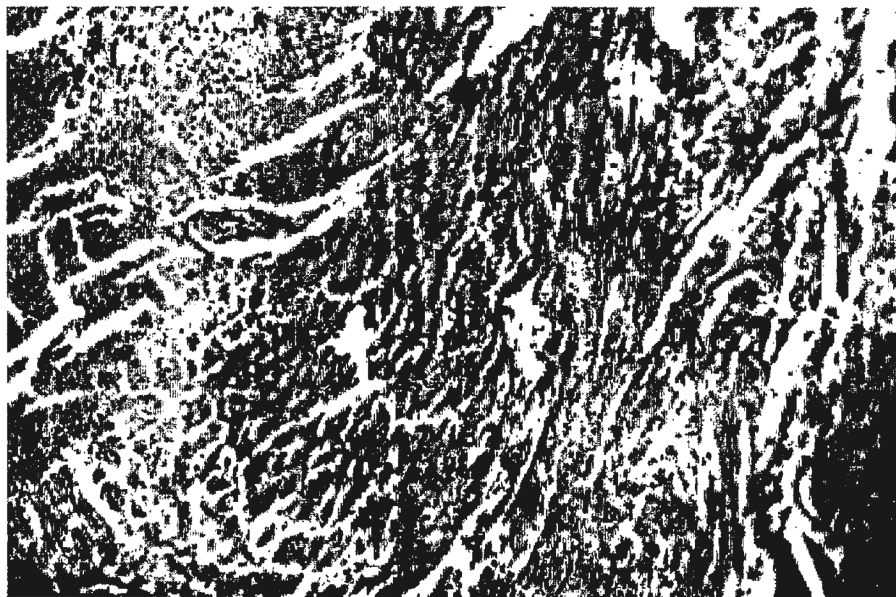


Fig. 15

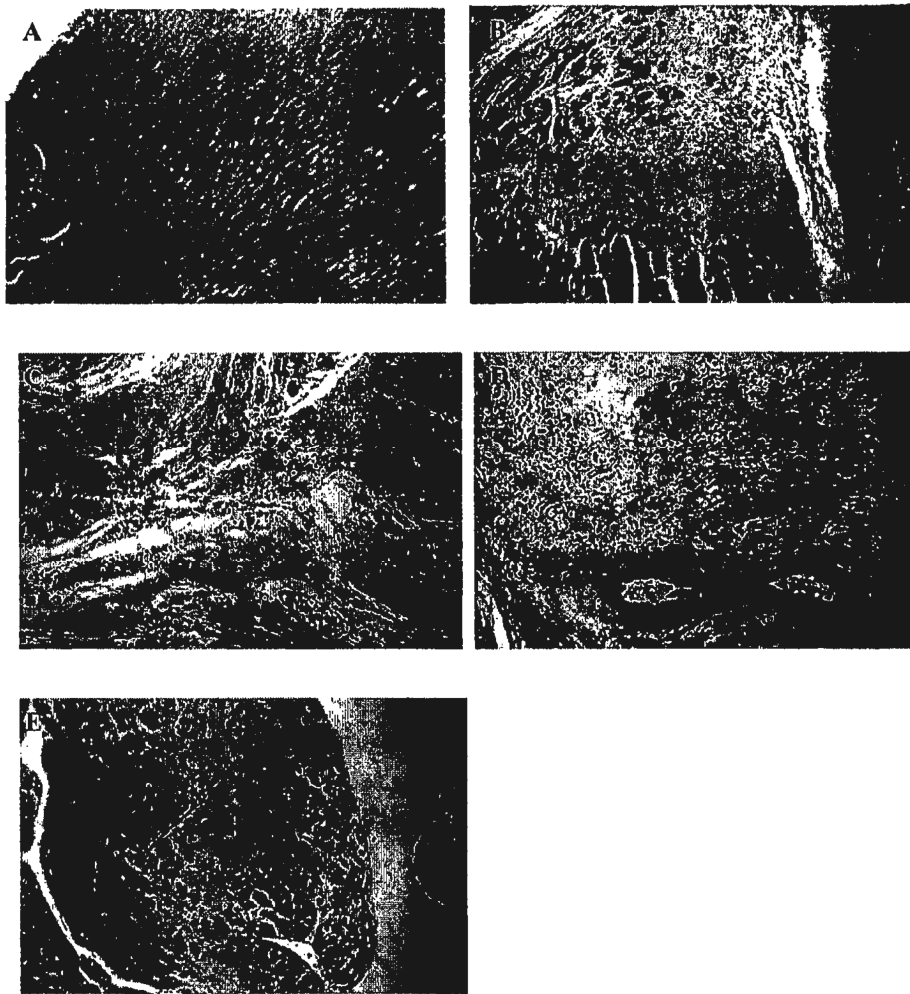


Fig.16

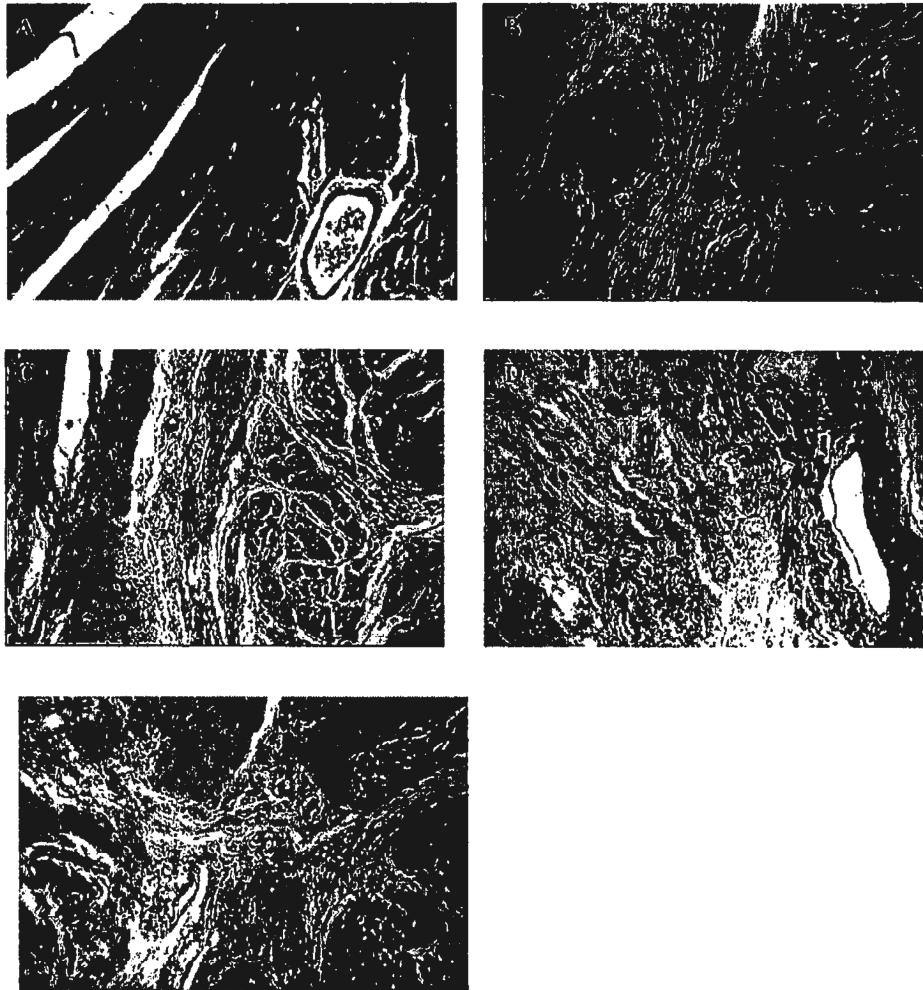


Fig.17

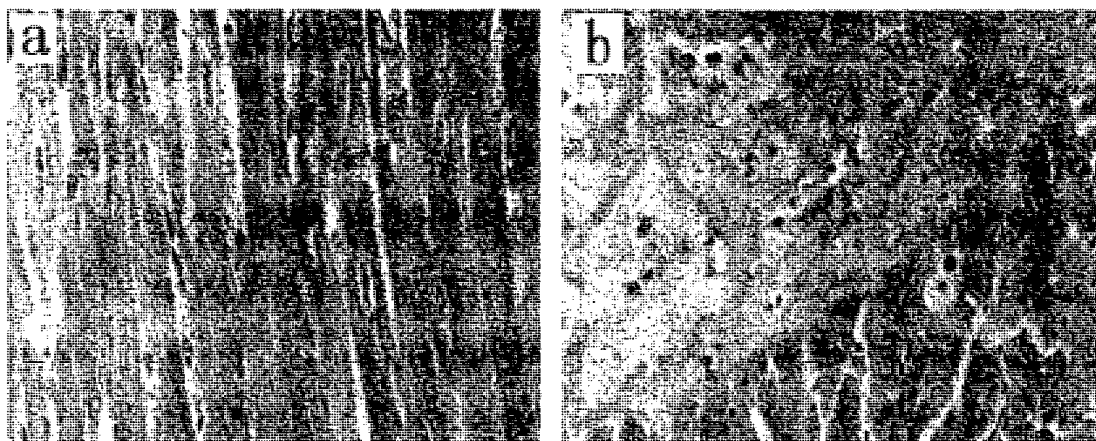


Fig.18

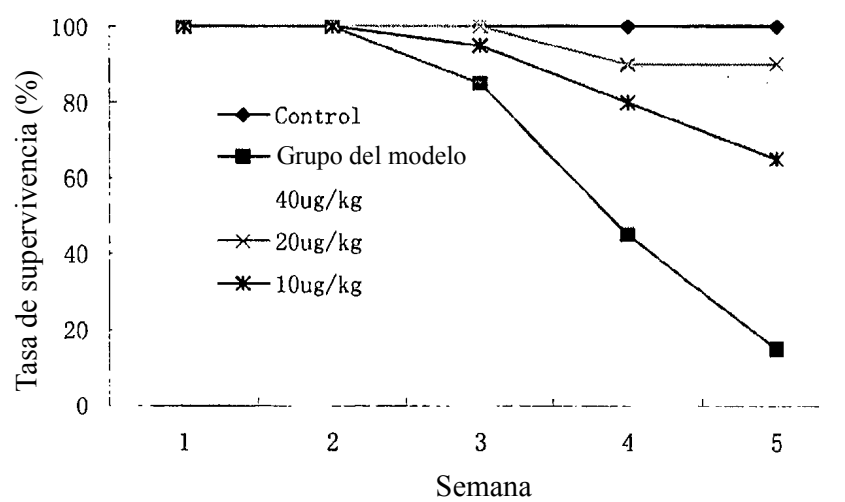


Fig. 19

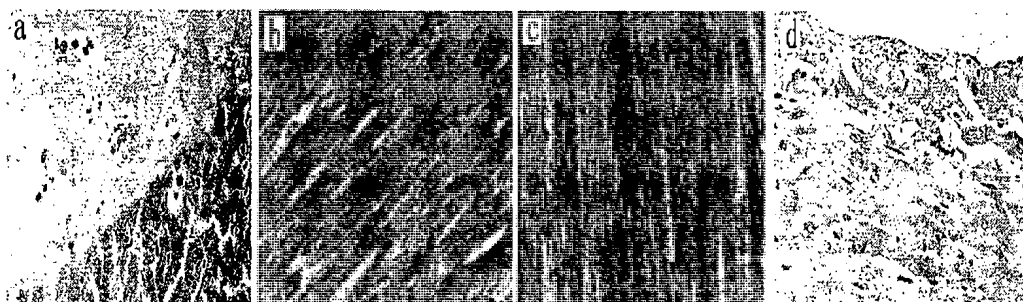


Fig.20

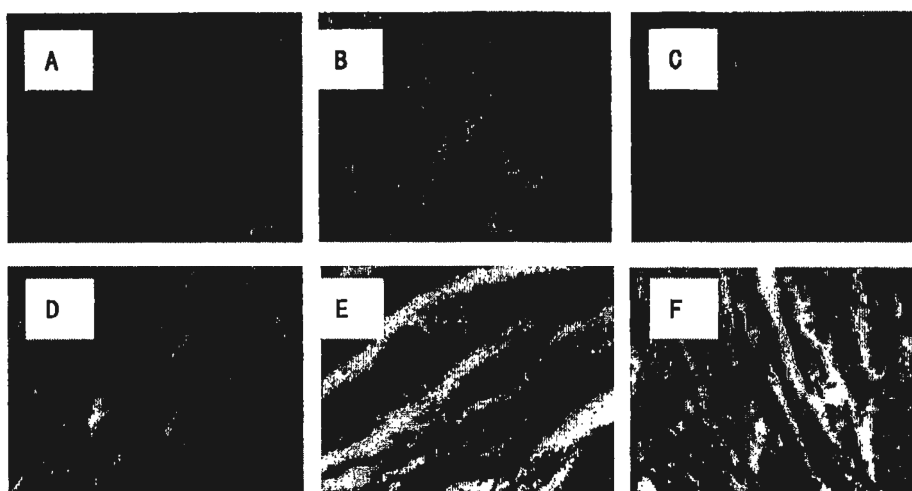


Fig.21

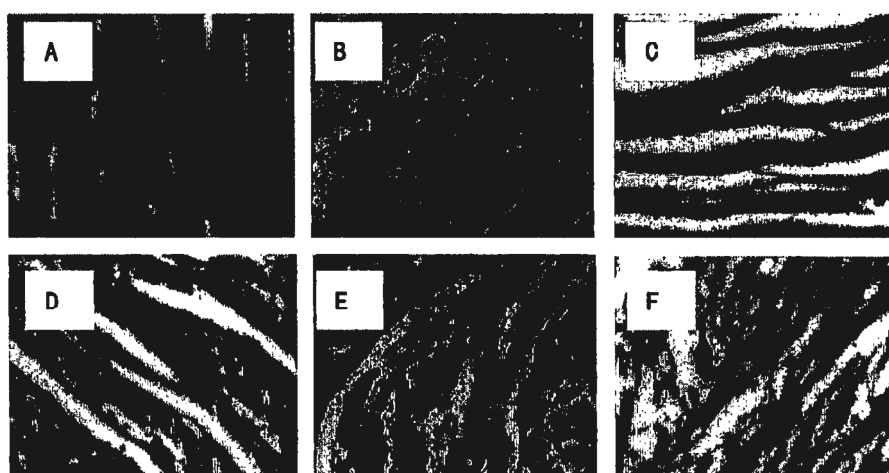


Fig. 22

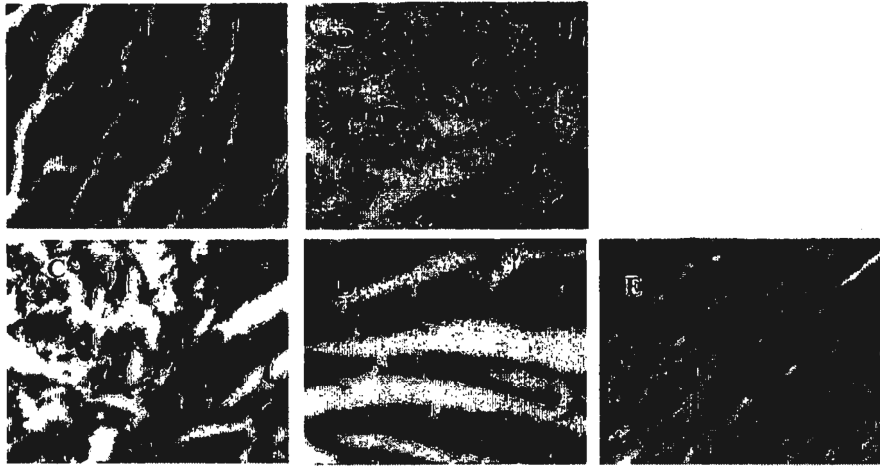


Fig. 23

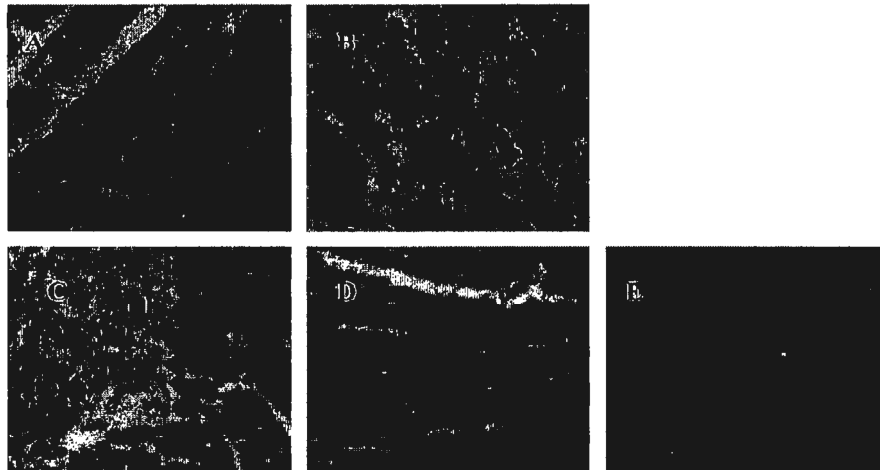


Fig.24