

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 635 313**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 25/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2010 E 14184157 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 2813238**

54 Título: **Uso de una neuregulina para tratar una lesión en nervios periféricos**

30 Prioridad:

14.10.2009 US 251583 P

16.10.2009 US 252161 P

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

03.10.2017

73 Titular/es:

**ACORDA THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
420 Saw Mill River Road
Ardsey, NY 10502, US**

72 Inventor/es:

CAGGIANO, ANTHONY, O.;
BELLA, ANTHONY, J. y
IACI, JENNIFER, F.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 635 313 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

Uso de una neuregulina para tratar una lesión en nervios periféricos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a traumas o lesiones nerviosas. Más particularmente, al uso de una neuregulina o segmentos funcionales de la misma para prevenir, tratar o mejorar las lesiones en nervios periféricos.

Antecedentes de la invención

10 Los nervios periféricos se lesionan con frecuencia al sufrir traumatismos, tales como accidente de automóvil, accidentes de motocicleta, cirugías, heridas por arma blanca y proyectiles y lesiones en el parto tanto en niños como en madres. Las causas quirúrgicas comunes de las lesiones en nervios incluyen la prostatectomía y la mastectomía. Otras lesiones comunes durante la cirugía son el resultado del posicionamiento de miembros a largo plazo o la inevitable o accidental compresión de los nervios. Después de una lesión de los nervios, hay una pérdida sensorial y/o funcional en las regiones del cuerpo inervadas por el nervio dañado. Por ejemplo, después de una lesión nerviosa por prostatectomía, hay comúnmente disfunción eréctil. Después de la mastectomía, a menudo hay pérdida de la función correcta de la extremidad superior y/o escápula. Por otra parte, después de una lesión de nacimiento u
15 otro trauma con daño al plexo braquial, hay una disfunción en la extremidad ipsilateral.

Cualquier terapia que pudiera impedir o limitar la extensión de la disfunción después de una lesión nerviosa tendría un impacto significativo en las estrategias terapéuticas actuales para el tratamiento de las lesiones en nervios periféricos. Hay una necesidad de terapias y tratamientos adicionales para las lesiones en nervios periféricos.

Sumario de la invención

20 Las neuregulinas han sido relacionadas por sus efectos neuroprotectores y neurorestauradores con una variedad de modelos de enfermedades y lesiones del sistema nervioso central en animales. Sin embargo, antes de la presente invención, no se había comprobado nunca que las neuregulinas fueran capaces de prevenir y/o tratar lesiones en nervios periféricos. Por consiguiente, se describen en este documento métodos para tratar o mejorar lesiones en nervios periféricos mediante la administración de neuregulina (por ejemplo, GGF2) o un segmento
25 funcional de la misma a un sujeto que tiene o está en riesgo de padecer una lesión en los nervios periféricos.

30 Se describe que el tratamiento de las lesiones en nervios periféricos con neuregulina puede atenuar la pérdida de la función del nervio periférico, mejorar o atenuar la pérdida de la función nerviosa periférica cuando se administra tanto antes como después de la lesión del nervio y, en algún caso, puede restaurar la función nerviosa periférica. En ciertas descripciones, se evita la lesión del nervio periférico. En ciertas descripciones, se elimina una lesión del nervio periférico existente. En ciertas descripciones, la lesión del nervio periférico no se evita totalmente. En ciertas descripciones, la lesión del nervio periférico existente no se elimina totalmente.

35 El modelo de la disfunción eréctil en ratas se utiliza como un sistema in vivo para demostrar la eficacia de las neuregulinas en el tratamiento de la lesión del nervio periférico. En ciertos aspectos, la descripción está dirigida a tratar la disfunción eréctil resultante de una lesión del nervio periférico, pero la presente descripción no se limita sólo a la disfunción eréctil. La neuregulina puede ser eficaz como monoterapia para cualquier lesión del nervio periférico y no requiere el tratamiento conjunto con conductos nerviosos naturales o artificiales o tratamiento conjunto con terapias celulares, tales como células de Schwann.

40 Ciertas descripciones se dirigen a métodos para tratar las lesiones en nervios periféricos, que comprenden administrar una cantidad eficaz de la neuregulina a un sujeto que tiene una lesión en los nervios periféricos o un sujeto en riesgo de sufrir una lesión en los nervios periféricos. Ciertas descripciones se dirigen a métodos de profilaxis o prevención de lesiones en nervios periféricos, que comprenden administrar una cantidad eficaz de la neuregulina a un sujeto en riesgo de sufrir una lesión en los nervios periféricos. El término sujeto incluye mamíferos, y particularmente sujetos humanos.

45 En ciertas descripciones, la lesión del nervio periférico es consecuencia de un traumatismo incluyendo, sin limitación, accidentes de automóvil, accidentes de motocicleta, cirugías, heridas y lesiones por arma blanca y proyectiles y en el parto. En ciertas descripciones, una lesión en los nervios periféricos es el resultado de una cirugía, tal como una prostatectomía, mastectomía o similares. En el contexto de esencialmente cualquier intervención quirúrgica, la lesión del nervio periférico puede ser el resultado directo de la disección del tejido, la resección del tejido y/o secundaria a la posición y/o compresión de extremidades. En una descripción particular, la
50 neuregulina se utiliza para tratar o prevenir la lesión del nervio periférico que daría lugar a la disfunción eréctil.

En un aspecto de la invención, se proporciona una neuregulina para uso en el tratamiento de una lesión de los nevios cavernosos en un sujeto.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona el uso de una neuregulina en la fabricación de un medicamento para tratar una lesión de los nervios cavernosos en un sujeto.

Otras descripciones están dirigidas al tratamiento de la disfunción eréctil resultante de una lesión quirúrgica en los nervios periféricos relacionados con la función eréctil, tal como el nervio cavernoso y/o el nervio del pene. Las lesiones del nervio cavernoso se producen con frecuencia como resultado de la resección del cáncer de próstata; esta lesión puede causar disfunción eréctil (DE).

5 Las intervenciones farmacéuticas actuales tratan el consiguiente déficit funcional resultante a una lesión al aumentar el flujo de sangre al cuerpo cavernoso para facilitar la erección del pene. Existen intervenciones de dispositivos médicos actuales que tratan el déficit funcional resultante de la lesión mediante el aumento del volumen del pene dando lugar a un estado similar a una erección del pene normal. Hay algunas desventajas para todas las intervenciones existentes que se utilizan para tratar la DE.

10 La presente invención protege de forma aguda a los nervios en el momento de la lesión y/o mejora la recuperación del paciente por la disminución de la gravedad de cualquier déficit funcional.

15 Un péptido de neuregulina 1 (GGF2) se ensayó en un modelo de aplastamiento bilateral en rata, que es un modelo aceptado de la lesión del nervio cavernoso; este modelo se ha utilizado para probar los fármacos Sildenafil y otros para la DE. Tal como se expone en el presente documento, el GGF2 mejoró los resultados funcionales cuando los nervios se electro-estimularon 5 semanas después de la lesión y se midió la presión inter-cavernosa (PIC).

20 Ciertas descripciones están dirigidas al tratamiento con neuregulina de lesiones del nervio después de la mastectomía. Las lesiones en nervios torácicos largos, intercostobraquiales y toracodorsales son comunes durante la mastectomía, aunque también pueden ser dañados otros nervios y la neuregulina se puede utilizar para prevenir o tratar tales lesiones. La neuregulina puede ser administrada antes y/o después de la mastectomía para proteger y restaurar la función nerviosa. Hay muchas medidas de uso comunes de la función de las extremidades superiores, incluyendo la fuerza, la sensibilidad, la amplitud del movimiento y los reflejos; siendo todos o algunos de los cuales apropiados para la determinación de la protección de la función nerviosa o la restauración. La presente descripción se aplica igualmente a cualquier nervio lesionado en cualquier procedimiento médico o quirúrgico.

25 Otras descripciones incluyen el tratamiento con neuregulina de lesiones nerviosas tras un traumatismo en el plexo braquial. La lesión del plexo braquial es un resultado común de un traumatismo contundente, trauma del nacimiento, accidente de tráfico, lesiones deportivas y que causa déficits motores y sensoriales de la extremidad afectada. La neuregulina puede administrarse a una persona con un plexo braquial para reducir el daño y restaurar la función del miembro. En situaciones que se prevén, tales como el parto, una composición de la invención se puede administrar profilácticamente. La función del miembro se puede medir por cualquier número de medidas neurológicas aceptadas de la función motora, la fuerza, la sensación, la amplitud de movimiento y/o los reflejos.

30 Ciertas descripciones incluyen la administración de aproximadamente 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 1-10, 1-20, 10-20, 1-30, 1-40, 1-50, 10-20, 10-30, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 15-25, 15-40, 15-35, 15-50, 20-50, 20-40, 20-40, 25-35, 30-50, 30-60, 50-75, 50-100, 100, 1-100, 100-150, 150-200, 200, 1-200 μ g o mg del polipéptido de neuregulina o un péptido basado en la actividad de la neuregulina particular usada y el contexto médico como se aprecia por cualquier experto ordinario. Ciertas descripciones incluyen la administración de neuregulina antes y/o después de la cirugía.

35 En ciertos aspectos, la neuregulina puede ser cualquier neuregulina de longitud completa codificada por los genes NRG1, 2, 3 ó 4. En un aspecto adicional, la neuregulina puede ser cualquier segmento funcional de un polipéptido de neuregulina. En ciertas realizaciones, el segmento funcional de la neuregulina contiene un dominio del tipo EGF. En ciertas realizaciones, la neuregulina puede ser cualquier péptido de los genes NRG1, 2, 3 ó 4 que se unen y activan los receptores erbB. En ciertas realizaciones, la neuregulina puede ser cualquier péptido modificado de un péptido tipo salvaje codificado por los genes NRG1, 2, 3 ó 4, de forma que el péptido modificado se una y active los receptores erbB.

40 Las neuregulinas y los polipéptidos que contienen dominios similares a EGF de las neuregulinas pueden administrarse a sujetos con un diluyente farmacéuticamente aceptable, vehículo o excipiente, en forma de dosificación unitaria. La práctica farmacéutica convencional se puede emplear para proporcionar formulaciones o composiciones adecuadas para administrar tales composiciones a pacientes o animales de experimentación. Aunque se prefiere la administración intravenosa, se puede emplear cualquier vía de administración apropiada, por ejemplo, administración parenteral, subcutánea, intramuscular, intracraneal, intraorbital, oftálmica, intraventricular, intracapsular, intraespinal, intracisternal, intraperitoneal, intranasal, por aerosol, oral o transdérmica o tópica (por ejemplo, mediante la aplicación de un dispositivo o un parche adhesivo que lleve una formulación capaz de atravesar la dermis y entrar en el torrente sanguíneo). Las formulaciones terapéuticas pueden estar en forma de soluciones o suspensiones líquidas; para la administración oral, las formulaciones pueden estar en forma de comprimidos o cápsulas; y para las formulaciones intranasales, en forma de polvos, gotas nasales o aerosoles.

45 Por "neuregulina-1", "NRG-1" y "heregulina" se entiende un polipéptido que se une a los receptores ErbB 1, 3 ó 4, y por el emparejamiento del receptor (dimerización) también a ErbB2. En una realización, la neuregulina es codificada por el gen del ligando p185erbB2 que se describe en las patentes de EE.UU. No. 5.530.109; 5.716.930; y 7.037.888.

50 En una realización, la neuregulina es GGF2 o cualquier subsecuencia del mismo, o cualquier molécula que comprenda toda o una parte activa de la secuencia de GGF2.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" o una "cantidad eficaz" se pretende que signifique esa cantidad de neuregulina que provoca una respuesta biológica o médica de un tejido, un sistema, animal o ser humano que está siendo buscada por un investigador, veterinario, doctor en medicina u otro clínico.

5 Un cambio terapéutico es un cambio en una característica bioquímica o fisiológica medida en una dirección que alivie la enfermedad o condición tratada, por ejemplo, una lesión de un nervio periférico. Más particularmente, una "cantidad eficaz" es una cantidad suficiente que disminuya los síntomas asociados con una afección médica o enfermedad, para normalizar las funciones del cuerpo en la enfermedad o trastornos que resultan en la alteración de las funciones corporales específicas, o para proporcionar una mejora en uno o más de los parámetros clínicamente medidos de una enfermedad o condición.

10 El uso del término "o" en las reivindicaciones se usa para significar "y/o" a menos que se indique explícitamente para referirse a alternativas solamente o cuando las alternativas sean mutuamente excluyentes. También se contempla que cualquier cosa que aparezca bajo el uso del término "o" también puede ser excluida específicamente de las otras opciones que se exponen.

15 A lo largo de esta solicitud, el término "aproximadamente" se utiliza para indicar que el valor está dentro de 85%, 90%, 95% o la desviación estándar del error para el dispositivo o método que se emplea para determinar el valor.

Siguiendo la ley de patentes desde hace mucho tiempo, las palabras "un" y "una", en las reivindicaciones o la memoria descriptiva, denota uno o más, a menos que se indique específicamente.

20 En ciertas descripciones, la neuregulina se utiliza profilácticamente previniendo o reduciendo mediante ello una lesión potencial. En ciertas descripciones, la neuregulina se usa pronósticamente para indicar el estado futuro del sujeto. En ciertas descripciones, la neuregulina se usa diagnósticamente para indicar la presencia o probable presencia de una condición o estado. En ciertas descripciones, la neuregulina se utiliza terapéuticamente con el fin de afectar a una condición de alguna manera que disminuya o elimine un síntoma o signo de la afección o enfermedad que se está tratando.

25 Otros objetos, características y ventajas de la presente invención se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones específicas de la invención, se dan a modo de ilustración solamente.

Breve descripción de los dibujos

30 Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar ciertos aspectos de la presente descripción. La invención puede entenderse mejor por referencia a alguno de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en este documento.

Figura. 1: Datos de cambio medio de la PIC.

Figura. 2: Datos normalizados respecto a las presiones aórticas.

35 Figura. 3: Marcaje fluoro-oro representativo de los ganglios pélvicos principales (GPP) a partir de 3 animales por grupo de tratamiento ((grupo A) normal, (grupo B) aplastamiento, (grupo C) aplastamiento + GGF2). El fluoro-oro inyectado en el tejido del pene se transporta de forma retrógrada hacia atrás a través de los nervios intactos a los cuerpos celulares en el GPP. Grupo A: Los animales normales muestran la cantidad de marcaje retrógrado observado en ausencia de lesión del nervio. Grupo B: Los animales que han sufrido aplastamiento muestran una drástica reducción en las fibras nerviosas intactas de la lesión, ya que el marcador de fluoro-oro no es capaz de transportar todo el camino de vuelta al GPP. Grupo C: Los animales que han sufrido aplastamiento + GGF2 muestran un aumento del número de células GPP marcadas con fluoro-oro, lo que indica que hay más fibras nerviosas preservadas presentes después de una lesión como resultado del tratamiento con GGF2.

40 Figura. 4: Cuantificación del marcaje con fluoro-oro en el GPP. Los resultados mostraron que los animales normales tenían un gran número de marcajes de cuerpos celulares en el GPP. Después de una lesión por aplastamiento el número de células marcadas se reduce drásticamente, como consecuencia de los daños de las fibras nerviosas y la incapacidad resultante de transportar retrógradamente el marcador de nuevo al GPP. Sin embargo, el tratamiento con GGF2 mejoró el número de fibras nerviosas intactas disponibles para transportar el fluoro-oro del tejido del pene al GPP de una manera retrógrada, lo que resultó en un mayor número de células marcadas.

45 Figura. 5: Tinción representativa de los niveles de nNOS. El nNOS cavernoso es un marcador bien conocido de la preservación del nervio cavernoso. Los resultados de este trabajo incluyen la tinción de tejidos normales (grupo A). En comparación, hubo una pérdida significativa de la tinción de nNOS después de la lesión por aplastamiento del nervio cavernoso (grupo B). La tinción de nNOS preservada de terminaciones nerviosas cavernosas en el cuerpo del pene mostró un aumento de las tasas de supervivencia de los nervios cavernosos tras la lesión por aplastamiento con el tratamiento de GGF2 (grupo C). La densidad de tinción indica la conservación de la tinción de nNOS con el tratamiento de GGF2.

Figura. 6: Tinción representativa de los niveles de tirosina hidroxilasa (TH). Los resultados en esta figura muestran en el grupo A la tinción de tejidos normales y en el grupo B una pérdida significativa de la tinción de TH después de una lesión por aplastamiento del nervio cavernoso. El grupo C muestra la tinción preservada de TH de las terminaciones nerviosas cavernosas en el cuerpo del pene; este hallazgo se corresponde con una conservación general o restablecimiento de la inervación del pene después de la lesión por aplastamiento que se produce por el tratamiento con GGF2. Por lo tanto, la densidad de tinción indica la preservación de la tinción con TH con el tratamiento de GGF2.

Figura. 7: Tinción representativa del transportador vesicular de acetilcolina (VAcChT). Los resultados muestran la tinción de tejidos normales (grupo A) y una pérdida significativa de la tinción de VAcChT después de la lesión por aplastamiento del nervio cavernoso (grupo B). Por el contrario, la tinción preservada con VAcChT de las terminaciones del nervio cavernoso en el cuerpo del pene mostrada en el (panel C) muestra que las tasas de supervivencia de los nervios cavernosos aumentan después de una lesión por aplastamiento con el tratamiento de GGF2 (C). La densidad de la tinción muestra tendencias hacia la preservación de la tinción con VAcChT con el tratamiento de GGF2.

Descripción detallada de la invención

La lesión en los nervios periféricos es el resultado común de varios eventos, compresión, contusión, transacción, aplastamiento o estiramiento, causados, por ejemplo, por un traumatismo, un accidente o una cirugía. Aunque los factores externos que conducen a la lesión del nervio son variados, las manifestaciones a nivel del nervio tienen características comunes (para una revisión, véase, por ejemplo, Lee y Wolfe, J Am Acad Orthop Surg, 8 (4), p. 243, 2008). Las lesiones traumáticas de cualquier etiología a menudo causan daño a la mielinización, epineuro, perineuro, endoneuro y a los axones. En los casos más favorables, la lesión se produce principalmente en la mielina y el epineuro, después de la cual se produce la recuperación completa espontáneamente a los varios días o semanas.

Muchas de las lesiones nerviosas, sin embargo, resultan en un daño al endoneuro y a los axones y dan lugar a una alteración de la función que no se recupera totalmente o se recupera en un período prolongado de tiempo.

Por otra parte, con una lesión del nervio periférico que involucre el daño de un axón, hay degeneración local de ese axón que se produce unas horas después de la lesión. En los siguientes días, el cuerpo celular de la neurona proximal y el axón sufren un proceso conocido como degeneración walleriana. Después de la degeneración del axón, las células de Schwann productoras de mielina mueren dejando restos y una inflamación. Esta muerte de las células de Schwann y la inflamación relacionada agravan el daño al nervio.

A diferencia del sistema nervioso central, puede producirse una cantidad significativa de regeneración en los nervios periféricos. Los axones crecen a lo largo de los canales del perineuro y re-inervan objetivos distales y las células de Schwann re-mielinizan los axones. Aunque haya regeneración de los nervios periféricos, por desgracia, este proceso no es perfecto; muchas neuronas que sufren degeneración nunca se regeneran o nunca encuentran su objetivo original y ocurre una disfunción o disfunciones permanentes. Esta disfunción puede comprender la pérdida de la función motora, la pérdida de la función sensorial, parestesias, la pérdida de reflejos, rigidez, contracturas o disminución del rango de movimiento.

Cualquier terapia que pudiera limitar el alcance de la disfunción después de una lesión del nervio tendría un impacto significativo en las estrategias terapéuticas actuales para el tratamiento de las lesiones en nervios periféricos.

Varias publicaciones demuestran que las neuregulinas mejoran la capacidad de que las neuronas se regeneren a través de conductos artificiales y funcionan como un tratamiento adyuvante con terapias celulares tales como los injertos de células de Schwann.

El modelo empleado en estos estudios (modelo de disfunción eréctil en rata) es un modelo estándar, aceptado y bien publicitado de la lesión del nervio periférico. En este enfoque específico, el nervio cavernoso se lesiona por la compresión con fórceps. La misma lesión por compresión o aplastamiento puede ser utilizada como modelo en cualquier otro nervio periférico. En el modelo de lesión del nervio cavernoso, el déficit funcional está en la función eréctil. En vista de la fisiopatología común y consistente de la lesión nerviosa traumática, dicha lesión del nervio cavernoso es un excelente modelo para la lesión inducida por prostatectomía, así como un modelo general para todas las lesiones nerviosas periféricas traumáticas.

Las lesiones en los nervios periféricos inducen cambios dentro de los cuerpos celulares de las neuronas sensoriales localizadas en el ganglio de la raíz dorsal (GRD); estos cambios promueven la supervivencia y la regeneración axonal. En condiciones favorables, por ejemplo, después de una lesión por aplastamiento, la mayoría de las fibras nerviosas se regeneran con éxito. Sin embargo, en muchas circunstancias clínicamente relevantes, la lesión traumática de los nervios o inducida por una enfermedad tiene un mal resultado con sólo una vuelta moderada de la función y, a menudo, con un retraso considerable. En tales casos, se pueden desarrollar estados de dolor neuropático o crónico.

El dolor se asocia normalmente con una lesión o daño del nervio sensorial y da como resultado la protección e

inmovilización de la zona afectada. La nocicepción (la señalización neuronal que subyace a la sensación de dolor), por lo tanto, es concomitante a los mecanismos para la promoción de una curación rápida, aunque activen una experiencia sensorial y emocional desagradable. Sin embargo, en muchas situaciones patológicas, las entradas nociceptivas pueden resultar en cambios funcionales que son activamente perjudiciales para el organismo.

- 5 La lesión del nervio causa la alteración de muchas de las propiedades de las neuronas aferentes primarias y de sus conexiones centrales en la médula espinal, que conducen a la alodinia (la percepción del dolor de un estímulo normalmente inocuo), hiperalgesia (una respuesta exagerada a cualquier estímulo doloroso dado) y una expansión del campo receptivo (es decir, el área que es "dolorosa" cuando se aplica un estímulo). La mayoría de las condiciones de dolor crónico surgen como resultado del daño tanto al tejido nervioso central como al periférico.

10 Disfunción eréctil

La impotencia, o también conocida como disfunción eréctil (DE), es un problema común que afecta a 20 millones de hombres en los Estados Unidos solamente. La erección del pene es un fenómeno neurovascular que depende tanto de la integridad neuronal como de los vasos sanguíneos funcionales. Tras la estimulación sexual, se liberan neurotransmisores (especialmente el óxido nítrico) de los terminales de los nervios cavernosos y de las células endoteliales. La relajación resultante de los músculos lisos de arterias y arteriolas aumenta el flujo arterial. La sangre atrapada dentro de los cuerpos cavernosos del pene lleva a un estado de erección.

- 15 La lesión del nervio cavernoso por cirugías pélvicas radicales, tales como para el cáncer de próstata, de vejiga o del recto, es una de las causas más comunes de la disfunción eréctil iatrogénica en este país. La DE es una fuente importante de morbilidad después de la prostatectomía radical. Por ejemplo, a pesar de la introducción de técnicas quirúrgicas para preservar los nervios, las tasas de potencia postoperatorias están en el intervalo del 30% y el 80% de los hombres que han sido sometidos a procedimientos de conservación del nervio cavernoso bilateral para el cáncer de próstata órgano-confinado (Wang, J Sex Med, 4: 1085-97, 2007).

- 20 Varias estrategias neuromoduladoras se han investigado hasta la fecha; sin embargo, no existen tratamientos disponibles, ya sea para la neuroprotección de los nervios cavernosos antes o en el momento de la lesión, o tratamientos después de la lesión para provocar la regeneración del nervio (Michel et al, J Urol. 176: 227-31, 2006; Burnett y Lue, J Urol 176: 882-7, 2006). A pesar de las modificaciones actuales para preservar los nervios frente a los tratamientos quirúrgicos y de radiación para tumores malignos de la pelvis hay una necesidad de nuevos medios para preservar y restaurar la función eréctil después del tratamiento.

- 25 Se observa un patrón bien definido de cambios celulares distales al sitio del daño, progresando desde la degeneración axonal y de la vaina de mielina, la invasión de macrófagos, la fagocitosis y la desdiferenciación de células de Schwann a la formación de bandas de Bungner. Estos cambios modifican el entorno del nervio lesionado y su potencial para la regeneración de los axones. La supervivencia neuronal se ve facilitada por factores tróficos, cuando los axones pasan de un modo de 'transmisión' a un modo de crecimiento, expresando proteínas (GAP-43, tubulina, actina), nuevos neuropéptidos y citoquinas. Nuevas estrategias de mejora del potencial de crecimiento son necesarias como soporte del muñón del nervio distal y la capacidad neuronal para regenerar no es indefinida (Fu y Gordon, Mol Neurobiol. 14: 67-116, 1997)

Neuregulinas

- 30 Por "neuregulina", "neuregulina-1", "NRG-1", "heregulina" se entiende un polipéptido que se une a los receptores ErbB1, ErbB 3 o ErbB 4 y por emparejamiento (dimerización) al receptor ErbB2. Por ejemplo, una neuregulina puede ser codificada por el gen del ligando p185erbB2 descrito en las patentes de EE.UU. No. 5.530.109; 5.716.930; y 7.037.888.

- 35 También puede ser codificada una neuregulina por los genes NRG-2, 3 y 4. La neuregulina puede ser GGF2 o cualquier fragmento activo del mismo; también puede ser una variante conservadora de GGF2 o una molécula que comprenda GGF2. En un cierto uso en la técnica, el término "neuregulina" está destinado a indicar solamente un dominio tipo EGF de una molécula de neuregulina completa; esto también se conoce como una proteína, péptido o polipéptido "tipo neuregulina".

- 40 Por proteína, péptido o polipéptido "tipo neuregulina" se entiende un polipéptido que posee un dominio del tipo EGF codificado por un gen de neuregulina. En una realización, una proteína, péptido o polipéptido "tipo neuregulina" produce un efecto terapéutico en un sujeto que tiene una lesión en los nervios periféricos o uno en riesgo de lesión del nervio periférico (por ejemplo, pacientes programados para cirugía o parto de tal manera que existe un riesgo de una lesión en los nervios periféricos relacionados).

La secuencia de aminoácidos de GGF2 (con una región que comprende su dominio del tipo EGF subrayado) es:

MRWRRAPRRSGRPGPRAQRPGSAARSSPPLPLLLLLLGTAAALAPGAAAGNEAAPA
 GASVCYSSPPSVGVSQELAQRAAVVIEGKVHPQRRQGGALDRKAAAAAGEAGAWG
 GDREPPAAGPRALGPPAEELLAANGTVPSWPTAPVPSAGEPGEEAPYLKVKVHVQVW
 AVKAGGLKKDSSLTVRLGTWGHAPFSPSCGRLKEDSRYIFFMEPDANSTRAPAAAFRA
 SFPPLETGRNLKKEVSRVLCKRCALPPQLKEMKSQESAAGSKLVLCETSSEYSSLRF
 KWFKNGNELNRKNKPQNIQKPKGKSELRINKASLADSGEYMCKVISKLGNDSSASA
 NITIVESNATSTSTTGTSHLVKCAEKEKTFCVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFT
GDRCQNYVMASFYSTSTPFLSLPE (SEQ ID NO: 1) (Número de entrada del GenBank AAB59622)

En ciertos aspectos de la invención, un polipéptido de neuregulina o segmento del mismo es 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100% idéntico u homólogo a la secuencia de aminoácidos de GGF2. En ciertos aspectos de la invención, un polipéptido tipo neuregulina es 75, 80, 85, 86, 97, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100% idéntico u homólogo a la secuencia de aminoácidos del dominio tipo EGF de GGF2.

Como se usa en el presente documento, una "proteína" o un "polipéptido" se refiere a una molécula que comprende al menos diez residuos de aminoácidos. En ciertas realizaciones, la proteína comprende la totalidad o parte del polipéptido GGF2. En algunas realizaciones, se emplea una versión tipo salvaje de una proteína o polipéptido, sin embargo, en algunas realizaciones de la invención, se emplea una proteína modificada o polipéptido para tratar la lesión del nervio periférico. Los términos "péptido", "proteína" o "polipéptido" se usan indistintamente en el presente documento. Por conveniencia, el término péptido se utiliza en el presente documento para referirse a secuencias de aminoácidos de cualquier longitud.

Un "péptido modificado" se refiere a un péptido cuya estructura química, en particular su secuencia de aminoácidos, se altera con respecto al péptido tipo salvaje respectivo. En algunas realizaciones, un péptido modificado tiene al menos un aminoácido modificado. En algunas realizaciones, un péptido modificado tiene al menos un D-aminoácido. En algunas realizaciones, un péptido modificado tiene al menos un aminoácido de origen no natural.

Sin limitación, en ciertas realizaciones, el tamaño de un péptido (de tipo salvaje o modificado) puede comprender cualquiera de (o cualquier intervalo derivable desde): 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 422, moléculas de aminoácidos o más, y cualquier intervalo derivable en el mismo, de una secuencia de amino correspondiente descrita o referida en el presente documento; en una realización tales proteína, polipéptido o rango de tamaño es relativo a GGF2. Se contempla que los polipéptidos pueden mutarse por truncamiento del amino terminal o carboxi terminal, haciéndolos más cortos que su forma tipo salvaje correspondiente, sino que también pueden ser alterados fusionando o conjugando una secuencia de proteínas heterólogas con una función particular (por ejemplo, para la orientación o localización, para propósitos de purificación, etc.).

Como se usa en este documento, una "molécula de ácido amino" se refiere a cualquier aminoácido, derivado de aminoácido o mimético de aminoácido conocido en la técnica. En ciertas realizaciones, los restos de la molécula de péptido son secuenciales, sin que ninguna molécula no-amino interrumpa la secuencia de restos de amino de la molécula. En otras realizaciones, la secuencia puede comprender uno o más restos de molécula no amino. En realizaciones particulares, la secuencia de restos de la molécula de péptido puede estar interrumpida por uno o más restos de molécula no amino.

Por consiguiente, la expresión "composición de péptido" comprende secuencias de aminoácidos; estos aminoácidos pueden ser cualquiera de los 20 aminoácidos comunes en las proteínas sintetizadas de forma natural o cualquier aminoácido modificado o inusual.

Las composiciones de péptidos se pueden preparar por cualquier técnica conocida por los expertos en la técnica, incluyendo (i) la expresión de péptidos a través de técnicas estándar de biología molecular, (ii) el aislamiento de compuestos peptídicos a partir de fuentes naturales o (iii) la síntesis química. El nucleótido, así como las secuencias de péptidos de determinados genes de neuregulina se han descrito anteriormente, y se pueden encontrar en bases de datos informatizadas reconocidas. Uno de estas bases de datos es la base de datos GenBank y GenPept del Centro Nacional de Información Biotecnológica (en Internet en ncbi.nlm.nih.gov/). Las regiones codificantes de estos genes pueden amplificarse y/o expresarse usando las técnicas descritas en el presente documento o técnicas tales como serían conocidas por los expertos normales en la técnica.

Los péptidos modificados pueden incluir variantes de sustitución, inserción o delección. Las variantes de delección típicamente carecen de uno o más residuos de la molécula de tipo salvaje o nativa. Los residuos individuales se pueden eliminar o un número de aminoácidos contiguos se pueden eliminar. Un codón de parada se puede introducir (por sustitución o inserción) en una secuencia de ácido nucleico que codifica para generar una proteína truncada. Los mutantes por inserción implican típicamente la adición de material en un punto no terminal en el

- péptido. Esto puede incluir la inserción de uno o más residuos. También se pueden generar adiciones terminales, a menudo llamadas proteínas de fusión o péptidos de fusión. Las variantes de sustitución típicamente contienen el intercambio de un aminoácido por otro en uno o más sitios dentro del péptido y se pueden diseñar para modular una o más propiedades del péptido, con o sin la pérdida de otras funciones o propiedades, tales como la unión y la activación de receptores de neuregulina. Las sustituciones pueden ser conservadoras, es decir, un aminoácido se sustituye con otro de forma y carga similar. Alternativamente, las sustituciones pueden ser no conservadoras de tal manera que pueda estar afectada una función o actividad del péptido. Los cambios no conservadores implican típicamente la sustitución de un residuo con otro que es químicamente diferente, tal como un aminoácido polar o cargado con un aminoácido no polar o sin carga, y viceversa.
- 5 Las "sustituciones conservadoras" son bien conocidas en la técnica e incluyen, sin limitación, por ejemplo, las sustituciones de: alanina por serina; arginina por lisina; asparagina por glutamina o histidina; aspartato por glutamato; cisteína por serina; glutamina por asparagina; glutamato por aspartato; glicina por prolina; histidina por asparagina o glutamina; isoleucina por leucina o valina; leucina por valina o isoleucina; lisina por arginina; metionina por leucina o isoleucina; fenilalanina por tirosina o leucina o metionina; serina por treonina; treonina por serina; triptófano por tirosina; tirosina por triptófano o fenilalanina; y valina por isoleucina o leucina.

También se entenderá que las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos pueden incluir residuos adicionales, tales como aminoácidos C- o N-terminales adicionales, o secuencias 5' o 3', respectivamente, siempre que la secuencia cumpla los criterios funcionales establecidos en este documento, tales como el mantenimiento de la actividad biológica. La adición de secuencias terminales se aplica particularmente a secuencias de ácidos nucleicos que pueden, por ejemplo, incluir diversas secuencias no codificantes flanqueantes tanto de las porciones 5' como 3' de la región de codificación.

Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas para uso en la presente invención comprenden una cantidad eficaz de un péptido disuelto o dispersado en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las frases "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" se refieren a composiciones que generalmente no producen una reacción adversa, alérgica u otra indeseada cuando se administra a un sujeto, por ejemplo, a un ser humano, según sea apropiado. La preparación de tales composiciones farmacéuticas es conocida por los expertos en la técnica a la luz de la presente descripción, como se ejemplifica por Remington Pharmaceutical Sciences, 18a Ed. Mack Printing Company, 1990. Además, para fines de administración en seres humanos se entenderá que las preparaciones deben cumplir con esterilidad, pirogénesis, seguridad general y pureza como se requiere, por ejemplo, en la Oficina de Normas Biológicas de la FDA.

Por otra parte, como se usa en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye materiales tales como disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardantes de la absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizadores de fármacos, geles, aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, colorantes, tales como materiales y combinaciones de los mismos, como es conocido para cualquier experto ordinario en la técnica a la vista de la presente descripción. Excepto en el caso de que algún portador convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

Los compuestos farmacéuticos para uso en la presente invención pueden comprender diferentes tipos de vehículos dependiendo de si se va a administrar en forma sólida, líquida o en aerosol y si necesita ser estéril para tales vías de administración como la inyección. La presente invención se puede administrar por vía intravenosa, intradérmica, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intrapleural, intratraqueal, intranasal, por vía intravítrea, intravaginal, intrarrectal, intratumoral, intramuscular, subcutánea, subconjuntival, intravascularmente, por vía mucosa, intrapericárdica, intraumbilical, intraocular, vía oral, tópica, local, por inhalación (por ejemplo, aerosol). Además, la presente invención se puede administrar mediante inyección, infusión, infusión continua, baño de perfusión directamente a células diana, a través de un catéter, a través de un lavado, o por otro método o cualquier combinación de los anteriores como será conocido por cualquier experto ordinario en la técnica.

La cantidad de dosificación efectiva de una composición de la presente invención administrada a un sujeto puede ser determinada por factores físicos y fisiológicos tales como el peso corporal, la gravedad de la condición, el tipo de enfermedad a tratar, las intervenciones terapéuticas previas o simultáneas, la idiopatía del paciente y de la vía de administración. El médico responsable de la administración, en cualquier caso, determina la concentración del ingrediente o de los ingredientes activos en una composición adecuada y la dosis o las dosis para el sujeto individual.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, al menos el compuesto activo a aproximadamente 0,1%. En otras realizaciones, el compuesto activo puede comprender entre aproximadamente 2% y aproximadamente 75% del peso de la unidad, o entre aproximadamente 25% y aproximadamente 60%, por ejemplo, y cualquier intervalo derivable en el mismo. En otros ejemplos no limitativos, una dosis también puede comprender de aproximadamente 1 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 5

microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 10 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 50 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 100 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 200 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 350 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 500 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 1 miligramo/kg de peso corporal, aproximadamente 5 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 10 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 100 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 200 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 350 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 500 miligramos/kg de peso corporal, hasta aproximadamente 1.000 mg/kg de peso corporal o más por administración, y cualquier intervalo derivable en el mismo. En los ejemplos no limitativos de un intervalo derivable de los números que aparecen en el presente documento, un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, aproximadamente de 5 microgramos/kg/peso corporal a aproximadamente 500 miligramos/kg de peso corporal, etc., se puede administrar, en base a los números descritos anteriormente.

En cualquier caso, la composición puede comprender diversos antioxidantes para retardar la oxidación de uno o más componentes. Además, la prevención de la acción de los microorganismos puede ser provocada por conservantes tales como varios agentes antibacterianos y antifúngicos, incluyendo, pero no limitados a los parabenos (por ejemplo, metilparabenos, propilparabenos), clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal o combinaciones de los mismos.

Los productos farmacéuticos se pueden formular en una composición en una forma de base libre, neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido, por ejemplo, las formadas con los grupos amino libres de una composición de péptido, o las que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, oxálico, tartárico o mandélico. También se pueden derivar de bases inorgánicas las sales formadas con los grupos carboxilo libres tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico; o bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína.

En realizaciones en las que la composición está en una forma líquida, el vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que comprenda, pero no limitado a, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, etc.), lípidos (por ejemplo, triglicéridos, aceites vegetales, liposomas) y combinaciones de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un revestimiento, tal como lecitina; por el mantenimiento del tamaño de partículas requerido por dispersión en vehículos tales como, por ejemplo, poliol líquido o lípidos; por el uso de tensioactivos tales como, por ejemplo, hidroxipropilcelulosa; o combinaciones de tales métodos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, tales como, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio o combinaciones de los mismos.

En ciertas realizaciones, las composiciones se preparan para su administración por vías tales como la ingestión oral. En estas realizaciones, la composición sólida puede comprender, por ejemplo, soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas (por ejemplo, cápsulas de gelatina cubiertas duras o blandas), formulaciones de liberación sostenida, composiciones bucales, trociscos, elixires, suspensiones, jarabes, obleas o combinaciones de los mismos. Las composiciones orales se pueden incorporar directamente con el alimento de la dieta. Los vehículos preferidos para la administración oral comprenden diluyentes inertes, vehículos comestibles asimilables o combinaciones de los mismos. En otros aspectos de la invención, la composición oral se puede preparar como un jarabe o un elixir. Un jarabe o elixir, y pueden comprender, por ejemplo, al menos un agente activo, un agente edulcorante, un conservante, un agente aromatizante, un colorante, un conservante o combinaciones de los mismos.

En ciertas realizaciones preferidas, la composición oral puede comprender uno o más aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes aromatizantes y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, la composición puede comprender uno o más de los siguientes: un aglutinante, tal como, por ejemplo, goma de tragacanto, acacia, almidón de maíz, gelatina o combinaciones de los mismos; un excipiente, tal como, por ejemplo, fosfato dicálcico, manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio o combinaciones de los mismos; un agente disgregante, tal como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico o sus combinaciones; un lubricante, tal como, por ejemplo, estearato de magnesio; un agente edulcorante, tal como, por ejemplo, sacarosa, lactosa, sacarina o combinaciones de los mismos; un agente aromatizante, tal como, por ejemplo menta, aceite de gaulteria, aroma de cereza, aroma de naranja, etc.; o combinaciones de los mismos de los anteriores. Cuando la forma unitaria de dosificación es una cápsula, puede contener, además de materiales del tipo anterior, vehículos tales como un vehículo líquido. Varios otros materiales pueden estar presentes como revestimientos o para modificar la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos, las píldoras o las cápsulas pueden revestirse con goma laca, azúcar o ambos.

Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando los compuestos activos de la invención en la cantidad requerida en el disolvente apropiado, opcionalmente, con diversos de los otros ingredientes enumerados anteriormente, cuando se requiera, seguido de la esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y/o los otros ingredientes. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, suspensiones o emulsiones, los métodos preferidos de preparación son las técnicas de secado

al vacío o liofilización que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de un medio líquido previamente filtrado para la esterilización del mismo. El medio líquido debe estar adecuadamente tamponado si es necesario y el diluyente líquido primero debe hacerse isotónico antes de la inyección con suficiente solución salina o glucosa. También se contempla la preparación de composiciones altamente concentradas para la inyección directa, en la que se prevé el uso de DMSO como disolvente para dar como resultado una penetración extremadamente rápida, entregando altas concentraciones de los agentes activos a una pequeña área.

Preferiblemente, la composición para uso en la invención es estable bajo condiciones estándar de fabricación y almacenamiento y se conserva contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Se apreciará que la contaminación de endotoxina debería mantenerse mínimamente a un nivel seguro, por ejemplo, menos que 0,5 ng/mg de proteína.

En realizaciones particulares, la absorción prolongada de una composición inyectable para uso en la invención puede ser provocada por las composiciones para uso en la invención que comprenden agentes que retrasan la absorción, tales como, por ejemplo, monoestearato de aluminio, gelatina o combinaciones de los mismos.

15 Ejemplos

Ejemplo 1: Modelo de rata de lesión del nervio cavernoso

El modelo de rata de lesión del nervio cavernoso normalmente utiliza la siguiente metodología. Las ratas se anestesian con isoflurano. Los animales se colocan en una almohadilla caliente para mantener la temperatura corporal a 37°C. El abdomen se afeita y se frota con una solución antiséptica de Clinidin (povidona yodada). Se hace una abertura abdominal en la línea media inferior de la cavidad peritoneal, mostrando ambos nervios cavernosos y ganglio pélvico mayor (GPP). La lesión del nervio cavernoso es inducida por aplastamiento del nervio cavernoso con una pinza hemostática durante dos minutos por cada lado. En los estudios relacionados con la neuregulina, dos grupos de neuregulina fueron tratados 48 horas antes de la lesión.

El modelo de rata por aplastamiento proporciona una disminución simple, reproducible y extremadamente fiable de la función eréctil. Esta técnica se utiliza ampliamente y varios estudios han sido publicados usando esta técnica. No hay necesidad de probar la función eréctil después de la lesión por aplastamiento; la disminución de la función eréctil es predecible y, por lo general, se llevan a cabo pruebas funcionales en aproximadamente 5 semanas después de producir la lesión por aplastamiento.

Después de la lesión en el nervio cavernoso, la cavidad abdominal se cierra en dos capas con re aproximación de los músculos abdominales y la fascia (sutura absorbible) a través de 2-3 suturas interrumpidas. La piel se cierra con una sutura continua subcuticular (enterrada) para la piel con un material de sutura transpirable (PDS o vicrilo revestido). Se les da de forma preventiva el analgésico Buprenorfina (10 minutos antes de poner fin al procedimiento) y cada 6-12 horas después de la operación durante 48 horas para controlar el dolor.

A las 5 semanas después de la operación, las ratas se anestesian con ketamina (100 mg/kg IP) y xilazina (5 mg/kg). La crura cavernosa se expone a través de la misma incisión y se llevan a cabo estudios funcionales utilizando una aguja 23G insertada en la crura izquierda y se conecta a un programa de software diseñado específicamente para medir presiones intracavernosas. Antes de la medición, los nervios cavernosos se estimulan con un electrodo a 1,5 mA. La duración del procedimiento de medición es de aproximadamente 15 minutos. Las ratas se sacrifican con eutanil-intercardiaco antes de la recuperación anestésica y los tejidos (nervios cavernosos, GPP, pene, próstata) se recuperan para realizar la microscopía por luz y las evaluaciones moleculares e histológicas.

Tal como se presenta en las presiones intracavernosa (PIC), datos mostrados en la figura 1, la electroestimulación de los nervios cavernosos 5 semanas después de la lesión mostró una conservación significativa de la función nerviosa y de los órganos diana a través de ambos grupos tratados con neuregulina y esto fue aún más significativo a dosis más altas. Los datos se analizaron por primera vez por medidas ANOVA no repetidas con la prueba t de Bonferroni y el significado fue considerado a $p < 0,05$. Todos los resultados se expresan como la media \pm SEM. Los cambios también se mejoraron significativamente cuando se normalizaron con las presiones aórticas como se muestra en la figura 2.

Desde un punto de vista histológico, los datos indican que el tratamiento con NRG aumentaba el número de fibras nerviosas intactas basado en el marcaje transportado retrógradamente del fluoro-oro en el GPP y mejoraba la conservación de la óxido nítrico sintasa neuronal y el VAcHt de los tejidos nerviosos y del músculo liso del pene. Esto indica que son mecanismos de acción neuroprotectores y/o neuroregeneradores. La apoptosis del músculo liso también disminuyó en comparación con los animales con lesión por aplastamiento que no recibieron ninguna neuregulina.

Ejemplo 2: Métodos de histología de Fluoro-Oro

Para llevar a cabo este protocolo, se llevó a cabo la inyección intracorporal de fluoro-oro al 4%, y en una semana, se recogieron los tejidos de los ganglios pélvicos principales (GPP) y se fijaron en paraformaldehído al 4%, tampón

fosfato 0,1 M, se fijaron durante la noche y luego se colocaron en 20% de sacarosa. El crioseccionamiento fue de 20 μ m de espesor. Las imágenes fueron tomadas usando un sistema de visualización y una cámara Infinity, seguido del análisis ciego de los recuentos de las células mejoradas con fluoro-oro. Después de esto, se seleccionaron al azar portaobjetos de muestras de GPP (10 por animal) y se llevaron a cabo recuentos de células para determinar el número de neuronas intactas. (Véase, por ejemplo, Dail, WG, Trujillo, D., de la Rosa, D. y Walton, G.: "Autonomic innervation of reproductive organs: analysis of the neurons whose axons project in the main penile nerve in the pelvic plexus of the rat". Anat Rec, 224: 94, 1989; Laurikainen A, Hiltunen J O, S Vanhatalo, Klinge E, Saarma M: "Glial cell line-derived neurotrophic factor is expressed in penis of adult rat and retrogradely transported in penile parasympathetic and sensory nerves" (Cell Tissue Res 2000, 302: 321-9).

Por lo tanto, se trataba de un protocolo de rastreo retrógrado utilizando fluoro-oro. Los resultados de este protocolo presentaron información que indicaba que el tratamiento con neuregulina ayudaba a la regeneración y a la re-proyección de su objetivo (los cuerpos cavernosos del pene) y/o a la neuroprotección de los nervios cavernosos.

Por consiguiente, se inyectó fluoro-oro en un órgano diana; en este caso, los cuerpos cavernosos del pene. A partir de entonces, se produjo la absorción de los terminales nerviosos del órgano final. Esta captación indica que las fibras nerviosas fueron conservadas y/o se convirtieron en el área inyectada. Una vez que hay absorción de fluoro-oro, el fluoro-oro se transporta de una manera retrógrada al axón del nervio y el marcador acumulado a las neuronas originales del GPP (ganglio pélvico principal).

La figura 3 muestra el marcaje de fluoro-oro representativo de los ganglios pélvicos principales (GPP) a partir de 3 animales por grupo de tratamiento ((grupo A) normal (grupo B) por aplastamiento, (grupo C) por aplastamiento + GGF2). Los animales normales (grupo A) muestran la cantidad de marcado retrógrado observada en ausencia de lesión del nervio. Los animales por aplastamiento (grupo B) muestran una drástica reducción en las fibras nerviosas intactas de la lesión, ya que el marcador de fluoro-oro no es capaz de transportar todo el camino de vuelta al GPP. Los animales por aplastamiento + GGF2 (grupo C) muestran un mayor número de células GPP marcadas con fluoro-oro, lo que indica que hay más fibras nerviosas conservadas presentes después de una lesión como resultado del tratamiento con GGF2.

La figura 4 proporciona una cuantificación de marcaje con fluoro-oro en el GPP. Los animales normales tienen un gran número de cuerpos celulares marcados en el GPP. Después de una lesión por aplastamiento, el número de células marcadas se reduce drásticamente, como consecuencia de los daños de las fibras nerviosas y la incapacidad resultante de transportar retrógradamente el marcador de nuevo al GPP. El tratamiento con GGF2 mejoró el número de fibras nerviosas intactas disponibles para transportar el fluoro-oro del tejido del pene al GPP de una manera retrógrada, lo que resultaba en un mayor número de células marcadas.

Ejemplo 3: Inmunohistoquímica

Se tiñeron criosecciones longitudinales de la parte proximal de los cuerpos para nNOS, VACHT. Todos los lavados se realizaron con tampón Tris que contenía 1% de Triton-X. Se bloquearon los tejidos 1 h con 5% de suero de cabra normal y después se incubaron durante la noche a 4°C con, respectivamente:

- a) nNOS (Sigma; 1/1000) o
- b) VACHT (Abcam; 1/150) o
- c) TH (Millipore; 1/5000).

Después de varios lavados, las secciones se incubaron durante 1 h en HRP de cabra anti-conejo y anti-cabra de burro (1/1000) y luego en una solución de DAB que contenía 0,2% de sulfato de amonio y níquel y peróxido de hidrógeno al 0,03% durante 10 min. Después del último lavado, las secciones fueron deshidratadas, despejadas en xileno y tapadas con cubreobjetos en Permount (Fisher Scientific).

Tinción con nNOS:

El óxido nítrico (NO) liberado de las placas terminales axonales de los nervios cavernosos dentro de los cuerpos cavernosos, junto con el NO endotelial, provoca la relajación del músculo liso, iniciando cambios hemodinámicos de la erección del pene, así como contribuyendo a una tumescencia mantenida. Se entiende actualmente que el retorno a la potencia después de la lesión a los nervios cavernosos es dependiente, al menos en parte, de la regeneración axonal en los tejidos neurales restantes y de si es exitosa la re-inervación funcional del órgano objetivo (permitiendo la activación neuronal por NO). Son observados cambios patobiológicos bien definidos en estudios con modelos animales de pene después de un compromiso del nervio cavernoso. Estos cambios patobiológicos pueden variar desde neuropraxia al daño axonal letal y pueden incluir la apoptosis del músculo liso, la apoptosis del endotelio, la reducción de la densidad de los nervios de la óxido nítrico sintasa (NOS), la sobre-regulación de las citoquinas fibroproliferativas tales como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), la fibrosis del músculo liso o pérdida, o respuestas de señalización patobiológicas tales como la alteración de la proteína Sonic hedgehog.

Además, una ausencia crónica de la erección siguiente a una neuropraxia nerviosa cavernosa durante la fase de

recuperación prolongada se cree que acentúa el potencial de un mayor deterioro estructural del músculo liso cavernoso debido a un fallo de la ciclación cavernosa normal entre los estados flácido y erecto (Bella AJ, Lin G, Fandel TM, Hickling DR, Morash C, Lue T F., "Nerve growth factor modulation of the cavernous nerve response to injury". *J Sex Med* 6 Suppl 3: 347-352, 2009).

5 El nNOS cavernoso es un marcador bien establecido de la conservación del nervio cavernoso. (Véase, por ejemplo, <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1464-410X.2010.09364.x/full>) Los resultados de este protocolo indicaron un efecto neuroregenerativo y/o neuroprotector después de la lesión del nervio cavernoso bilateral en rata producida de acuerdo con el protocolo del Ejemplo 1.

10 Los resultados de la densidad de tinción (secciones corporales proximales representativas, 5 portaobjetos seleccionados al azar, observador ciego, basado en 5 animales por grupo) indicaron la conservación de la tinción con nNOS para sujetos tratados con neuregulina.

15 La figura 5 proporciona una tinción representativa de los niveles de nNOS. La densidad de tinción indica la presencia de nNOS. Los resultados de este trabajo incluyen la tinción de tejidos normales (grupo A). En comparación, hay una pérdida significativa de la tinción de nNOS después de la lesión por aplastamiento del nervio cavernoso (grupo B). La tinción con nNOS conservada de las terminaciones nerviosas cavernosas del pene en el corpus muestra tasas mayores de supervivencia y/o la regeneración de los nervios cavernosos después de la lesión por aplastamiento con el tratamiento de GGF2 (grupo C). La densidad de la tinción indica la conservación de la tinción de nNOS con el tratamiento de GGF2.

Tinción vesicular del transportador de acetilcolina (VAcHT):

20 Las neuronas del ganglio pélvico que inervan el pene expresan marcadores nNOS y colinérgicos, mientras que la inervación simpática noradrenérgica del pene surge en gran medida a través de la cadena simpática y no atraviesa los nervios del pene o el ganglio pélvico. Los resultados de este protocolo proporcionaron información que indicaba que el tratamiento con neuregulina ayudaba a la regeneración y re-proyección en su diana (los cuerpos cavernosos del pene) y/o la neuroprotección de los nervios cavernosos en base a la tinción intracorporal para el transportador vesicular de acetilcolina (VAcHT). Aunque la etiología de la disfunción eréctil primaria posquirúrgica es neurogénica, los estudios en roedores han revelado que también ocurren cambios morfológicos y funcionales dentro del tejido cavernoso del pene después de una lesión nerviosa. (Véase, por ejemplo, Keast J R. "Plasticity of pelvic autonomic ganglia and urogenital innervation". *Int Rev Cytol* 2006; 248: 141-208; Andersson K E, P Hedlund, Alm P. "Sympathetic pathways and adrenergic innervation of the penis". *Int J Impot Res* 2000; 12: 55-12; Mulhall J M, Bella A J, Briganti A, McCullough A, G. Brock, *Erectile Function Rehabilitation in the Radical Prostatectomy Patient*, *J Sex Med* 7 (4), 1687-1698, 2010).

Los resultados de la densidad de tinción (secciones corporales proximales representativas, 5 diapositivas seleccionadas al azar, observador ciego, basado en 5 animales por grupo) indicaron la conservación de la tinción de VAcHT en ratas que recibieron el GGF2.

35 La figura 7 proporciona la tinción inmunohistoquímica representante del transportador vesicular de acetilcolina (VAcHT). La densidad de tinción indica la presencia de VAcHT. Los resultados incluyen la tinción de los tejidos normales (grupo A) y una pérdida significativa de la tinción VAcHT después de la lesión por aplastamiento del nervio cavernoso (grupo B). Por el contrario, la tinción con VAcHT conservada de las terminaciones nerviosas cavernosas en los cuerpos cavernosos del pene mostrada en el grupo C mostró un aumento de las tasas de supervivencia y/o de la regeneración de los nervios cavernosos después de una lesión por aplastamiento tratados con el tratamiento GGF2 (grupo C). La densidad de tinción indica la conservación de la tinción VAcHT con el tratamiento de GGF2.

Tinción con TH:

45 El TH es un marcador de las fibras nerviosas adrenérgicas y se usa para apoyar la conservación de los nervios en el corpus. La porción proximal del corpus fue crio-seccionada longitudinalmente y se tiñeron con anticuerpos primarios dirigidos contra el marcador de la síntesis de catecolaminas, la tirosina hidroxilasa ("Impaired Cavernous Reinnervation after Penile Nerve Injury in Rats with Features of the Metabolic Syndrome", Matthew R. Nangle, BSc, PhD, Joseph Proietto, MBBS, PhD, y Janet R. Keast, BSc, PhD *J Sex Med* 2009; 6: 3.032 a 3.044).

50 Los resultados de la densidad de tinción indican la presencia de TH. Los resultados de la densidad de tinción de hecho logrados (secciones corporales proximales representativas, 5 portaobjetos seleccionadas al azar, observador ciego, basado en 5 animales por grupo) indican la conservación de la tinción de TH en animales tratados con GGF2. La Figura 6 proporciona la tinción representativa de los niveles de tirosina hidroxilasa (TH). Los resultados incluyen la tinción de tejidos normales (grupo A) y una pérdida significativa de la tinción de TH después de la lesión por aplastamiento del nervio cavernoso (grupo B). El grupo C muestra una tinción de TH conservada de las terminaciones nerviosas cavernosas del pene en el corpus que mejor corresponde a un aumento general en la conservación de la inervación del pene después de una lesión por aplastamiento con el tratamiento de GGF2 (grupo C). La densidad de tinción muestra tendencias hacia la conservación de la tinción con TH con el tratamiento de GGF2.

5 La figura 6 proporciona una tinción representativa de los niveles de tirosina hidroxilasa (TH). Los resultados incluyen la tinción de tejidos normales (grupo A) y una pérdida significativa de la tinción de TH después de la lesión por aplastamiento del nervio cavernoso (grupo B). El panel C muestra la tinción de TH conservada de las terminaciones nerviosas cavernosas del pene en el corpus mejor corresponde a un aumento general en la conservación de la inervación del pene después de una lesión por aplastamiento con el tratamiento GGF2 (grupo C). La densidad de la tinción muestra tendencias hacia la conservación de la tinción con TH con el tratamiento de GGF2.

REIVINDICACIONES

1. Una neuregulina para uso en tratamiento de una lesión de los nervios cavernosos en un sujeto.
2. Uso de una neuregulina en la fabricación de un medicamento para tratar una lesión de los nervios cavernosos en un sujeto.
- 5 3. La neuregulina para uso de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en donde el sujeto tiene una lesión existente de los nervios cavernosos y en donde la neuregulina se administra al sujeto después de la lesión de los nervios cavernosos.
4. La neuregulina para uso o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la lesión de los nervios cavernosos es debida a un traumatismo o a un procedimiento médico.
- 10 5. La neuregulina para uso o el uso de la reivindicación 4, en donde el traumatismo es una lesión por aplastamiento.
6. La neuregulina para uso o el uso de la reivindicación 4, endonde el traumatismo es debido a un procedimiento quirúrgico.
7. La neuregulina para uso o el uso de la reivindicación 6, en donde el procedimiento quirúrgico es una cirugía pélvica radical.
- 15 8. La neuregulina para uso o el uso de la reivindicación 7, en donde la cirugía pélvica radical es para cáncer de próstata, cáncer de vejiga o cáncer de recto.
9. La neuregulina para uso o el uso de la reivindicación 6, en donde el procedimiento quirúrgico es una cirugía de resección de tumor.
- 20 10. La neuregulina para uso o el uso de la reivindicación 9, en donde la cirugía de resección de tumor es una prostatectomía.
11. La neuregulina para uso o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la lesión de los nervios cavernosos causa disfunción eréctil en el sujeto.
12. La neuregulina para uso de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en donde la neuregulina se administra a una dosis de 100 microgramos/kg de peso corporal a 10 miligramos/kg de peso corporal por administración.
- 25 13. La neuregulina para uso de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en donde la neuregulina se administra a una dosis de 500 miligramos/kg de peso corporal a 5 miligramos/kg de peso corporal por administración.
14. La neuregulina para uso de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en donde la neuregulina se administra a una dosis de 500 mg/kg de peso corporal a 1 miligramo/kg de peso corporal por administración.
- 30 15. La neuregulina para uso de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en donde la neuregulina es GGF2 o un fragmento que comprende un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico (tipo FCE) del mismo.
16. La neuregulina para uso de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en donde la neuregulina comprende un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico (tipo FCE).
- 35 17. La neuregulina para uso de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en donde la neuregulina se administra a una dosis de 50 microgramos/kg de peso corporal a 500 microgramos/kg de peso corporal por administración.
18. La neuregulina para uso de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en donde la neuregulina se administra a una dosis de 350 microgramos/kg de peso corporal a 500 microgramos/kg de peso corporal por administración.
- 40 19. La neuregulina para uso de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en donde la neuregulina se administra a una dosis de 50 microgramos/kg de peso corporal a 1000 microgramos/kg de peso corporal por administración.

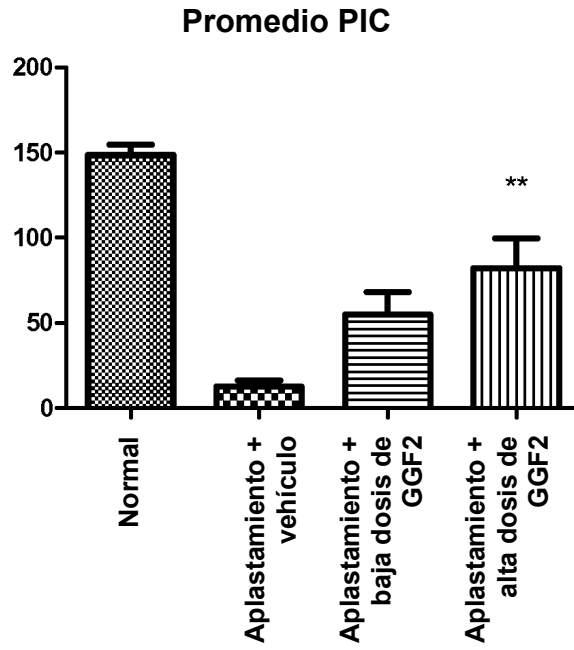


FIG. 1

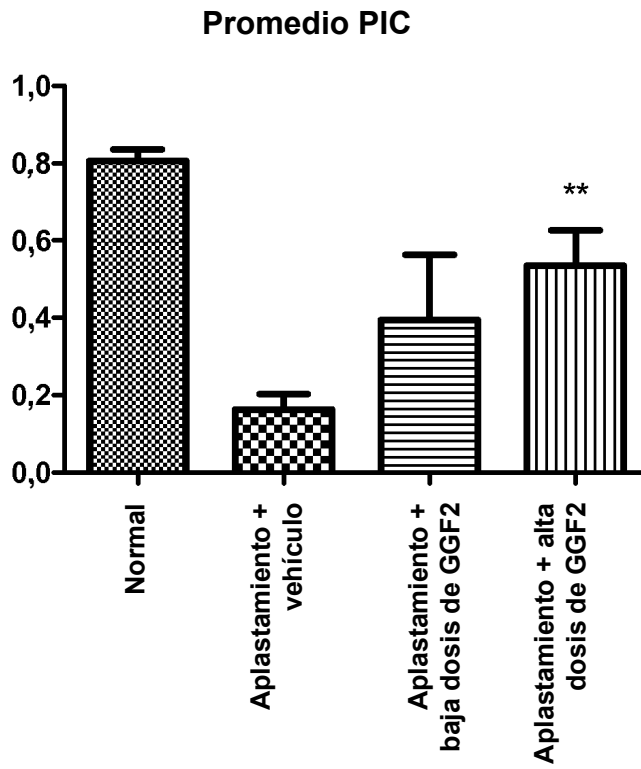


FIG. 2

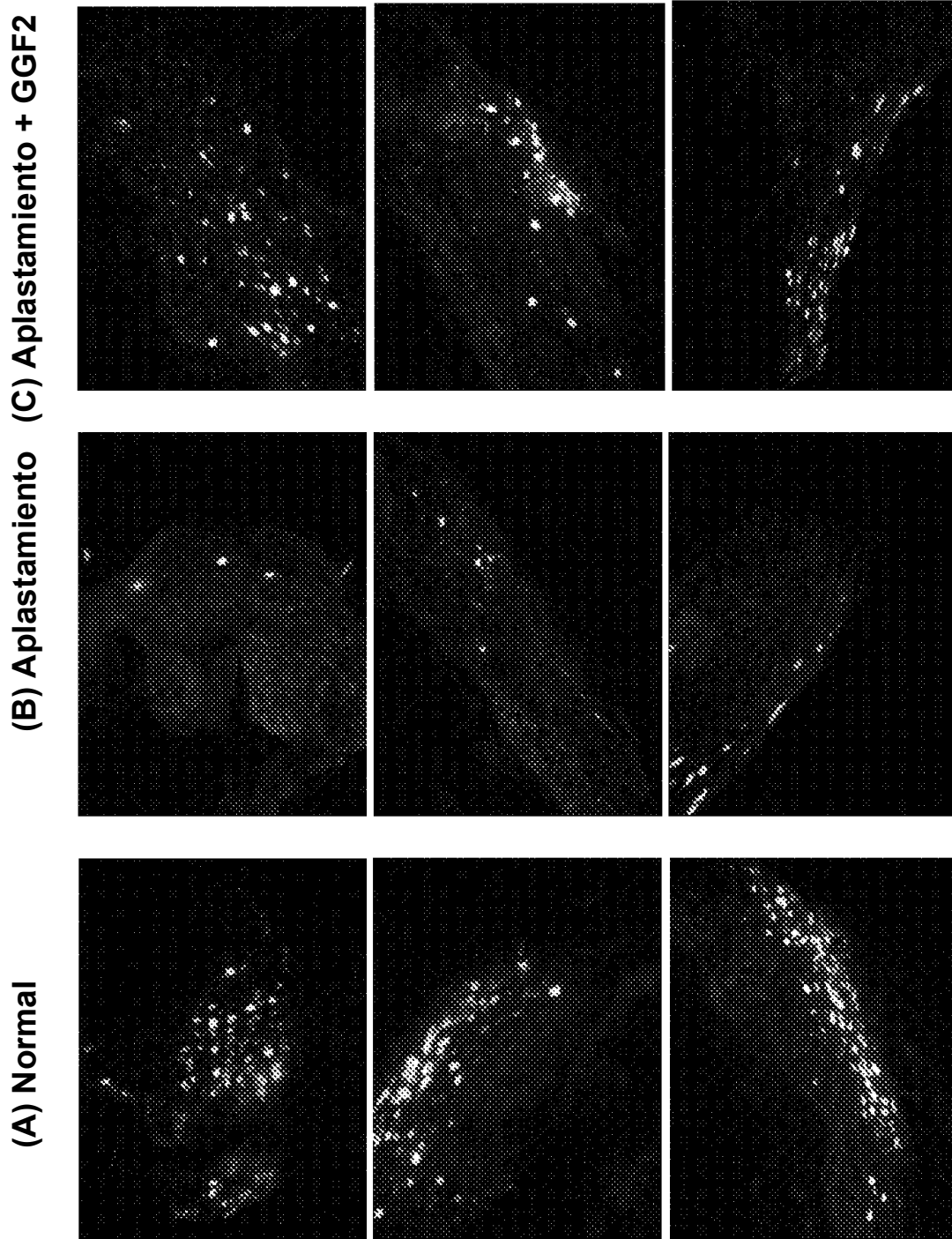


FIG. 3

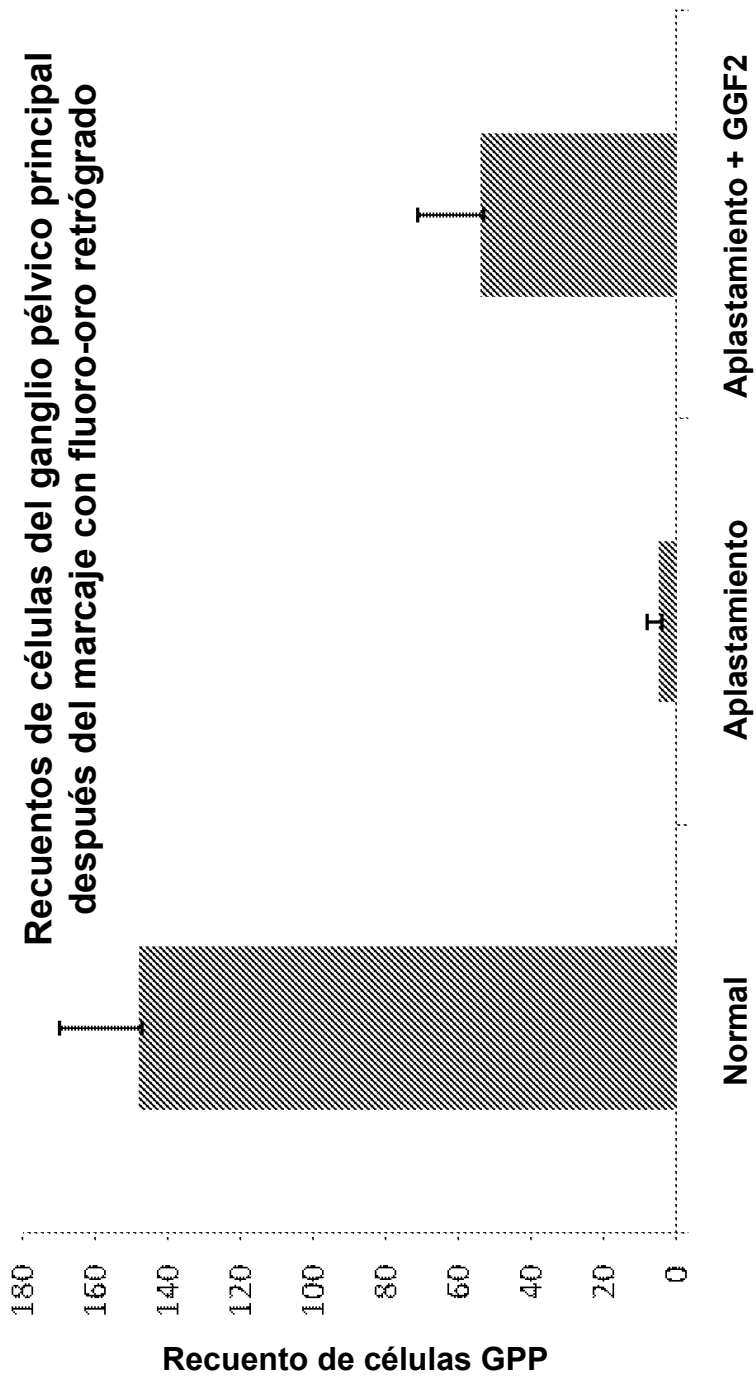


FIG. 4

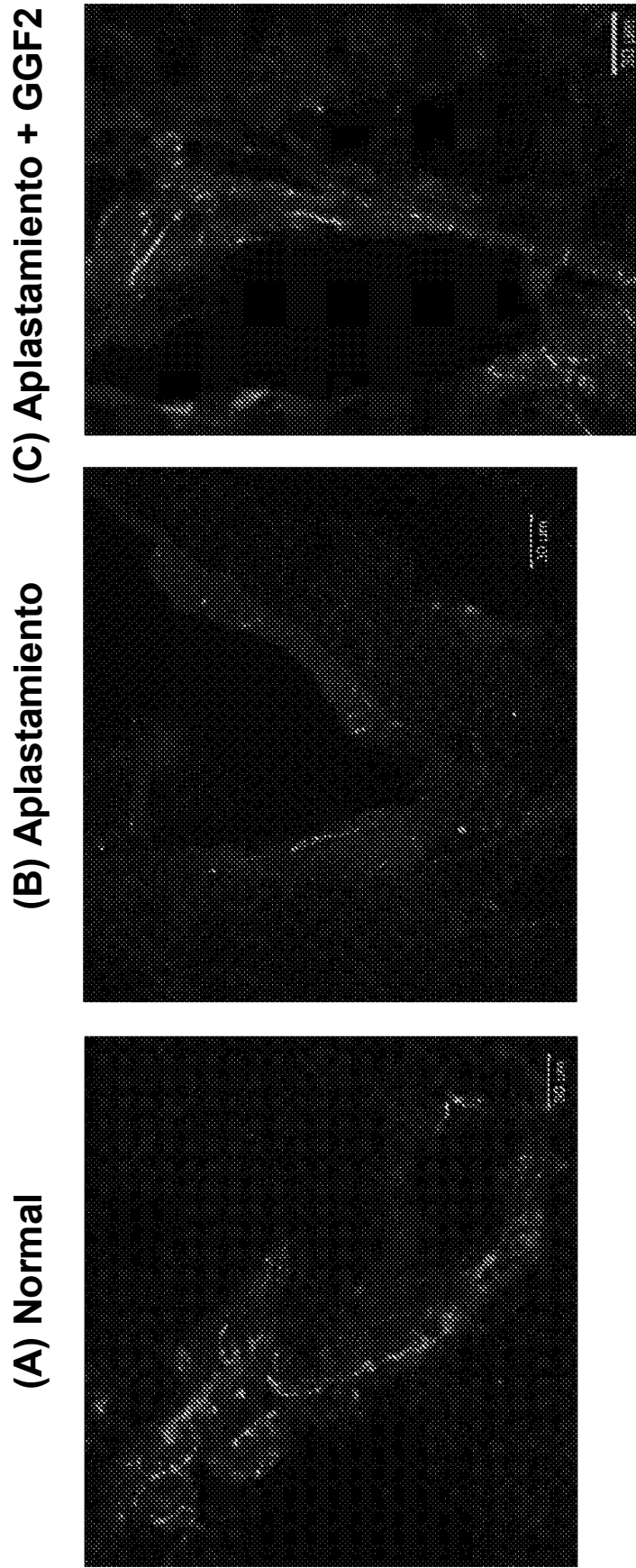


FIG. 5

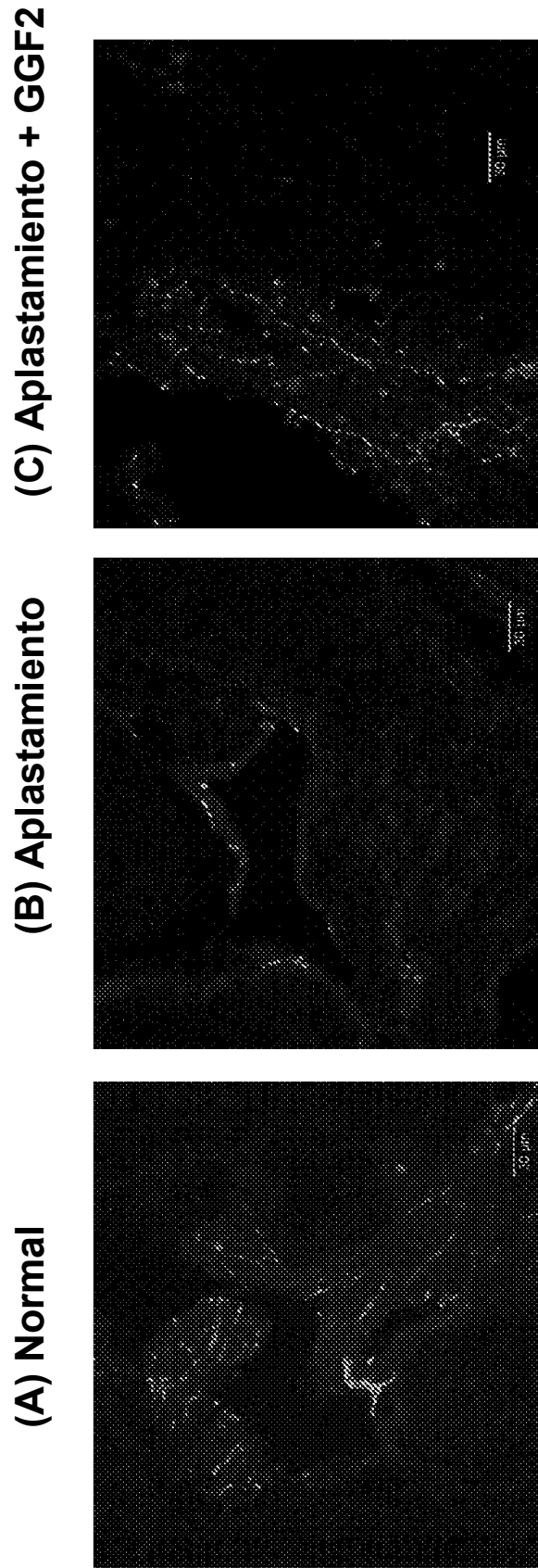


FIG. 6

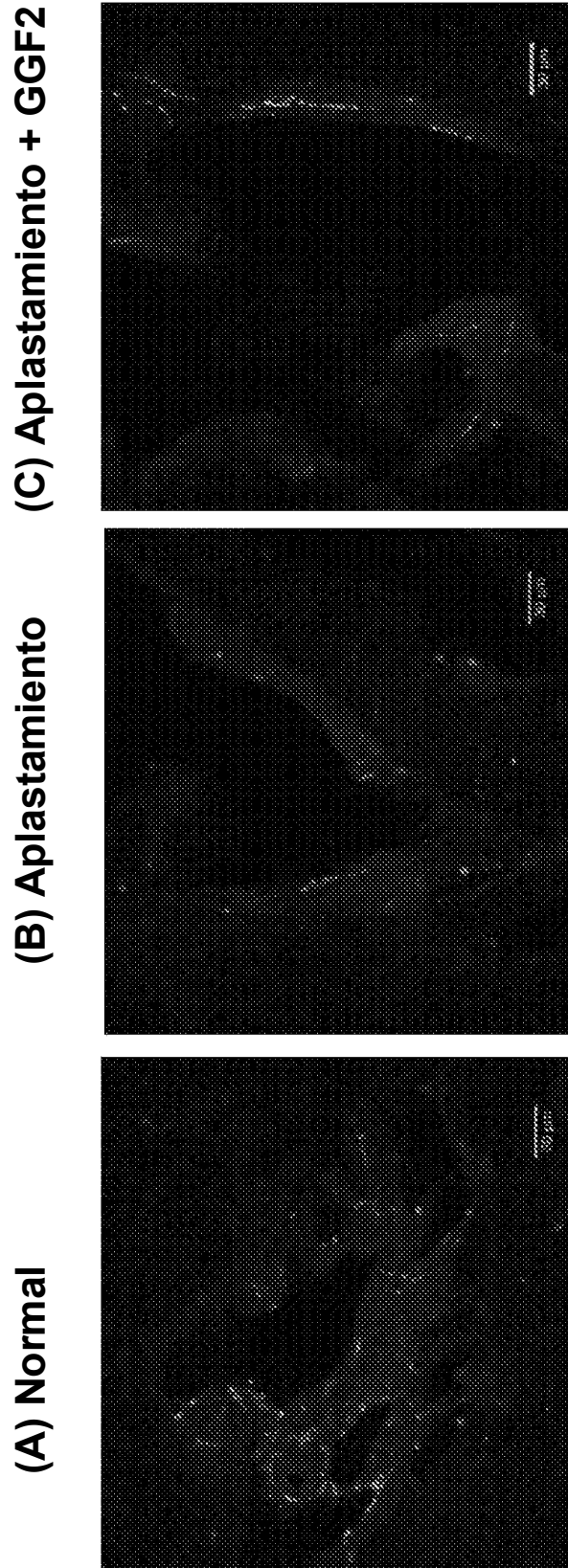


FIG. 7