

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 917**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 25/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.03.2013 PCT/US2013/034634**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.10.2013 WO13149163**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2013 E 13716919 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 2830645**

54 Título: **Neuregulina para uso en el tratamiento de una lesión de nervio periférico**

30 Prioridad:

30.03.2012 US 201261618381 P

20.07.2012 US 201261674060 P

27.08.2012 US 201261693589 P

27.08.2012 US 201261693585 P

14.03.2013 US 201361785419 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.12.2017

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.;

GANGULY, ANINDITA;

IACI, JENNIFER;

PARRY, THOMAS y

COLBURN, RAYMOND, WARREN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 647 917 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

Neuregulina para uso en el tratamiento de una lesión de nervio periférico

Campo de la divulgación

5 Esta invención se refiere generalmente a los campos de la biología molecular, medicina regenerativa, y trauma o daño nervioso. Los métodos de la divulgación se emplean para administrar isoformas de neuregulina o segmentos funcionales de la misma para prevenir, tratar, o mejorar síntomas del daño del nervio periférico. Los sujetos de estos métodos o bien tienen un daño del nervio periférico o bien corren el riesgo de tener un daño del nervio periférico.

Antecedentes

10 Los nervios periféricos se dañan normalmente a partir de un trauma, que incluyen los accidentes de automóvil, accidentes de moto, cirugías, heridas por cuchillo y proyectil, y lesiones durante el parto tanto en la madre como en el hijo. Tras la lesión de nervio existe una pérdida de la sensación y/o función en las regiones del cuerpo inervadas por el nervio dañado. Causas quirúrgicas comunes del daño nervioso incluyen la prostatectomía y la mastectomía. Por ejemplo, tras el daño nervioso a partir de la prostatectomía existe normalmente una disfunción eréctil.

15 Existe una necesidad de terapias y tratamientos adicionales para los daños del nervio periférico. Por otra parte, existe una gran necesidad en la técnica de una terapia que pueda tanto prevenir y/o limitar la extensión de la disfunción tras un daño nervioso.

Compendio

20 Las neuregulinas se han implicado debido a sus efectos neuroprotectores y neuro-restauradores en una gran variedad de modelos animales de enfermedades y lesiones del sistema nervioso central. En la presente memoria se divulgan métodos para tratar o mejorar el daño del nervio periférico mediante la administración de una neuregulina o un segmento funcional de la misma a un sujeto que tiene un daño del nervio periférico o corre el riesgo de tener un daño del nervio periférico. Además se describen métodos para tratar o mejorar el daño del nervio periférico mediante la administración a un sujeto de GGF2 o un segmento funcional del mismo.

25 La presente divulgación demuestra que el tratamiento del daño del nervio periférico con neuregulina puede atenuar la pérdida de la función nerviosa periférica, mejorar o atenuar la pérdida de la función nerviosa periférica cuando se administra bien antes o bien después del daño del nervio, y en algunos casos restaura la función nerviosa periférica.

30 Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición que comprende una cantidad eficaz de una neuregulina para uso en un método para disminuir el dolor neuropático en un sujeto que corre el riesgo de tener una lesión de nervio periférico debido a un procedimiento quirúrgico. También se proporciona una composición que comprende una cantidad eficaz de una neuregulina para emplear en un método para disminuir el dolor neuropático en un sujeto que tiene una lesión nerviosa periférica existente debido a un procedimiento quirúrgico. El término sujeto incluye a mamíferos, y en particular a sujetos humanos.

35 El daño nervioso periférico (PNI, de sus siglas en inglés) en humanos se puede adquirir a través de un trauma físico o puede ser el resultado de una enfermedad. Por ejemplo, los nervios periféricos se dañan a partir de un trauma que incluye a los accidentes de automóvil, accidentes de moto, cirugías, heridas por cuchillo o proyectil, y daños en el parto tanto en la madre como en el hijo. Las complicaciones siguientes pueden conducir a déficits en la función sensoriomotora y en la desregulación autonómica.

Aunque se contemplan todos los nervios periféricos, los métodos descritos se pueden aplicar a los siguientes ejemplos no limitantes de los nervios periféricos, incluyendo los nervios ciático y cavernoso.

40 El daño del nervio ciático da como resultado una pérdida de la masa muscular, debilidad del músculo, cambios en el músculo atrofico diana, parestia, y dolor, a menudo reduciendo la capacidad para la rehabilitación e impactando en la calidad de vida. Por ejemplo, con respecto al daño del nervio ciático, las composiciones de la divulgación incrementan la masa muscular, mejoran la fuerza muscular, reducen la atrofia muscular, y reducen el dolor neuropático y mejoran la recuperación sensorial. Los resultados a partir de imágenes ultrasónicas tri-dimensionales (3D) han demostrado reducciones significativas en ambos volúmenes del músculo gastrocnemio y sóleo tras el aplastamiento y transección de los miembros posteriores a lo largo del tiempo en comparación con animales de simulación. La administración de GGF2, por ejemplo, incrementa el tamaño de las miofibras y reduce la fibrosis en un tejido alrededor del nervio periférico. Por otra parte, la administración de GGF2, incrementa por ejemplo el tamaño de las miofibras y reduce la fibrosis en el músculo esquelético.

50 Una lesión de nervio periférico puede ser resultado de una cirugía, tal como una prostatectomía. En el contexto de cualquier intervención esencialmente quirúrgica, el daño nervioso periférico puede ser el resultado directo de una disección de tejido, resección de tejido y/o secundario a una colocación del miembro y/o compresión.

El modelo de disfunción eréctil de rata se emplea como un sistema in vivo para demostrar la eficacia de las neuregulinas en el tratamiento del daño del nervio periférico. La neuregulina puede ser eficaz como monoterapia

5 para cualquier daño nervioso periférico y no requiere del co-tratamiento con conductos nerviosos artificiales o el co-tratamiento con terapias celulares tales como las células Schwann. El péptido 1 de neuregulina (GGF2) se ensayó en un modelo de aplastamiento bilateral en rata, que es un modelo aceptado de daño en el nervio cavernoso. Este modelo se ha usado para ensayar el sildenafil y otros fármacos ED. Como se muestra en los ejemplos proporcionados, GGF2 mejoró los efectos funcionales cuando se electroestimuló los nervios durante 5 semanas tras una lesión, y se midió la presión intercarvenosa (ICP).

La lesión de nervio cavernoso aparece frecuentemente como el resultado de la resección del cáncer de próstata; este daño puede causar disfunción eréctil (ED).

Una neuregulina preferida es NRG-1 y una isoforma preferida es GGF2.

10 En una realización de la invención, el sujeto corre el riesgo de tener una lesión de nervio periférico debido a un procedimiento quirúrgico. Ejemplos de procedimientos quirúrgicos incluyen, pero no se limitan a, disección tisular o cirugía de resección de un tumor. Alternativamente, o en adición, ejemplos de procedimientos quirúrgicos incluyen, pero no se limitan a, una cirugía pélvica, abdominal, o colorrectal. En un aspecto de esta realización, un tejido o tumor diseccionado o eliminado durante la cirugía puede ser maligno o benigno. El tejido o tumores malignos puede ser uno o más tipos de cáncer. Ejemplos de tipos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, cánceres sólidos, cáncer de próstata, y cáncer de mama. En un aspecto de esta realización, tipos de ejemplos de la lesión de nervio periférico incluyen, pero no se limitan a, una transección nerviosa, un aplastamiento de un nervio, y una desmielinización nerviosa. En un aspecto de esta realización, el nervio periférico puede ser un nervio ciático. Alternativamente, o en adición, el nervio periférico puede ser un nervio cavernoso. En un aspecto de esta realización, la lesión de nervio periférico puede dar como resultado una disfunción eréctil.

25 En una realización de la presente invención, el sujeto corre el riesgo de tener una lesión de nervio periférico debido al parto de un bebé que implica un procedimiento quirúrgico. Ejemplos de procedimientos quirúrgicos incluyen, pero no se limitan a, realizar una escisión en el sujeto y realizar una operación cesárea. En un aspecto de esta realización, ejemplos de los tipos de lesión de nervio periférico incluyen, pero no se limitan a, una transección nerviosa, un aplastamiento de un nervio, y una desmielinización nerviosa. En un aspecto de esta realización, el nervio periférico puede ser un nervio ciático. Alternativamente, o en adición, el nervio periférico puede ser un nervio cavernoso.

30 En la presente memoria se divulga una composición que comprende una cantidad eficaz de una neuregulina para uso en un método para prevenir o tratar una lesión de nervio periférico en un sujeto que tiene una lesión de nervio periférica existente. El nervio periférico puede ser un nervio ciático. Alternativamente, o en adición, el nervio periférico puede ser un nervio cavernoso. La lesión de nervio periférico puede dar como resultado una disfunción eréctil. En un aspecto preferido, la neuregulina es GGF2.

35 En una realización de la presente invención, el sujeto tiene una lesión de nervio periférico existente debido a un procedimiento quirúrgico. Ejemplos de procedimientos quirúrgicos incluyen, pero no se limitan a, disección tisular o cirugía de resección de un tumor. Alternativamente, o en adición, ejemplos de procedimientos quirúrgicos incluyen, pero no se limitan a, una cirugía pélvica, abdominal, o colorrectal. En un aspecto de esta realización, un tejido o tumor diseccionado o eliminado durante la cirugía puede ser maligno o benigno. El tejido o tumores malignos puede ser uno o más tipos de cáncer. Ejemplos de tipos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, cánceres sólidos, cáncer de próstata, y cáncer de mama. En un aspecto de esta realización, tipos de ejemplos de la lesión de nervio periférico incluyen, pero no se limitan a, una transección nerviosa, un aplastamiento de un nervio, y una desmielinización nerviosa. En un aspecto de esta realización, el nervio periférico puede ser un nervio ciático. Alternativamente, o en adición, el nervio periférico puede ser un nervio cavernoso. En un aspecto de esta realización, la lesión de nervio periférico puede dar como resultado una disfunción eréctil.

45 La lesión de nervio periférico puede deberse al parto de un bebé que implica un procedimiento quirúrgico. Ejemplos de procedimientos quirúrgicos incluyen, pero no se limitan a, realizar una escisión en el sujeto y realizar una operación cesárea. En un aspecto de esta realización, ejemplos de los tipos de lesión de nervio periférico incluyen, pero no se limitan a, una transección nerviosa, un aplastamiento de un nervio, y una desmielinización nerviosa. En un aspecto de esta realización, el nervio periférico puede ser un nervio ciático. Alternativamente, o en adición, el nervio periférico puede ser un nervio cavernoso.

50 En una realización de la invención, la composición que comprende una neuregulina es adecuada para la administración antes de que aparezca la lesión de nervio periférico. En un aspecto de esta realización, se puede administrar una composición que comprende una neuregulina antes pero no después de que aparezca la lesión de nervio periférico. Una composición que comprende una neuregulina se puede administrar según un régimen de dosificación discontinuo. Preferiblemente, el régimen de dosificación discontinuo comprende administrar la composición en intervalos determinados. Ejemplos de intervalos determinados pueden incluir, pero no se limitan a, la administración en intervalos de cada 24 horas, cada 48 horas, y cada 72 horas. Alternativamente, intervalos determinados pueden incluir, pero no se limitan a, la administración en intervalos de al menos cada 24 horas, al menos cada 48 horas, y al menos cada 72 horas. En un aspecto de esta realización, el régimen de dosificación discontinuo se puede continuar durante un periodo de tiempo seleccionado del grupo que consiste en

aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas, y aproximadamente 12 semanas. En un aspecto de esta realización, el intervalo determinado de administración puede ser de al menos una vez por semana. En un aspecto de esta realización, el intervalo determinado de administración puede ser de al menos una vez por semana y el régimen de dosificación discontinuo puede continuar durante un periodo de tiempo seleccionado del grupo que consiste en aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, y aproximadamente 3 meses.

En una realización de la invención, la composición que comprende una neuregulina es adecuada para la administración en el transcurso de que aparezca la lesión de nervio periférico. En un aspecto de esta realización, una composición que comprende una neuregulina se puede administrar en el transcurso de, pero no después de la lesión de nervio periférico. Una composición que comprende una neuregulina se puede administrar según un régimen de dosificación discontinuo. Preferiblemente, el régimen de dosificación discontinuo comprende administrar la composición en intervalos determinados. Ejemplos de intervalos determinados pueden incluir, pero no se limitan a, la administración en intervalos de cada 24 horas, cada 48 horas, y cada 72 horas. Alternativamente, los intervalos determinados pueden incluir, pero no se limitan a, la administración en intervalos de al menos cada 24 horas, al menos cada 48 horas, y al menos cada 72 horas. En un aspecto de esta realización, el régimen de dosificación discontinuo se puede continuar durante un periodo de tiempo que se selecciona del grupo que consiste en aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas, y aproximadamente 12 semanas. En un aspecto de esta realización, el intervalo determinado de administración puede ser de al menos una vez por semana. En un aspecto de esta realización, el intervalo determinado de administración puede ser de al menos una vez por semana y el régimen de dosificación discontinuo puede continuar durante un periodo de tiempo que se selecciona del grupo que consiste en aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, y aproximadamente 3 meses.

En una realización de la invención, la composición que comprende una neuregulina es adecuada para la administración antes y en el transcurso de que aparezca la lesión de nervio periférico. En un aspecto de esta realización, se puede administrar una composición que comprende una neuregulina antes y en el transcurso de la lesión de nervio periférico. Se puede administrar una composición que comprende neuregulina según un régimen de dosificación discontinuo. Preferiblemente, el régimen de dosificación discontinuo comprende administrar la composición en intervalos determinados. Ejemplos de intervalos determinados pueden incluir, pero no se limitan a, la administración en intervalos de cada 24 horas, cada 48 horas, y cada 72 horas. Alternativamente, intervalos determinados pueden incluir, pero no se limitan a, la administración en intervalos de al menos cada 24 horas, al menos cada 48 horas, y al menos cada 72 horas. En un aspecto de esta realización, el régimen de dosificación discontinuo se puede continuar durante un periodo de tiempo que se selecciona del grupo que consiste en aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas, y aproximadamente 12 semanas. En un aspecto de esta realización, el intervalo determinado de administración puede ser de al menos una vez por semana. En un aspecto de esta realización, el intervalo determinado de administración puede ser de al menos una vez por semana y el régimen de dosificación discontinuo se puede continuar durante un periodo de tiempo que se selecciona del grupo que consiste en aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, y aproximadamente 3 meses.

En una realización de la invención, la composición que comprende una neuregulina es adecuada para la administración antes de, en el transcurso de, y después de que aparezca la lesión de nervio periférico. Una composición que comprende neuregulina se puede administrar según un régimen de dosificación discontinuo. Preferiblemente, el régimen de dosificación discontinuo comprende administrar la composición en intervalos determinados. Ejemplos de intervalos determinados pueden incluir, pero no se limitan a, la administración en intervalos de cada 24 horas, cada 48 horas, y cada 72 horas. Alternativamente, los intervalos determinados pueden incluir, pero no se limitan a, la administración en intervalos de al menos cada 24 horas, al menos cada 48 horas, y al menos cada 72 horas. En un aspecto de esta realización, el régimen de dosificación discontinuo se puede continuar durante un periodo de tiempo que se selecciona del grupo que consiste en aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas, y aproximadamente 12 semanas. En un aspecto de esta realización, el intervalo determinado de administración puede ser de al menos una vez por semana. En un aspecto de esta realización, el intervalo determinado de administración puede ser de al menos una vez por semana y el régimen de dosificación discontinuo puede continuar durante un periodo de tiempo que se selecciona del grupo que consiste en aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, y aproximadamente 3 meses.

En una realización de la invención, la composición que comprende una neuregulina es adecuada para la administración después de que aparezca la lesión de nervio periférico. Una composición que comprende una

- neuregulina se puede administrar según un régimen de dosificación discontinuo. Preferiblemente, el régimen de dosificación discontinuo comprende administrar la composición en intervalos determinados. Ejemplos de intervalos determinados pueden incluir, pero no se limitan a, la administración en intervalos de cada 24 horas, cada 48 horas, y cada 72 horas. Alternativamente, los intervalos determinados pueden incluir, pero no se limitan a, la administración en intervalos de al menos cada 24 horas, al menos cada 48 horas, y al menos cada 72 horas. En un aspecto de esta realización, el régimen de dosificación discontinuo se puede continuar durante un periodo de tiempo que se selecciona del grupo que consiste en aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas, y aproximadamente 12 semanas. En un aspecto de esta realización, el intervalo determinado de administración puede ser de al menos una vez por semana. En un aspecto de esta realización, el intervalo determinado de administración puede ser de al menos una vez por semana y el régimen de dosificación discontinuo puede continuar durante un periodo de tiempo que se selecciona del grupo que consiste en aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, y aproximadamente 3 meses.
- En una realización de la invención, una cantidad eficaz de una neuregulina o una composición que comprende una neuregulina puede ser de entre aproximadamente 0,001 mg/kg del peso corporal a aproximadamente 5 mg/kg del peso corporal. En un aspecto de esta realización, una cantidad eficaz de una neuregulina o una composición que comprende una neuregulina puede ser de entre aproximadamente 0,001 mg/kg del peso corporal a aproximadamente 2,5 mg/kg del peso corporal. En un aspecto de esta realización, una cantidad eficaz de una neuregulina o una composición que comprende una neuregulina puede ser de entre aproximadamente 0,001 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 0,3 mg/kg del peso corporal. En un aspecto de esta realización, una cantidad eficaz de una neuregulina o una composición que comprende una neuregulina puede ser de entre aproximadamente 0,001 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 0,7 mg/kg del peso corporal. En un aspecto de esta realización, una cantidad eficaz de una neuregulina o una composición que comprende una neuregulina puede ser de entre aproximadamente 0,001 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 0,5 mg/kg del peso corporal. En un aspecto de esta realización, una cantidad eficaz de una neuregulina o una composición que comprende una neuregulina puede ser de entre aproximadamente 0,001 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 0,3 mg/kg del peso corporal. En un aspecto de esta realización, una cantidad eficaz de una neuregulina o una composición que comprende una neuregulina puede ser de entre aproximadamente 0,001 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 0,1 mg/kg del peso corporal. En un aspecto de esta realización, una cantidad eficaz de una neuregulina o una composición que comprende una neuregulina puede ser de entre aproximadamente 0,001 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 0,05 mg/kg del peso corporal. En un aspecto de esta realización, una cantidad eficaz de una neuregulina o una composición que comprende una neuregulina puede ser de entre aproximadamente 0,001 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 0,02 mg/kg del peso corporal.
- La cantidad de dosis real de una composición de la presente invención que se administra a un sujeto se puede determinar mediante factores físicos y fisiológicos, tales como el peso corporal, gravedad de la afección, el tipo de enfermedad que se está tratando, intervenciones terapéuticas previas o concurrentes, paciente idiopático y en la vía de administración. El médico responsable durante la administración determinará, en cualquier caso, la concentración del ingrediente o ingredientes activos en una composición y la dosis o dosis adecuadas para el sujeto individual.
- Determinados aspectos de los métodos descritos incluyen la administración de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 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 de polipéptido o péptido de neuregulina en base a la actividad de la neuregulina usada en particular, vía de administración, método de administración y contexto médico. Determinados aspectos incluyen la administración de neuregulina antes y/o después de la lesión. Una neuregulina se puede administrar 12, 24, 48, ó 72 horas antes de la lesión, durante la lesión y/o en intervalos determinados o regulares tras la lesión. En determinadas circunstancias, se puede administrar una neuregulina 24 ó 48 horas antes de la lesión, y una vez al día (*por ejemplo*, 24 horas) o cada semana tras la lesión. La administración antes de la lesión puede ser sistémica y/o local. La administración durante la lesión puede ser sistémica y/o local. La administración después de la lesión puede ser sistémica y/o local.
- Determinados aspectos de los métodos descritos incluyen la administración de aproximadamente 0,005, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, ó 15 μ g o mg, o cualquier valor intermedio, de polipéptido o péptido de neuregulina en base a la actividad de la neuregulina que se use, vía de administración, método de administración y el contexto médico. Por ejemplo, una neuregulina o isoforma NRG-1, que incluye, pero no se limita a, GGF2, se administra a 0,5, 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5, ó 15 μ g/kg o mg/kg. Se puede emplear cualquier vía de administración adecuada, que incluye, pero no se limita a, la administración parenteral, subcutánea, intramuscular, perineural, intracraneal, intraorbital, oftálmica, intraventricular, intracapsular, intraespinal, intracisternal, intraperitoneal, intranasal, aerosol, oral, o transdérmica o tópica (*por ejemplo*, mediante la aplicación de un dispositivo o un parche adhesivo que transporta una formulación capaz de atravesar la dermis y entrar en el torrente sanguíneo).
- En un aspecto de la divulgación, los niveles de dosis de GGF2 oscilan de aproximadamente 0,001 mg/kg a 1,5 mg/kg, de aproximadamente 0,001 mg/kg a 2,5 mg/kg, de aproximadamente 0,001 mg/kg a 5,0 mg/kg, de aproximadamente 0,001 mg/kg a 10 mg/kg, o de aproximadamente 0,001 mg/kg a 15 mg/kg. En una realización

particular, los niveles de dosis de GGF2 oscilan de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 0,02 mg/kg, de aproximadamente 0,02 mg/kg a 0,06 mg/kg, de aproximadamente 0,06 mg/kg a aproximadamente 0,1 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 0,3 mg/kg, de aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 0,5 mg/kg, de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 0,7 mg/kg, de aproximadamente 0,7 mg/kg a aproximadamente 1,0 mg/kg, de aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 1,5 mg/kg, de aproximadamente 1,5 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg, de aproximadamente 2 mg/kg a aproximadamente 2,5 mg/kg, de aproximadamente 2,5 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, de aproximadamente 3 mg/kg a aproximadamente 3,5 mg/kg, de aproximadamente 3,5 mg/kg a aproximadamente 4 mg/kg, de aproximadamente 4 mg/kg a aproximadamente 4,5 mg/kg, de aproximadamente 4,5 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 1,5 mg/kg, o de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 5,0 mg/kg. En otra realización particular, los niveles de las dosis de GGF2 oscilan de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg.

En un aspecto de la divulgación, los niveles de dosis de GGF2 oscilan de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 1,5 mg/kg, de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 2,5 mg/kg, de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 5,0 mg/kg, de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, o de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg, administrado aproximadamente cada 24 horas (o una vez al día), al menos cada 24 horas, cada 48 horas, al menos cada 48 horas, al menos una vez cada dos días, cada 72 horas, al menos cada 72 horas, durante aproximadamente 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 9 semanas, 10 semanas, 11 semanas, o 12 semanas. En otra realización GGF2 se administra al menos una vez a la semana durante 1 mes, 2 meses, o 3 meses. En una realización particular, los niveles de las dosis de GGF2 oscilan de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 0,02 mg/kg, de aproximadamente 0,02 mg/kg a aproximadamente 0,06 mg/kg, de aproximadamente 0,06 mg/kg a aproximadamente 0,1 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 0,3 mg/kg, de aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 0,5 mg/kg, de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 0,7 mg/kg, de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 1,0 mg/kg, de aproximadamente 0,7 mg/kg a aproximadamente 1,0 mg/kg, de aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 1,5 mg/kg, de aproximadamente 1,5 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg, de aproximadamente 2 mg/kg a aproximadamente 2,5 mg/kg, de aproximadamente 2,5 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, de aproximadamente 3 mg/kg a aproximadamente 3,5 mg/kg, de aproximadamente 3,5 mg/kg a aproximadamente 4 mg/kg, de aproximadamente 4 mg/kg a aproximadamente 4,5 mg/kg, de aproximadamente 4,5 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 1,5 mg/kg, o de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 5,0 mg/kg administrado aproximadamente cada 24 horas (o una vez al día), al menos cada 24 horas, cada 48 horas, al menos cada 48 horas, al menos una vez cada dos días, cada 72 horas, al menos cada 72 horas, durante aproximadamente 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 9 semanas, 10 semanas, 11 semanas, o 12 semanas. En otra realización GGF2 se administra al menos una vez a la semana durante 1 mes, 2 meses, o 3 meses. En otra realización particular, los niveles de las dosis de GGF2 oscilan de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg administrado aproximadamente cada 24 horas (o una vez al día), al menos cada 24 horas, cada 48 horas, al menos cada 48 horas, al menos una vez cada dos días, cada 72 horas, al menos cada 72 horas, durante aproximadamente 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 9 semanas, 10 semanas, 11 semanas, o 12 semanas. En otra realización GGF2 se administra al menos una vez a la semana durante 1 mes, 2 meses, o 3 meses.

En otro aspecto de la divulgación, una neuregulina o isoforma NRG-1 se puede administrar a un sujeto en una dosificación que oscila entre 5 mg/kg a 15 mg/kg, incluidos los puntos finales, de forma sistémica o local. Por ejemplo, cuando un polipéptido o péptido de NRG-1, que incluye, pero no se limita a, GGF2, se administra en una dosis que oscila entre 5 mg/kg a 15 mg/kg, incluidos los puntos finales, la vía de administración preferida puede ser intravenosa, subcutánea, transdérmica, o tópica.

Una neuregulina se puede administrar antes de la lesión, durante la lesión, y/o a intervalos determinados o regulares tras la lesión. En un ejemplo no limitante, una neuregulina se puede administrar aproximadamente cada 24 horas (o una vez al día), al menos cada 24 horas, cada 48 horas, al menos cada 48 horas, al menos cada dos días, cada 72 horas, al menos cada 72 horas, durante aproximadamente 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 9 semanas, 10 semanas, 11 semanas, o 12 semanas antes de la lesión. En otra realización GGF2 se administra al menos una vez a la semana durante 1 mes, 2 meses, o 3 meses antes de la lesión. Alternativamente, o en adición, una neuregulina se puede administrar una vez cada 24 horas o cada semana tras la lesión. La administración antes de la lesión puede ser sistémica y/o local. La administración durante la lesión puede ser sistémica y/o local. La administración después de la lesión puede ser sistémica y/o local. Algunas de las dosis de una neuregulina (*por ejemplo*, una dosis que oscila entre 5 mg/kg a 15 mg/kg, incluidos los puntos finales) se puede administrar mediante un método no-sistémico o local, que incluye, pero no se limita a, una inyección o implante subcutáneo o método de reparto transdérmico.

Un método de reparto "local" "localizado", o "diana" proporciona una neuregulina eficaz terapéuticamente en el sitio de la lesión para mejorar la recuperación o función del nervio periférico sin incrementar sustancialmente los niveles sanguíneos de neuregulina o sin penetrar sustancialmente la barrera hematoencefálica, incrementando de esta manera los niveles de la neuregulina dentro del líquido cefalorraquídeo del sistema nervioso central.

Una neuregulina de las composiciones y métodos divulgados puede ser una neuregulina de cualquier extensión completa codificada por genes NRG 1, 2, 3 ó 4. En otro aspecto una neuregulina puede ser cualquier segmento funcional de un polipéptido de neuregulina. El segmento funcional de una neuregulina puede contener un dominio similar a EGF. Una neuregulina puede ser cualquier péptido codificado por los genes NRG 1, 2, 3 ó 4 que se une y activa a los receptores ErbB. Alternativamente, una neuregulina puede ser cualquier péptido modificado a partir de un péptido de tipo salvaje codificado por genes NRG 1, 2, 3, ó 4, tal que el péptido modificado se une y activa a los receptores ErbB.

Las neuregulinas y los polipéptidos que contienen dominios de neuregulinas similares a EGF se pueden administrar a sujetos con un diluyente, transportador, o excipiente aceptable farmacéuticamente, en forma de dosificación unitaria. Se puede emplear la práctica farmacéutica convencional para proporcionar formulaciones o composiciones adecuadas para administrar tales composiciones a pacientes o animales de experimentación.

Aunque la vía de administración intravenosa se puede preferir en determinadas circunstancias, se puede emplear cualquier vía de administración adecuada, que incluye, pero no se limita a, la administración parenteral, subcutánea, intramuscular, intracraneal, intraorbital, oftálmica, intraventricular, intracapsular, intraespinal, intracisternal, intraperitoneal, intranasal, aerosol, oral, o transdérmica o tópica (por ejemplo, mediante la aplicación de un dispositivo o un parche adhesivo que transporta una formulación capaz de atravesar la dermis y entrar en el torrente sanguíneo). Las formulaciones terapéuticas pueden estar en forma de disoluciones o suspensiones líquidas; para administración oral, las formulaciones pueden estar en forma de comprimidos o cápsulas; y para formulaciones intranasales, en la forma de polvos, gotas nasales, o aerosoles.

Por “neuregulina-1”, “NRG-1”, “heregulina” se refiere a un polipéptido que se une a los receptores ErbB 1, 3 ó 4; y mediante emparejamiento con el receptor (dimerización) también a ErbB2. En una realización la neuregulina se codifica mediante el gen ligando p185erbB2 descrito en las Patentes U.S. N^{os} 5.530.109; 5.716.930; y 7.037.888, cada una de las cuales se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad. En una realización la neuregulina es GGF2 o cualquier subsecuencia de la misma, o cualquier molécula que comprende toda o una parte activa de la secuencia de GGF2.

En determinadas realizaciones de las composiciones y métodos descritos, las composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,1% del compuesto activo. En otras realizaciones, un compuesto activo puede comprender entre aproximadamente 2% a aproximadamente 75% del peso corporal de la unidad, o entre aproximadamente 25% a aproximadamente 60%, por ejemplo, y cualquier intervalo derivable de ello. En otros ejemplos no limitantes, una dosis puede comprender también de aproximadamente 1 microgramo(μ g)/kg peso corporal, aproximadamente 5 μ g/kg peso corporal, aproximadamente 10 μ g/kg peso corporal, aproximadamente 50 μ g/kg peso corporal, aproximadamente 100 μ g/kg peso corporal, aproximadamente 200 μ g/kg peso corporal, aproximadamente 350 μ g/kg peso corporal, aproximadamente 500 μ g/kg peso corporal, aproximadamente 1 mg/kg peso corporal, aproximadamente 5 mg/kg peso corporal, aproximadamente 10 mg/kg peso corporal, aproximadamente 50 mg/kg peso corporal, aproximadamente 100 mg/kg peso corporal, aproximadamente 200 mg/kg peso corporal, aproximadamente 350 mg/kg peso corporal, aproximadamente 500 mg/kg peso corporal, a aproximadamente 1000 mg/kg peso corporal o más por administración, y cualquier intervalo derivable de ello. En ejemplos no limitantes de un intervalo derivable a partir de los números citados en la presente memoria, se puede administrar, un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg peso corporal, aproximadamente 5 μ g/kg peso corporal a aproximadamente 500 mg/kg peso corporal, etc, en base a los números descritos anteriormente.

El término “cantidad eficaz terapéuticamente” o una “cantidad eficaz” se debe entender como la cantidad de neuregulina que provoca una respuesta médica o biológica de un tejido, un sistema, animal o ser humano, que es requerida por un investigador, veterinario, médico u otro profesional clínico.

Un cambio terapéutico puede ser un cambio en una característica bioquímica o fisiológica medida en una dirección que alivia la enfermedad o afección que se está abordando, por ejemplo, la lesión de nervio periférico. Más en particular, una “cantidad eficaz” es una cantidad suficiente para disminuir los síntomas asociados con la afección o dolencia médica, para normalizar las funciones corporales en la enfermedad o los trastornos que dan como resultado un deterioro de funciones corporales específicas, o para proporcionar la mejora en uno o más de los parámetros medidos clínicamente de una enfermedad o afección. Una cantidad o dosis de una neuregulina eficaz terapéuticamente descrita en la presente memoria, puede ser una cantidad suficiente para restablecer una medición de la función equivalente al estado anterior a la lesión del sujeto o para un valor asociado con la función normal. Alternativamente, o en adición, una cantidad o dosis eficaz terapéuticamente de una neuregulina descrita en la presente memoria, puede ser una cantidad suficiente para preservar, restablecer, o inducir la supervivencia, conectividad, transducción de la señal, o función de un nervio ciático que está lesionado o corre el riesgo de estarlo. Una cantidad o dosis eficaz terapéuticamente de una neuregulina descrita en la presente memoria, puede ser una cantidad suficiente para preservar, restablecer, o inducir la supervivencia o función de una célula o células diana para la cual un nervio ciático está lesionado o corre el riesgo de tener señales, controles o inervaciones lesionadas.

El uso del término “o” en las reivindicaciones se emplea para referirse a “y/o” a menos que se indique de forma explícita para referirse a alternativas, sólo o cuándo las alternativas son mutuamente excluyentes. También se

contempla que cualquier cosa enumerada empleando el término “o” se pueda excluir también específicamente de las otras opciones que se están estableciendo.

5 A través de esta solicitud, el término “aproximadamente” se emplea para indicar que para determinar el valor para el método o dispositivo que se está empleando, el valor está dentro del 85%, 90%, 95% o de la desviación estándar del error.

Siguiendo la legislación tradicional de patentes, las palabras “un” y “uno”, en las reivindicaciones o en la memoria, indica uno o más, a menos que se especifique de otra manera.

10 En determinados aspectos de la divulgación, la neuregulina se usa de manera profiláctica previniendo o reduciendo de este modo una lesión potencial. Alternativamente, o en adición, la neuregulina se emplea pronósticamente para indicar el futuro estado del sujeto. Alternativamente, o en adición, la neuregulina se emplea diagnósticamente para indicar la presencia o presencia similar de una condición o estado. La neuregulina se puede emplear terapéuticamente para afectar a una afección de alguna manera que reduzca o elimine un síntoma o signo de la afección o enfermedad que se está tratando.

15 Las neuregulinas juegan un papel importante en el sistema nervioso periférico. Por ejemplo, las neuregulinas, específicamente el factor de crecimiento glial 2 (GGF2), influye en múltiples aspectos de la diferenciación de células Schwann, incluyendo los precursores de células Schwann supervivientes, proliferación de células Schwann, envoltura del axón, y desmielinización. Además, las neuregulinas también juegan un papel importante en la regulación de los receptores de acetilcolina en la unión neuromuscular. Las neuregulinas también influyen en la función celular de las células Schwann en los nervios periféricos, y tienen efectos metabólicos y miogénicos en el músculo esquelético. Como tal, el fin del estudio presentado en la presente memoria, fue evaluar los efectos del factor de crecimiento glial (GGF2) de la isoforma de neuregulina 1 sobre los cambios microscópicos en la función del músculo esquelético y del nervio ciático, y en la recuperación de los mismos tras la lesión por aplastamiento del nervio ciático.

25 Los datos presentados en la presente memoria demuestran que GGF2 beneficia la mielinización del nervio periférico, la función del músculo diana, y las funciones sensoriales del nervio tras la lesión de nervio periférico (por ejemplo, tras la lesión de nervio ciático). Específicamente, como se describe en la presente memoria, la evaluación histológica del músculo gastrocnemio demostró un incremento en la fibrosis en animales con aplastamiento en comparación con simulaciones en 2, 4, y 6 semanas tras la lesión; sin embargo, el tratamiento con GGF2 redujo significativamente la fibrosis causada por la lesión a niveles cercanos a los normales a las 6 semanas después de la lesión. Por otra parte, se observó una reducción significativa del área de las miofibras a las 2, 4, y 6 semanas después de la lesión; sin embargo, el tratamiento con GGF2 promovió un cambio en el área hacia un mayor tamaño (es decir, mayor que en los controles de simulación) a las 4 y 6 semanas después de la lesión. Tras la lesión, se observó una gran variedad de daños de gravedad variable en el nervio ciático comparado con animales de simulación; sin embargo, GGF2 redujo cualitativamente el grado de desmielinización en el nervio ciático lesionado comparado con los animales tratados con el vehículo. GGF2 mitigó los signos de hipersensibilidad mecánica y por frío tras la lesión por aplastamiento, al mismo tiempo que mejoraba las funciones mecánicas y por frío tras la desaferentación ciática por transección.

40 Otros objetivos, características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Se deberá entender, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones específicas de la invención, se proporcionan sólo a modo de ilustración, ya que a partir de esta descripción detallada serán evidentes por los expertos en la técnica los distintos cambios y modificaciones dentro de la intención y del alcance de la invención.

Breve descripción de los dibujos

45 Los siguientes dibujos forman parte de la presente divulgación y se incluyen para demostrar determinados aspectos no limitantes de la presente divulgación. La divulgación se puede entender mejor por referencia a uno de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en la presente memoria.

La Figura 1 es una ilustración esquemática de la lesión por aplastamiento del nervio ciático de 8-10 mm próxima a la trifurcación del nervio ciático.

50 La Figura 2 es una gráfica que representa el cambio de porcentaje en la fibrosis observada en el músculo gastrocnemio lateral en función del tiempo (2,4, ó 6 semanas) bajo condiciones de simulación de la lesión, tratamiento con el vehículo tras la lesión por aplastamiento, o tratamiento con GGF2 tras la lesión por aplastamiento.

55 La Figura 3 es una serie de fotomicrografías (Trichrome 100X) de secciones representativas de músculo a partir de animales de simulación [A], tratados con vehículo [B], y tratados con GGF2 [C] en 2 y 6 semanas después de la lesión.

Las Figuras 4A, 4B, y 4C son una serie de gráficas que representan el porcentaje de fibrosis observada en función

del tiempo (2, 4, ó 6 semanas, respectivamente) bajo condiciones de simulación de la lesión, tratamiento con el vehículo tras la lesión por aplastamiento, o tratamiento con GGF2 tras la lesión por aplastamiento.

5 La Figura 5 es un gráfica que muestra una valoración de la mielinización en la tinción de proteína de proteolípido (PLP) en 2, 4, y 6 semanas bajo condiciones de simulación de la lesión, tratamiento con el vehículo tras la lesión por aplastamiento, o tratamiento con GGF2 tras la lesión por aplastamiento.

10 La Figura 6 es una gráfica que representa el cambio de la presión intracavernosa media (ICP) a partir de una referencia en función de una condición experimental. “Baja dosis” de GGF2 = 0,5 mg/kg y “alta dosis” 0,54 GGF2 5 mg/kg (“alta dosis”). 32 machos de rata Sprague-Dawley de 3 meses de edad se dividieron en cuatro condiciones experimentales: Grupo 1- cirugía de simulación, Grupo 2- lesión por aplastamiento + sin GGF2, Grupo 3- aplastamiento + baja dosis de GGF2 (0,5 mg/kg), y Grupo 4- aplastamiento + alta dosis de GGF2 (5,0 mg/kg). El GGF2 se repartió 24 horas antes del aplastamiento, 24 horas después del aplastamiento y una vez cada 7 días (una vez a la semana) tras la cirugía hasta que se finalizó el estudio (5 semanas). La cirugía incluyó una incisión en la línea media baja para exponer la próstata, los nervios cavernosos, y el ganglio pélvico mayor (MPG) y 2 minutos de lesión por aplastamiento (portaagujas en un ángulo de 90 grados y presión de un click).

15 La Figura 7 es una gráfica que representa la ICP media normalizada para las Presiones Aórticas (MAP) en función de la condición experimental. Las razones ICP/MAP son 0,81 (normal), 0,15 (aplastamiento y sin tratamiento) frente a 0,4 de GGF2 0,5 mg/kg (“dosis baja”) y 0,54 de GGF2 5 mg/kg (“dosis alta”) (todos los valores $p < 0,05$). 32 machos de rata Sprague-Dawley de 3 meses de edad se dividieron en cuatro condiciones experimentales: Grupo 1- cirugía de simulación, Grupo 2- lesión por aplastamiento + sin GGF2, Grupo 3- aplastamiento + baja dosis de GGF2 (0,5 mg/kg), y Grupo 4- aplastamiento + alta dosis de GGF2 (5,0 mg/kg). El GGF2 se repartió 24 horas antes del aplastamiento, 24 horas después del aplastamiento y una vez cada 7 días (una vez a la semana) tras la cirugía hasta que se finalizó el estudio (5 semanas). La cirugía incluyó una incisión en la línea media baja para exponer la próstata, los nervios cavernosos y el ganglio pélvico mayor (MPG) y 2 minutos de lesión por aplastamiento (portaagujas en un ángulo de 90 grados y presión de un click).

25 La Figura 8A-C es una serie de fotografías que representan el marcaje con fluoro-oro del ganglio pélvico mayor (MPG) a partir de 3 animales por grupo de tratamiento ((panel A) normal, (panel B) aplastamiento, (panel C) aplastamiento + GGF2). El fluoro-oro inyectado en el tejido penil se transportó retrógradamente hacia atrás a través de los nervios intactos hacia los cuerpos celulares en el MPG. Panel A: Animales normales muestran la cantidad de marcaje retrógrado observado en ausencia de lesión en el nervio. Panel B: Animales con aplastamiento muestran la reducción drástica en fibras nerviosas intactas a partir de la lesión, el marcaje con fluoro-oro no es capaz de transportar para atrás hacia el MPG. Panel C: Aplastamiento + animales con GGF2 muestran un incremento del número de células en el MPG marcadas con fluoro-oro, indicando que hay presentes más fibras nerviosas preservadas después de la lesión como resultado del tratamiento con GGF2.

30 La Figura 9 es una gráfica que representa la cuantificación del marcaje con fluoro-oro en el MPG. Los resultados muestran que los animales normales tienen un gran número de cuerpos celulares marcados en el MPG. Tras la lesión por aplastamiento el número de células marcadas se redujo drásticamente, consecuente con la lesión de la fibra nerviosa y dando como resultado una incapacidad para transportar el marcaje retrógradamente para atrás hacia el MPG. Sin embargo, el tratamiento con GGF2 mejoró el número de fibras nerviosas intactas capaces de transportar el fluoro-oro desde el tejido penil hasta el MPG de una manera retrógrada, dando como resultado un gran número de células marcadas.

35 La Figura 10A-C es una serie de fotografías que representan la tinción representativa de los niveles de nNOS. Los nNOS es un marcador bien establecido de conservación del nervio cavernoso. Los resultados de este trabajo incluyeron tinción de tejido normal (panel A). Mediante comparación, hay una pérdida significativa de tinción de nNOS después de la lesión por aplastamiento del nervio cavernoso (panel B). La tinción nNOS conservada de las terminaciones del nervio cavernoso en el cuerpo del pene demostró un incremento en las tasas de supervivencia de los nervios cavernosos tras la lesión por aplastamiento con el tratamiento de GGF2 (panel C). La densidad de la tinción indica la conservación de la tinción de nNOS con el tratamiento de GGF2.

40 La Figura 11A-C es una serie de fotografías que representan tinciones representativas de niveles de tirosina hidroxilasa (TH). El panel A representa la tinción del tejido normal y en el panel B una pérdida significativa de la tinción TH después de la lesión por aplastamiento del nervio cavernoso. El panel C muestra la tinción TH conservada de las terminaciones del nervio cavernoso en el cuerpo del pene; estas terminaciones corresponden a una conservación o reestablecimiento general de la inervación del pene tras la lesión por aplastamiento producido por el tratamiento con GGF2. Por tanto, la densidad de la tinción indica conservación de la tinción TH con el tratamiento de GGF2.

55 La Figura 12A-C es una serie de fotografías que representa la tinción representativa del transportador de acetilcolina vesicular (VaChT). Los resultados muestran la tinción del tejido normal (panel A), y una pérdida significativa de la tinción VaChT después de la lesión por aplastamiento del nervio cavernoso (panel B). Por el contrario, la tinción VaChT de las terminaciones del nervio cavernoso en el cuerpo del pene que se muestran en el (panel C) demuestra un incremento en las tasas de supervivencia de los nervios cavernosos tras la lesión por aplastamiento con el

tratamiento de GGF2 (C). La densidad de la tinción muestra tendencias hacia la conservación de la tinción de VaChT con el tratamiento de GGF2.

La Figura 13 es una gráfica que representa el cambio en el peso corporal de los sujetos de estudio en función del número progresivo de dosis de GGF2 o de vehículo (véase el Ejemplo 6).

5 La Figura 14A es una gráfica que representa el cambio en la presión intracavernosa (ICP Máxima normalizada para la presión aórtica media (MAP)) a diferentes niveles de estimulación eléctrica del nervio cavernoso (véase el Ejemplo 6). La respuesta ICP era significativamente mayor en los Grupos C y D. Grupo A: simulación + vehículo. Grupo B: simulación + GGF2. Grupo C: BCI + GGF2 (5 mg/kg, sc). Grupo D: BCI+GGF2 (15 mg/kg, sc). Grupo E: BCI + vehículo.

10 La Figura 14B es una gráfica que representa el cambio en la presión intracavernosa (ICP área/MAP) a diferentes niveles de estimulación eléctrica del nervio cavernoso (véase el Ejemplo 6). La respuesta ICP era significativamente mayor en los Grupos C y D. Grupo A: simulación + vehículo. Grupo B: simulación + GGF2. Grupo C: BCI + GGF2 (5 mg/kg, sc). Grupo D: BCI + GGF2 (15 mg/kg, sc). Grupo E: BCI + vehículo.

15 La Figura 15 es una gráfica que representa el número medio de células de Schwann por nervio cavernoso en función del número de fibras sin mielinizar para el tratamiento de los grupos A, E, y C (véase el Ejemplo 6).

La Figura 16A-B es un par de gráficas que representan el transcurso de tiempo de los umbrales mecánicos (táctiles) de von Frey a lo largo de 6 semanas de estudio bajo condiciones de lesión por simulación, tratamiento con el vehículo del tratamiento de GGF2 tras la lesión por aplastamiento (panel A) o por lesión por transección (panel B).

20 La Figura 17A-B es un par de gráficas que representan el transcurso de tiempo de las respuestas de comportamiento al enfriamiento por evaporación de acetona a lo largo de 6 semanas de estudio bajo condiciones de lesión por simulación, tratamiento con el vehículo o del tratamiento de GGF2 tras la lesión por aplastamiento (panel A) o lesión por transección (panel B).

Descripción detallada

25 La lesión de los nervios periféricos es el resultado común de varios acontecimientos, compresión, contusión, transección, aplastamiento o estiramiento, causado, por ejemplo, por trauma, accidente o cirugía. Aunque los factores externos que conducen a la lesión de nervio son variables, las manifestaciones a nivel del nervio tienen características comunes (para consulta véase por ejemplo, Lee y Wolfe, J Am Acad Orthop Surg, 8 (4), p. 243,2008). Una lesión traumática de cualquier etiología causa a menudo daño en la mielinización, epineuro, perineuro, endoneuro y axones. En la forma más leve de los casos, la lesión es primaria a la mielina y el epineuro tras lo cual aparece la recuperación de forma espontánea dentro de varios días a semanas.

30 Muchas lesiones nerviosas dan como resultado la disrupción del endoneuro y de los axones, así como la disrupción de la función que o bien no se recupera completamente o que se recupera a lo largo de un periodo de tiempo prolongado.

35 Con respecto a la lesión de nervio periférico que implica daño en el axón, hay una degeneración local del axón que aparece dentro de las horas después de la lesión. A lo largo de unos pocos días, el cuerpo celular de la neurona proximal y el axón sufren un proceso que se conoce como degeneración Walleriana. Después de la degeneración del axón, las células de Schwann que producen mielina mueren dejando desechos e inflamación. Esta muerte de células de Schwann y la inflamación relacionada exacerba el daño nervioso.

40 A diferencia del sistema nervioso central, puede aparecer una cantidad significativa de regeneración en los nervios periféricos. Los axones crecen a lo largo de los canales del perineuro y re-inervan las dianas distales, y las células de Schwann remielinizan los axones. Aunque hay regeneración de los nervios periféricos, el proceso natural de regeneración mediado por el cuerpo no proporciona la regeneración completa, y muchas neuronas que sufren degeneración nunca se regeneran o nunca encuentran su diana original y dan como resultado una disfunción o disfunciones permanentes. Esta disfunción puede comprender la pérdida de la función motora, pérdida de la función sensorial, parestesias, pérdida de reflejos, rigidez, contracturas, o descenso del campo de movilidad.

45 El dolor normalmente se asocia con el daño o lesión sensorial, y da como resultado la protección e inmovilización del área afectada. La nocicepción (señal principal de la sensación de dolor), por lo tanto, es concomitante a los mecanismos y promoción de la curación rápida, aunque es desencadenante de una experiencia sensorial y emocional desagradables. Sin embargo, en muchas situaciones patológicas, las entradas nociceptivas pueden dar como resultado cambios funcionales que son seriamente perjudiciales para el organismo. La lesión nerviosa da como resultado la alteración de muchas de las propiedades de las neuronas aferentes primarias y sus conexiones centrales en la médula espinal, conduciendo a la alodinia (la percepción de dolor a partir de un estímulo normalmente inocuo), hiperalgesia (una respuesta exagerada a cualquier estímulo doloroso) y una expansión del campo receptivo (es decir, el área que está "dolorida" cuando se aplica un estímulo). La mayoría de las condiciones del dolor crónico surgen como resultado de una lesión bien del tejido nervioso central o periférico.

Una abundante bibliografía demuestra que las neuregulinas mejoran la capacidad de las neuronas para regenerarse a través de conductos y funciones artificiales como una terapia complementaria junto con terapias celulares, tales como los injertos de células Schwann. Antes de la presente divulgación, se conocía que las neuregulinas en solitario podían tratar, por ejemplo protegiendo y/o restaurando la función de la lesión de nervio periférico.

- 5 Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición que comprende una cantidad eficaz de una neuregulina para uso en un método para disminuir el dolor neuropático en un sujeto en riesgo de tener una lesión de nervio periférico debido a un procedimiento quirúrgico.

También se proporciona una composición que comprende una cantidad eficaz de una neuregulina para uso en un método para disminuir el dolor neuropático en un sujeto que tiene una lesión existente del nervio periférico debido a un procedimiento quirúrgico.

Composiciones de neuregulina

Ejemplos de composiciones incluyen, pero no se limitan a, NRG-1, o una molécula peptídica o de ácido nucleico GGF2. Ejemplos de nervios periféricos sujetos a los métodos descritos incluyen, pero no se limitan a, un nervio ciático y/o un nervio cavernoso.

- 15 La cantidad de dosis real de una composición de la presente invención que se administra a un sujeto se puede determinar mediante factores físicos y fisiológicos, tales como el peso corporal, gravedad de la afección, el tipo de enfermedad que se está tratando, intervenciones terapéuticas previas o concurrentes, idiopatía del paciente y en la vía de administración. El médico responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la concentración del ingrediente o ingredientes activos en una composición, y la dosificación o dosificaciones apropiadas para el sujeto individual.

Determinados aspectos de los métodos descritos incluyen la administración de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 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 µg o mg de un polipéptido o péptido de neuregulina en base a la actividad de la neuregulina usada en particular, la vía de administración, método de administración y contexto médico. Determinados aspectos incluyen la administración de neuregulina antes y/o después de la lesión.

Una neuregulina se puede administrar antes de la lesión, durante la lesión, y/o a intervalos específicos o regulares tras la lesión. En un ejemplo no limitante, una neuregulina se puede administrar aproximadamente cada 24 horas (una vez al día), al menos cada 24 horas, cada 48 horas, al menos cada 48 horas, al menos una vez cada dos días, cada 72 horas, al menos cada 72 horas, durante aproximadamente 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 9 semanas, 10 semanas, 11 semanas, o 12 semanas antes de la lesión. En otra realización se administra GGF2 al menos una vez a la semana durante 1 mes, 2 meses, o 3 meses antes de la lesión. Alternativamente, o en adición, una neuregulina se puede administrar una vez cada 24 horas o cada semana después de la lesión. La administración antes de la lesión puede ser sistémica y/o local. La administración durante la lesión puede ser sistémica y/o local. La administración después de la lesión puede ser sistémica y/o local.

Determinados aspectos de los métodos descritos incluyen la administración de 0,005, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, ó 15 µg o mg, o cualquier valor intermedio, de polipéptido o péptido neuregulina en base a la actividad de la neuregulina que se use, vía de administración, método de administración y el contexto médico. Por ejemplo, una neuregulina o isoforma NRG-1, que incluye, pero no se limita a, GGF2, se administra a 0,5, 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5, ó 15 µg/kg o mg/kg. Se puede emplear cualquier vía de administración adecuada, que incluye, pero no se limita a, la administración parenteral, subcutánea, intramuscular, perineural, intracraneal, intraorbital, oftálmica, intraventricular, intracapsular, intraespinal, intracisternal, intraperitoneal, intranasal, aerosol, oral, o transdérmica o tópica (*por ejemplo*, mediante la aplicación de un dispositivo o un parche adhesivo que transporta una formulación capaz de atravesar la dermis y entrar en el torrente sanguíneo).

En un aspecto de la divulgación, los niveles de dosificación de GGF2 oscilan entre aproximadamente 0,001 mg/kg a 1,5 mg/kg, de aproximadamente 0,001 mg/kg a 2,5 mg/kg, de aproximadamente 0,001 mg/kg a 5,0 mg/kg, de aproximadamente 0,001 mg/kg a 10 mg/kg, o de aproximadamente 0,001 mg/kg a 15 mg/kg, administrado aproximadamente cada 24 horas (una vez al día), al menos cada 24 horas, cada 48 horas, al menos cada 48 horas, al menos una vez cada dos días, cada 72 horas, al menos cada 72 horas, durante aproximadamente 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 9 semanas, 10 semanas, 11 semanas, o 12 semanas. En otra realización el GGF2 se administra al menos una vez por semana durante 1 mes, 2 meses, o 3 meses. En una realización particular, los niveles de dosis de GGF2 oscilan de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 0,02 mg/kg, de aproximadamente 0,02 mg/kg a 0,06 mg/kg, de aproximadamente 0,06 mg/kg a aproximadamente 0,1 mg/kg, de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 0,3 mg/kg, de aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 0,5 mg/kg, de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 0,7 mg/kg, de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 1,0 mg/kg, de aproximadamente 0,7 mg/kg a

aproximadamente 1,0 mg/kg, de aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 1,5 mg/kg, de aproximadamente 1,5 mg/kg a aproximadamente 2 mg/kg, de aproximadamente 2 mg/kg a aproximadamente 2,5 mg/kg, de aproximadamente 2,5 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg, de aproximadamente 3 mg/kg a aproximadamente 3,5 mg/kg, de aproximadamente 3,5 mg/kg a aproximadamente 4 mg/kg, de aproximadamente 4 mg/kg a aproximadamente 4,5 mg/kg, de aproximadamente 4,5 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg, de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 1,5 mg/kg, o de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 5,0 mg/kg administrado aproximadamente cada 24 horas (una vez al día), al menos cada 24 horas, cada 48 horas, al menos cada 48 horas, al menos una vez cada dos días, cada 72 horas, al menos cada 72 horas, durante aproximadamente 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 9 semanas, 10 semanas, 11 semanas, o 12 semanas. En otra realización el GGF2 se administra al menos una vez por semana durante 1 mes, 2 meses, o 3 meses. En otra realización particular, los niveles de dosis de GGF2 oscilan de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 15 mg/kg administrado aproximadamente cada 24 horas (o una vez al día), al menos cada 24 horas, cada 48 horas, al menos cada 48 horas, al menos una vez cada dos días, cada 72 horas, al menos cada 72 horas, durante aproximadamente 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 9 semanas, 10 semanas, 11 semanas, o 12 semanas. En otra realización GGF2 se administra al menos una vez a la semana durante 1 mes, 2 meses, o 3 meses.

En otro aspecto de la divulgación, una neuregulina o isoforma NRG-1 se puede administrar a un sujeto en una dosificación que oscila entre 5 mg/kg a 15 mg/kg, incluidos los puntos finales, de forma sistémica o local. Por ejemplo, cuando un polipéptido o péptido de NRG1, que incluye, pero no se limita a, GGF2, se administra en una dosis que oscila entre 5 mg/kg a 15 mg/kg, incluidos los puntos finales, la vía de administración preferida puede ser intravenosa, subcutánea, transdérmica, o tópica. Una neuregulina se puede administrar antes de la lesión, durante la lesión, y/o a intervalos determinados o regulares tras la lesión. En un ejemplo, una neuregulina se puede administrar 24 ó 48 horas antes de la lesión y una vez cada 24 horas o cada semana tras la lesión. La administración antes de la lesión puede ser sistémica y/o local. La administración durante la lesión puede ser sistémica y/o local. La administración después de la lesión puede ser sistémica y/o local. Algunas de las dosis de una neuregulina (*por ejemplo* una dosis que oscila entre 5 mg/kg a 15 mg/kg, incluidos los puntos finales) se puede administrar mediante un método no-sistémico o local, que incluye, pero no se limita a, inyección o implante subcutáneo o método de reparto transdérmico.

En determinadas realizaciones de las composiciones descritas, las composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,1% del compuesto activo. En otras realizaciones, un compuesto activo puede comprender entre 2% a aproximadamente 75% del peso de la unidad, o entre aproximadamente 25% a aproximadamente 60%, por ejemplo, y cualquier intervalo derivable de ello. En otros ejemplos no limitantes, una dosis puede comprender de aproximadamente 1 microgramo(μ g)/kg/peso corporal, aproximadamente 5 μ g/kg peso corporal, aproximadamente 10 μ g/kg peso corporal, aproximadamente 50 μ g/kg peso corporal, aproximadamente 100 μ g/kg peso corporal, aproximadamente 200 μ g/kg peso corporal, aproximadamente 350 μ g/kg peso corporal, aproximadamente 500 μ g/kg peso corporal, aproximadamente 1 mg/kg peso corporal, aproximadamente 5 mg/kg peso corporal, aproximadamente 10 mg/kg peso corporal, aproximadamente 50 mg/kg peso corporal, aproximadamente 100 mg/kg peso corporal, aproximadamente 200 mg/kg peso corporal, aproximadamente 350 mg/kg peso corporal, aproximadamente 500 mg/kg peso corporal, a aproximadamente 1000 mg/kg peso corporal o más por administración, y cualquier intervalo derivable de ello. En ejemplos no limitantes de un intervalo derivable a partir de los números citados en la presente memoria, un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg peso corporal, aproximadamente 5 μ g/kg peso corporal a aproximadamente 500 mg/kg peso corporal, etc, se pueden administrar, en base a los números descritos anteriormente.

El término "aproximadamente" se emplea para indicar que para determinar el valor para el método o dispositivo que se está empleando, el valor está dentro del 85%, 90%, 95% o de la desviación estándar del error.

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

Por "neuregulina-1", "NRG-1", "heregulina" se entiende un polipéptido que se une a los receptores ErbB 3 ó 4, y mediante emparejamiento con el receptor (dimerización) también a ErbB2. La neuregulina puede ser GGF2 o cualquier subsecuencia de la misma, o cualquier molécula que comprende toda o una parte activa de la secuencia de GGF2. La GGF2 puede ser una secuencia de tipo salvaje, una subsecuencia, o cualquier variante de la misma

que comprenda toda o una parte activa de la secuencia de GGF2. La secuencia de GGF2 puede ser una subsecuencia de una secuencia humana, o cualquier variante de la misma que comprenda toda o una parte activa de la secuencia de GGF2.

5 Un ejemplo no limitante de una secuencia aminoácida de GGF2 de la divulgación (con una región que comprende su dominio similar a EGF subrayado) es:

MRWRRAPRRSGRPGPRAQRPGSAARSSPPLPLPLLLLLLGTAAALAPGAAAGNEAAPAGASVCYSSPPSVGQVQELA
 QRAAVVIEGKVHPQRRQGGALDRKAAAAAGEAGAWGGDREPPAAGPRALGPPAEEPLLAANGTVPSWPTAPVPSA
 GEPGEEAPYLKVHVHQQVAVKAGGLKKDSSLTVRLGTWGHFAFPSCGRLKEDSRYYIFFMEPDANSTSRAPAAFRASF
 PPLETGRNLKKEVSRVLCRRCALPPQLKEMKKSQESAAGSKLVLCRCETSSSEYSSLRFKWFKNGNELNRKKNPQNIKI
 10 KKPKGSELRINKASLADSGEYMCKVSKLGNDASANITIVESNATSTSTTGTSHLVKCAEKEKTCVNGGECFMVKDL
 SNPSRYLCKCPNEFTGDRQCQNYVMASFYSTSTPFLSLPE (SEQ ID NO:1) (número de acceso AAB59622del Banco
 Genético, que se incorpora en la presente memoria por referencia).

15 Un polipéptido de neuregulina o segmento de la misma puede ser 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, ó 100% idéntica u homóloga a la secuencia aminoácida de GGF2. Un polipéptido similar a neuregulina puede ser 75, 80, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ó 100% idéntico u homólogo a la secuencia aminoácida del dominio similar a EGF de GGF2.

20 Los términos “proteína” o “polipéptido” se refieren a una molécula que comprende al menos diez restos aminoácidos. La proteína puede comprender toda o una parte del polipéptido GGF2. Se puede usar una versión de tipo salvaje de una proteína o polipéptido. Alternativamente, o en adición, para tratar la lesión de nervio periférico se usa una proteína o polipéptido modificado. Los términos “péptido”, “proteína” o “polipéptido” se emplean de manera intercambiable. El término “péptido” se puede usar para referirse a secuencias aminoácidas de cualquier longitud.

25 Un “polipéptido modificado” se refiere a un péptido cuya estructura química, particularmente su secuencia aminoácida, se altera con respecto al péptido de 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 que aparece de forma no natural.

30 Los péptidos modificados pueden incluir diferentes sustituciones, inserciones, o deleciones. Las distintas deleciones normalmente carecen de uno o más restos de la molécula nativa o de tipo salvaje. Se pueden eliminar restos individuales o un número de aminoácidos contiguos. Se puede introducir un codón stop (mediante sustitución o inserción) en una secuencia aminoácida codificante para generar una proteína truncada. Las inserciones mutantes normalmente implican la adición del material en un punto no terminal en el péptido. Esto puede incluir la inserción de uno o más restos. Se pueden generar también adiciones terminales, a menudo llamadas proteínas de fusión o péptidos de fusión. Las diferentes sustituciones normalmente contienen el cambio 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, tal como la unión y activación de receptores de neuregulina. Las sustituciones pueden ser conservadoras, que es, que un aminoácido se reemplaza por uno de forma y carga similar. Alternativamente, las sustituciones pueden ser no conservadoras, tal que se puede afectar la función o actividad del péptido. Los cambios no conservadores normalmente implican la sustitución de un resto por otro que no es químicamente similar, tal como un aminoácido polar o cargado por un aminoácido no polar o sin carga, y viceversa.

40 Las sustituciones conservadoras pueden incluir, sin limitación, por ejemplo, los cambios de: alanina por serina; arginina por lisina; asparragina por glutamina o histidina; aspartato por glutamato; cisteína por serina; glutamina por asparragina; glutamato por aspartato; glicina por prolina; histidina por asparragina 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.

50 Los aminoácidos y secuencias de ácidos nucleicos pueden incluir restos adicionales, tales como aminoácidos en el N- o C-terminal adicionales, o secuencias 5' o 3', respectivamente, siempre y cuando la secuencia cumpla el criterio funcional establecido en la presente memoria, tal 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 varias secuencias no codificantes bien en las partes 5' o 3' de la región codificante.

El término “cantidad eficaz terapéuticamente” o una “cantidad eficaz” se debe entender como la cantidad de neuregulina que provoca una respuesta médica o biológica de un tejido, un sistema, animal o ser humano que es requerida por un investigador, veterinario, médico u otro profesional clínico.

55 Un cambio terapéutico puede ser un cambio en una característica bioquímica o fisiológica medida en una dirección que alivia la enfermedad o afección que se está abordando, *por ejemplo*, la lesión de nervio periférico, atrofia muscular (incremento de la masa muscular, mejora del estiramiento muscular, reducción de la atrofia muscular), reduce el dolor neuropático, mejora la recuperación sensorial, mejora la remielinización del nervio periférico. Más en particular, una “cantidad eficaz” es una cantidad suficiente para disminuir los síntomas asociados con una afección o

dolencia médica, para normalizar las funciones corporales en la enfermedad o los trastornos que dan como resultado un deterioro de funciones corporales específicas, o para proporcionar una mejora en uno o más de los parámetros medidos clínicamente de una enfermedad o afección.

Formulaciones Farmacéuticas

5 Las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación comprenden una cantidad eficaz de un péptido disuelto o disperso en un vehículo aceptable farmacéuticamente. Las frases "aceptable farmacéutica o farmacológicamente" se refiere a composiciones que no producen generalmente una reacción adversa, alérgica u otra reacción perjudicial cuando se administra a un sujeto, por ejemplo, un ser humano, según proceda. La preparación de tales composiciones farmacéuticas son conocidas por los expertos en la técnica a la luz de la presente divulgación, tal como queda demostrado por Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^o Ed. Mack Printing Company, 1990, incorporado por referencia en la presente memoria. Por otra parte, para los fines de administración en el ser humano se deberá entender que las preparaciones deberán cumplir los estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza que se requieren por, por ejemplo, la Oficina de Estándares Biológicos de la USFDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos).

15 Por otra parte, como se emplea en la presente memoria "vehículo aceptable farmacéuticamente" incluye materiales tales como disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservadores (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardantes de la absorción, sales, conservadores, fármacos, fármacos estabilizantes, geles, aglutinantes, excipientes, agentes disgregantes, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, tintes, tales como materiales y combinaciones de los mismos, como se conocen por el experto en la técnica en vista de la presente divulgación. Salvo en el caso de cualquier vehículo convencional incompatible con un ingrediente activo, se considera su uso en las composiciones terapéuticas y farmacéuticas.

25 Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden comprender diferentes tipos de vehículos dependiendo de si se va a administrar de forma sólida, líquida o en aerosol, y si es necesario que sea estéril para tales vías de administración, como la inyección. Los polipéptidos o péptidos de neuregulina de la divulgación se pueden administrar de forma intravenosa, intradérmica, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intrapleural, intratraqueal, intranasal, intravitreal, intravaginal, intrarrectal, intratumoral, intramuscular, perineural, subcutánea, subconjuntiva, intravesicular, mucosal, intrapericardial, intraumbilical, intraocular, oral, tópica, local, por inhalación (por ejemplo, aerosol). Por otra parte, los polipéptidos o péptidos de neuregulina de la divulgación se pueden administrar mediante inyección, infusión, infusión continua, baño de células diana por perfusión localizada de forma directa, a través de un catéter, a través de lavado, o mediante otro método o cualquier combinación de lo anterior como se conocerá por el experto en la técnica.

35 La cantidad de dosis real de una composición de la presente invención que se administra a un sujeto se puede determinar mediante factores físicos y fisiológicos, tales como el peso corporal, gravedad de la afección, el tipo de enfermedad que se está tratando, intervenciones terapéuticas previas o concurrentes, paciente idiopático y en la vía de administración. El médico responsable durante la administración determinará, en cualquier caso, la concentración del ingrediente o ingredientes activos en una composición y la dosis o dosis adecuadas para el sujeto individual.

40 En determinadas realizaciones de las composiciones y métodos divulgados, las composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,1% del compuesto activo. En otras realizaciones, un compuesto activo puede comprender entre aproximadamente 2% a aproximadamente 75% del peso de la unidad, o entre aproximadamente 25% a aproximadamente 60%, por ejemplo, y cualquier intervalo derivable del mismo. En otros ejemplos no limitantes, una dosis puede comprender también de aproximadamente 1 microgramo(μg)/kg/peso corporal, aproximadamente 5 μg /kg/peso corporal, aproximadamente 10 μg /kg/peso corporal aproximadamente 50 μg /kg/peso corporal, aproximadamente 100 μg /kg/peso corporal, aproximadamente 200 μg /kg/peso corporal, aproximadamente 350 μg /kg/peso corporal, aproximadamente 500 μg /kg/peso corporal, aproximadamente 1 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 5 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 10 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 50 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 100 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 200 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 350 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 500 mg/kg/peso corporal, aproximadamente 1000 mg/kg/peso corporal o más por administración, y cualquier intervalo derivable del mismo. En ejemplos no limitantes de un intervalo derivable a partir de los números enumerados en la presente memoria, se puede administrar un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg/peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg/peso corporal, 5 μg /kg/peso corporal a aproximadamente 500 mg/kg/peso corporal, etc, según los números descritos anteriormente.

55 En cualquier caso, la composición puede comprender varios antioxidantes para retardar la oxidación de uno o más componentes. Adicionalmente, la prevención de la acción de los microorganismos se puede producir por los conservadores, tales como los diferentes agentes antibacterianos y antifúngicos, que incluyen pero no se limitan a, parabenos (por ejemplo, metilparabenos, propilparabenos), clorobutanol, fenol, ácido sórbico, tiomersal o combinaciones de los mismos.

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular dentro de una composición en forma de una base libre, neutra

o sal. Las sales aceptables farmacéuticamente incluyen las sales de adición de ácido, por ejemplo, las formadas con los grupos amino libres de una composición peptídica, o que se forma con ácidos inorgánicos, tales como por ejemplo, los ácidos clorhídrico o fosfórico, o tales como los ácidos orgánicos como el acético, oxálico, tartárico o mandélico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas, tales como por ejemplo, de hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o hierro; o tales como bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína.

En realizaciones en donde la composición está en forma líquida, un vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que comprende pero no se limita 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 adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el empleo de un recubrimiento, tal como lecitina; mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido por dispersión en vehículos tales como, por ejemplo, poliol líquido o lípidos; mediante el empleo 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 sódico o combinaciones de los mismos.

En determinadas realizaciones, las composiciones se preparan para administración mediante tales vías como la ingestión oral. En estas realizaciones, la composición sólida puede comprender, por ejemplo, disoluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, cápsulas (por ejemplo, cápsulas de gelatina dura o blanda), formulaciones de liberación sostenida, composiciones bucales, píldoras, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, o combinaciones de las mismas. Las composiciones orales se pueden incorporar directamente en la comida de la dieta. Vehículos preferidos para la administración oral comprenden diluyentes inertes, vehículos comestibles asimilables o combinaciones de los mismos. La composición oral se puede preparar como un jarabe o elixir. Un jarabe o elixir, puede comprender, por ejemplo, al menos un agente activo, un agente edulcorante, un conservador, un agente saborizante, un colorante, un conservador o combinaciones de los mismos.

En determinadas realizaciones preferidas una composición oral puede comprender uno o más aglutinantes, excipientes, agentes de disgregación, lubricantes, agentes saborizantes, y combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, una 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 alginico o combinaciones de los mismos; 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 saborizante, tal como, por ejemplo, menta, aceite de gaulteria, saborizante de cereza, saborizante de naranja, etc; o combinaciones de los mismos anteriormente mencionados. Cuando la forma unitaria de dosificación es una cápsula, puede contener, en adición a los materiales de los tipos anteriores, vehículos tales como un vehículo líquido. Se pueden presentar otros materiales diferentes como recubrimientos o para modificar la forma física de la dosis unitaria. Por ejemplo, comprimidos, píldoras, o cápsulas se pueden recubrir con laca, azúcar o ambos.

Se pueden preparar disoluciones inyectables estériles mediante la incorporación de compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente adecuado opcionalmente con varios de otros ingredientes enumerados anteriormente, como se requiere, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación de varios ingredientes activos esterilizados en el vehículo estéril que contiene el medio de dispersión y/o los otros ingredientes. En el caso de los polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, suspensiones o emulsiones, los métodos preferidos de preparación son el secado a vacío o técnicas de secado por congelación que producen un polvo del ingrediente activo más los ingredientes adicionales deseados a partir de un medio líquido del mismo estéril filtrado previamente. El medio líquido y el primer diluyente isotónico líquido se deberían tamponar adecuadamente si es necesario con suero salino o glucosa antes de la inyección. También se contempla la preparación de composiciones altamente concentradas para la inyección directa, donde se prevé el empleo de DMSO como disolvente para dar como resultado una penetración extremadamente rápida, repartiendo altas concentraciones de los agentes activos en un área pequeña.

Preferiblemente, una composición de la divulgación es estable bajo condiciones estándar de fabricación y almacenamiento, y se conserva contra la acción contaminante de los microorganismos, tales como las bacterias y los hongos. Se apreciará que la contaminación por endotoxinas se deberá mantener mínimamente a un nivel seguro, por ejemplo, menos de 0,5 ng/mg de proteína.

En realizaciones particulares, la absorción prolongada de una composición inyectable se puede producir mediante composiciones de la divulgación que comprenden agentes que retrasan la absorción, tal como, por ejemplo, monoesterato de aluminio, gelatina o combinaciones de los mismos.

Nervios periféricos: Nervio cavernoso

El modelo de disfunción eréctil de rata es un modelo estándar, aceptado y bien conocido de la lesión de nervio periférico. En este planteamiento específico, el nervio cavernoso se lesiona mediante compresión con fórceps. Se

5 puede emplear como modelo la misma compresión o lesión por aplastamiento en cualquier otro nervio periférico. En el modelo de lesión de nervio cavernoso el déficit funcional está en la función eréctil. En vista de la fisiopatología uniforme y común de la lesión de nervio traumático, tal lesión de nervio cavernoso es un modelo excelente para la lesión causada por prostatectomía, así como un modelo general para todas las lesiones traumáticas del nervio periférico.

10 Las lesiones de los nervios periféricos inducen cambios dentro de los cuerpos celulares de las neuronas sensoriales localizadas en el ganglio de la raíz dorsal (DRG); estos cambios promueven la supervivencia y regeneración axonal. Bajo condiciones favorables, por ejemplo tras una lesión por aplastamiento, la mayoría de las fibras nerviosas se regeneran satisfactoriamente. Sin embargo, en muchas circunstancias clínicamente relevantes, la lesión nerviosa traumática o causada por una enfermedad tiene un resultado pobre, con sólo una restitución limitada de la función y a menudo con un retardo considerable. En tales casos, se pueden desarrollar estados de dolor neuropático o crónico.

15 El dolor se asocia normalmente con lesión o daño del nervio sensorial y da como resultado una protección e inmovilización del área afectada. La nocicepción (señalización neuronal subyacente de la sensación del dolor) es, por lo tanto, concomitante para los mecanismos y la promoción de la rápida curación, aunque es desencadenante de una experiencia sensorial y emocional desagradables. Sin embargo, en muchas situaciones patológicas, las entradas nociceptivas puede dar como resultado cambios funcionales que son seriamente perjudiciales para el organismo.

20 La lesión nerviosa da como resultado la alteración de muchas de las propiedades de las neuronas aferentes primarias y sus conexiones centrales en la médula espinal, conduciendo a la alodinia (la percepción de dolor a partir de un estímulo normalmente inocuo), hiperalgesia (una respuesta exagerada a cualquier estímulo doloroso) y una expansión del campo receptivo (es decir, el área que está "dolorida" cuando se aplica un estímulo). La mayoría de las afecciones del dolor crónico surgen como resultado de una lesión bien al tejido nervioso central o periférico.

25 La impotencia, o también llamada disfunción eréctil (ED, de sus siglas en inglés), es un problema común que afecta a 20 millones de hombres sólo en los Estados Unidos. La erección del pene es un fenómeno neurovascular que depende tanto de la integridad neural como de los vasos sanguíneos funcionales. En la estimulación sexual, los neurotransmisores (especialmente el óxido nítrico) se liberan de las terminaciones del nervio cavernoso y de las células endoteliales. La consiguiente relajación de las arterias y de los músculos lisos arteriales incrementa el flujo arterial. La sangre capturada dentro del cuerpo cavernoso produce en el pene un estado erecto.

30 La lesión de nervio cavernoso a partir de las cirugías pélvicas radicales, tales como para el cáncer de próstata, vejiga o rectal, es una de las causas más comunes de ED iatrogénica en este país. La ED es la principal fuente de morbilidad tras la prostatectomía radical. Por ejemplo, a pesar de la introducción de técnicas quirúrgicas moderadas, las tasas de eficacia postoperatoria oscilan entre 30% y 80% de los hombres que han sufrido procedimientos moderados del nervio cavernoso bilateral para el cáncer de próstata confinado en el órgano (Wang, J Sex Med, 4:1085-97, 2007).

35 Hasta la fecha se han investigado varias estrategias neuromoduladoras; sin embargo, no existen tratamientos disponibles bien para la neuroprotección de los nervios cavernosos antes de, o en el mismo tiempo de la lesión, o tratamientos para después de la lesión para provocar la regeneración nerviosa (Michl et al., J Urol 176:227-31, 2006; Burnett y Lue, J Urol 176:882-7, 2006). A pesar de las presentes modificaciones moderadas del nervio para terapias quirúrgicas y de radiación para neoplasias pélvicas, existe una necesidad de nuevas formas de preservar y restaurar la función eréctil después del tratamiento.

40 Se ha visto un patrón bien definido de cambios de células distales hacia el sitio de la lesión, progresión desde los axones y degeneración de la vaina de mielina, invasión de macrófagos, fagocitosis, y desdiferenciación de células Schwann hacia 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 neural se facilita por factores tróficos cuando los axones cambian de un modo de 'transmisión' a un modo de crecimiento, que expresan proteínas (GAP-43, tubulina, actina), nuevos neuropéptidos, y citoquinas. Se requieren nuevas estrategias que mejoren el potencial de crecimiento como soporte del nervio distal y no sean imprecisas en la capacidad de regeneración neuronal (Fu y Gordon, Mol Neurobiol. 14:67-116, 1997).

50 **Ejemplos**

Ejemplo 1: Uso de GGF2 para tratar la atrofia muscular tras la lesión de nervio periférico

El diseño general del estudio descrito en la presente memoria se ilustra en la Tabla 1 de a continuación.

Tabla 1. Diseño del Estudio

Grupo	Nº de animales	Lesión	Vehículo artículo de ensayo	Nivel de Dosis (mg/kg)	Volumen de Dosificación (ml/kg)	Vía	Periodo de tiempo
1	18	Lesión	GGF2/Tampón	2,6	1	IV	6 animales durante 2 semanas 6 animales durante 4 semanas 6 animales durante 6 semanas
2	18	Lesión	Formulación Tampón	0	1	IV	6 animales durante 2 semanas 6 animales durante 4 semanas 6 animales durante 6 semanas
3	9	Simulación	NA	0	0	IV	3 animales durante 2 semanas 3 animales durante 4 semanas 3 animales durante 6 semanas

5 Para este estudio, se utilizaron ratas macho Sprague Drawley (CD) de 8-10 semanas de edad. Los animales se distribuyeron al azar en varios grupos quirúrgicos según sus pesos corporales y posteriormente se sometieron a lesión por aplastamiento del nervio ciático a 8-10 mm próximo a la bifurcación del nervio ciático (Figura 1) o recibieron cirugía de simulación en la extremidad posterior derecha. Los animales con lesión por aplastamiento del nervio ciático se trataron con una dosis única en bolo de GGF2 (2,6 mg/kg, intravenosamente) o del vehículo veinticuatro horas después de la lesión y después dos veces a la semana durante la duración del estudio. Los cohortes de animales que representan todos los grupos de tratamiento se sacrificaron a las 2, 4 ó 6 semanas después de la lesión. Los animales se anestesiaron profundamente con ketamina/xilacina, y se sacrificaron mediante perfusión transcardíaca de fosfato tamponado con suero salino seguido de perfusión de paraformaldehído 4%. Se recogió, embebió y seccionó en el sitio lesionado el músculo gastrocnemio lateral y el nervio ciático distal. Se tiñeron secciones del músculo gastrocnemio lateral (3-5 µm) con hematoxilina y eosina (H&E), tinción tricrómica de Masson, y toluidina azul para la evaluación morfológica de la fibrosis muscular y la distribución del área seccional que atraviesa las miofibras (Figura 2). Se observó un incremento significativo en la fibrosis después de la lesión por aplastamiento en comparación con los animales de simulación. Se vio una reducción en la fibrosis significativa en los animales tratados con GGF2 en comparación con los animales tratados con el vehículo a las 4 y 6 semanas tras la lesión. A las 6 semanas, la GGF2 redujo la fibrosis causada por la lesión a niveles cercanos a los normales en comparación con el tratamiento del vehículo.

10

15

20 Además, los nervios ciáticos distales se embebieron en plástico y se diseccionaron. Se tiñeron secciones separadas con H&E, luxol rápido, y toluidina azul para evaluar el grado de desmielinización tras la lesión por aplastamiento. Específicamente, la Figura 3 muestra una serie de fotomicrografías (Trichrome 100X) de secciones de músculo representativas a partir de los animales de simulación [A], los tratados con el vehículo [B], y los tratados con GGF2 [C] a las 2 y 6 semanas tras la lesión. En los animales de simulación, las miofibras estaban dentro de los límites normales a las 2 y 6 semanas después de la lesión. Tras la lesión por aplastamiento, había un incremento en la fibrosis y una reducción del tamaño de las miofibras. El tratamiento con GGF2 redujo significativamente la fibrosis muscular a las 4 y 6 semanas después de la lesión. Adicionalmente, hubo alguna mejora en el tamaño de las miofibras en los animales tratados con GGF2 en comparación con los animales tratados con el vehículo.

25

30 Después de la lesión por aplastamiento del nervio, la fibrosis del músculo diana aumentó a lo largo del tiempo. Además, la distribución del tamaño de las miofibras dentro del músculo diana se desvía hacia áreas menores de las

secciones transversales en los animales con lesión por aplastamiento en comparación con los controles de simulación. El tratamiento con GGF2 redujo significativamente la fibrosis muscular en las 4 y 6 semanas después de la lesión.

5 Además de estos efectos sobre la fibrosis, el tratamiento con GGF2 promovió un desplazamiento en el área de las miofibras hacia un aumento de tamaño (es decir, más que en los controles de simulación) a las 4 y 6 semanas después de la lesión (Figuras 4A-4C). Específicamente, la Figura 4 muestra la distribución de las áreas de las miofibras en el músculo gastrocnemio lateral a las 2, 4 y 6 semanas después de la lesión. A las 2 semanas después de la lesión, la distribución de ambos grupos lesionados por aplastamiento (promedio=1501-2000 μm^2) eran claramente diferentes del grupo de simulación (promedio=3001-3500 μm^2). A las 4 y 6 semanas, el grupo de simulación mostró un desplazamiento hacia la derecha hasta que las secciones superaron un área de 5000 μm^2 . La media del grupo tratado con el vehículo permaneció en áreas menores (2001-2500 μm^2). El tratamiento con GGF2 mejoró significativamente el tamaño de las miofibras a las 4 semanas (2501-3000 μm^2) y a las 6 semanas (3001-3500 μm^2), respectivamente.

Ejemplo 2: GGF2 mejora la remielinización del nervio ciático después de la lesión

15 El análisis preliminar de los nervios distales dañados mostró que la lesión por aplastamiento produce desmielinización axonal a las 2, 4 y 6 semanas después de la lesión. Además, tras la lesión apareció inflamación axonal, degeneración Walleriana, inflamación leve, y fibrosis entre los axones. Se observó un mayor daño axonal que en la mitad del haz nervioso en la sección transversal. El GGF2 mejora la remielinización a las 4 y 6 semanas en el nervio ciático distal lesionado en comparación de los controles tratados con el vehículo.

20 Específicamente, la Figura 5 muestra un ensayo semi-cuantitativo de mielinización en la tinción proteína proteolípido (PLP) del nervio ciático. A las 2, 4, y 6 semanas, las secciones transversales del nervio ciático estaban dentro de los límites normales en los animales de simulación. Había una amplia variedad de lesiones con diferentes grados en los grupos tratados con GGF2 y con el vehículo; sin embargo, parecía que GGF2 reducía cualitativamente el grado de desmielinización cuando se compara con los animales tratados con el vehículo.

25 Ejemplo 3: Modelo de Rata de la Lesión de nervio Cavernoso

El modelo de rata de lesión de nervio cavernoso emplea normalmente la siguiente metodología. Las ratas se anestesian con isoflurano. Los animales se colocaron en una manta eléctrica para mantener la temperatura corporal a 37°C. El abdomen se afeitó y se frotó con una disolución antiséptica Clinidin (povidona yodada). En la cavidad peritoneal se realiza una incisión en la línea media inferior del abdomen, exponiendo tanto el nervio cavernoso como el ganglio pélvico principal (MPGs). Se causa la lesión de nervio cavernoso mediante aplastamiento del nervio cavernoso con una pinza hemostática durante dos minutos por lado. En los estudios relacionados con neuregulina, se trataron dos grupos con neuregulina 48 horas antes de la lesión.

35 El modelo de aplastamiento de rata proporciona un descenso simple, reproducible y extremadamente fiable de la función eréctil. Esta técnica se usa ampliamente y se han publicado varios estudios empleando esta técnica. No existe la necesidad de ensayar la función eréctil después de la lesión por aplastamiento, es predecible que la función eréctil disminuye, y normalmente, el ensayo funcional se realiza en aproximadamente 5 semanas después de la lesión por aplastamiento.

40 Después de la lesión de nervio cavernoso la cavidad abdominal se cierra en dos capas con reproximación de los músculos abdominales y la fascia (sutura absorbible) a través de 2-3 suturas discontinuas. La piel se cierra empleando una sutura continua subcuticular (escondida) con un material se sutura no fibroso (PDS o cubierta vicryl). Se proporcionó de manera preventiva el analgésico buprenorfina (10 minutos antes de la finalización del procedimiento) y cada 6-12 horas después de la operación durante 48 horas para controlar el dolor.

45 En aproximadamente 5 semanas después de la operación, las ratas se anestesiaron con ketamina (100 mg/kg IP) y xilacina (5 mg/kg). La crura cavernosa se expone a través de la misma incisión y se realizaron estudios funcionales empleando una aguja de 23G insertada en la crura izquierda y conectada a un programa informático específicamente diseñado para medir las 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 aproximadamente de 15 minutos. Las ratas se sacrificaron con un eutanásico intercardíaco antes de la recuperación anestésica y se recogieron los tejidos (nervios cavernosos, MPG, pene, próstata) para ensayos con microscopio óptico y molecular e histológico.

50 En la Fig. 6 se presentan los datos de las presiones intracavernosas (ICP), la electroestimulación de los nervios cavernosos a las 5 semanas después de la lesión demostraron una conservación significativa de la función del nervio y del órgano final para ambos grupos tratados con neuregulina y era incluso más significativo a dosis mayores. Los datos se analizaron primero mediante mediciones ANOVA no repetidas con el ensayo de Bonferroni y consideró significancia a $p < 0,05$. Todos los resultados se expresan como la media \pm SEM. Los cambios se mejoraron también significativamente cuando se normalizó a Presiones Aórticas como se muestra en la Fig.7.

Desde un punto de vista histológico, los datos indican que el tratamiento con NRG incrementa el número de fibras

nerviosas intactas según marcaje transportado de forma retrógrada de fluoro-oro en el MPG, y mejoró la conservación de la sintasa de óxido nítrico neuronal y de VaChT desde el nervio y los tejidos de músculo liso del pene. Esto indica que existe un mecanismo de acción neuroprotector y neuroregenerativo. Desciende también la apoptosis del músculo liso en comparación con los animales con lesión por aplastamiento que no reciben ninguna neuregulina.

Ejemplo 4: Métodos Histológicos con Fluoro-Oro

Para realizar este protocolo, se realizó una inyección intracorporal de fluoro-oro 4%, y a la semana, se recolectaron los tejidos del ganglio mayor pélvico (MPG), y se fijaron en paraformaldehído 4%, tampón fosfato 0,1 M, fijado durante la noche y a continuación se colocó en sacarosa 20%. Se realizaron secciones congeladas de 20 pm de grosor. Se tomaron imágenes empleando una cámara Infinity y un sistema de imagen, seguido de un análisis ciego para el recuento de células mejoradas con fluoro-oro. Después, los portaobjetos con las muestras de MPG se seleccionaron aleatoriamente (10 por animal) y se realizaron los recuentos celulares para determinar el número de neuronas intactas. (Véase, por ejemplo, Dail, W. G., Trujillo, D., de la Rosa, D. y Walton, G.: Autonomic innervation of reproductive organs: análisis de las neuronas cuyos axones se proyectan en el nervio principal del pene en el plexo pélvico de la rata. *Anat Rec*, 224: 94, 1989; Laurikainen A, Hiltunen J O, Vanhatalo S, Klinge E, Saarma M: factor neurotrófico derivado de la línea celular glial expresado en el pene de la rata adulta y transportado de forma retrógrada en los nervios parasimpáticos y sensoriales del pene. *Cell Tissue Res* 2000, 302:321-9) [0081]. Por tanto, esto era un protocolo de seguimiento retrógrado empleando fluoro-oro. Los resultados a partir de este protocolo proporcionaron información que indica que el tratamiento con neuregulina ayuda en la regeneración y re-proyección a su diana (el cuerpo cavernoso del pene) y/o en la neuroprotección de los nervios cavernosos.

Por consiguiente, se inyectó fluoro-oro en el órgano diana, en este caso, en el cuerpo del pene. Después, apareció la absorción en los nervios terminales del órgano final. Esta absorción indica que las fibras nerviosas se conservaron y/o re-crecieron en el área inyectada. Una vez allí el fluoro-oro se absorbe, se transporta de una forma retrógrada en el axón del nervio y el marcaje se acumula en las neuronas originales del MPG (ganglio pélvico principal).

La Fig.8 muestra el marcaje de fluoro-oro representativo del ganglio pélvico principal (MPG) de los 3 animales por grupo de tratamiento normal ((panel A), con aplastamiento (panel B), aplastamiento + GGF2 (panel C)). Los animales del grupo normal (panel A) muestran la cantidad de marcaje retrógrado observado en ausencia de lesión de nervio. Los animales con aplastamiento (panel B) demuestran la drástica reducción en las fibras nerviosas intactas a partir de la lesión, como el marcaje de fluoro-oro no es capaz de transportarse por todo el camino regresa al MPG. Los animales con aplastamiento +GGF2 (panel C) muestran un incremento en el número de células del MPG marcadas con fluoro-oro, indicando que hay presentes más fibras nerviosas conservadas después de la lesión como resultado del tratamiento con GGF2.

La Fig. 9 proporciona una cuantificación del marcaje con fluoro-oro en el MPG. Los animales normales tienen un gran número de cuerpos celulares marcados en el MPG. Tras una lesión por aplastamiento el número de células marcadas se reduce drásticamente, a consecuencia del daño de la fibra nerviosa y de la incapacidad resultante para transportar el marcaje de forma retrógrada, regresa al MPG. El tratamiento con GGF2 mejoró el número de fibras nerviosas intactas disponibles para transportar el fluoro-oro desde el tejido del pene hasta el MPG de una manera retrógrada, dando como resultado un mayor número de células marcadas.

Ejemplo 5: Inmunohistoquímica

Las criosecciones longitudinales de la porción proximal del cuerpo se tiñó para nNos, VaChT. Todos los lavados se realizaron con tampón tris que contiene triton-X 1%. El tejido se bloqueó 1 hora con suero de cabra normal 5% y a continuación se incubó toda 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 aclarados, las secciones se incubaron durante 1 hora en HRP de conejo anti-cabra y en HRP de burro anti-cabra (1/1000) y después en una disolución DAB que contiene sulfato de níquel amonio 0,2% y peróxido de hidrógeno 0,03% durante 10 minutos. Después de un último lavado, las secciones se deshidrataron, se aclararon en xileno y se cubrieron con medio Permount (Fisher Scientific).

Tinción de nNos:

El óxido nítrico (NO) liberado de las terminaciones de los axones de los nervios cavernosos dentro del cuerpo cavernoso, junto con el NO endotelial, causan la relajación del músculo liso, iniciando los cambios hemodinámicos de la erección del pene, así como contribuyendo al mantenimiento de la tumescencia. Actualmente se sabe que el regreso de la eficacia tras la lesión de los nervios cavernosos es dependiente, al menos en parte, de la regeneración axonal en los tejidos neuronales restantes y de la re-inervación funcional exitosa del órgano final (permitiendo la

activación de NO neuronal). En el modelo animal de los estudios del pene se observan cambios patobiológicos bien conocidos tras la afectación del nervio cavernoso. Estos cambios patobiológicos pueden oscilar desde neuropraxia hasta daño axonal letal, y puede incluir apoptosis del músculo liso, apoptosis del endotelio, reducción de la sintasa de óxido nítrico (NOS), de la densidad nerviosa, regulación al alza de citoquinas fibroproliferativas, tales como factores de crecimiento de transformación-beta (TGF-3), fibrosis o pérdida de músculo liso, o respuestas de señalización patobiológica, tal como alteración de la proteína del homólogo sonic hedgehog.

Adicionalmente, se piensa que una ausencia crónica de erección secundaria a una neuropraxia del nervio cavernoso durante la fase de recuperación prolongada, exacerba la posibilidad de otro deterioro estructural del músculo liso cavernoso debido a un fallo del ciclo cavernoso normal entre los estados de flacidez y erección (Bella A J, Lin G, Fandel T M, Hickling D R, 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).

Los niveles de nNOS cavernoso es un marcador bien establecido de la conservación del nervio cavernoso. (Véase, por ejemplo, onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1464-410X.2010.09364.x/full). Los resultados de este protocolo indican un efecto neuroprotector y/o regenerativo después de la lesión de nervio cavernoso bilateral en rata producido según el protocolo del Ejemplo 3.

La densidad de las tinciones resultantes (secciones corporales proximales representativas, 5 portaobjetos seleccionados aleatoriamente, observador ciego basado en 5 animales por grupo) indican conservación de nNOS en las tinciones para los sujetos tratados con neuregulina.

La Fig.10 proporciona tinciones representativas de los niveles nNOS. La densidad de las tinciones indica la presencia de nNOS. Los resultados de este trabajo incluyen tinciones del tejido normal (panel A). Por comparación, existe una pérdida significativa de la tinción de nNOS después de la lesión por aplastamiento del nervio cavernoso (panel B). La tinción conservada de nNOS de las terminaciones nerviosas del nervio cavernoso en el cuerpo del pene demuestran tasas aumentadas en la supervivencia y/o regeneración de los nervios cavernosos tras lesión por aplastamiento con tratamiento de GGF2 (panel C). La densidad de las tinciones indican la conservación de nNOS en la tinción con tratamiento de GGF2.

Tinción del Transportador de Acetilcolina Vesicular (VaChT):

Las neuronas del ganglio pélvico que inervan el pene expresan los marcadores nNOS y de acetilcolina, mientras que la inervación noradrenérgica simpática del pene se presenta sobre todo a través de la cadena simpática y no atraviesa los nervios del pene o el ganglio pélvico. Los resultados de este protocolo proporcionan información que indica que el tratamiento con neuregulina ayuda en la regeneración y re-proyección. La densidad de las tinciones resultantes (secciones corporales proximales representativas, 5 portaobjetos seleccionados aleatoriamente, observador ciego basado en 5 animales por grupo) indican conservación de VaChT en las tinciones de las ratas que recibieron la GGF2.

La Fig. 12 proporciona la tinción inmunohistoquímica representativa del transportador de acetilcolina vesicular (VaChT). La densidad de las tinciones indica la presencia de VaChT. Los resultados incluyen la tinción normal (panel A), y una pérdida significativa de la tinción de VaChT después de la lesión por aplastamiento del nervio cavernoso (panel B). Por el contrario, la tinción de VaChT conservada de las terminaciones nerviosas en el cuerpo del pene mostrada en el panel C demuestran tasas de supervivencia y/o de regeneración de los nervios cavernoso después de la lesión por aplastamiento tratada con GGF2 (panel C). La densidad de las muestras de tinción indican conservación de la tinción de VaChT con el tratamiento de GGF2.

Tinción TH:

La TH es un marcador de las fibras nerviosas adrenérgicas y se usa para mantener la conservación del nervio en el cuerpo. La porción proximal del cuerpo se crioseccionó longitudinalmente y se tiñó con anticuerpos primarios presentados en contra del marcador de la síntesis de catecolamina, 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; 6:3032-3044).

La densidad de los resultados de las tinciones indican la presencia de TH. La densidad de los resultados de las tinciones conseguidas en la actualidad (secciones corporales proximales representativas, 5 portaobjetos seleccionados aleatoriamente, observador ciego basado en 5 animales por grupo) indican la conservación de la tinción de TH en los animales tratados con GGF2. La Fig. 11 proporciona niveles de la tinción representativa de hidroxilasa tirosina (TH). Los resultados incluyen la tinción del tejido normal (panel A) y, una pérdida significativa de la tinción de TH después de la lesión por aplastamiento del nervio cavernoso (panel B). El panel C muestra la tinción conservada de las terminaciones del nervio cavernoso en el cuerpo del pene que corresponde a un incremento general en la conservación de la inervación del pene tras la lesión por aplastamiento con el tratamiento de GGF2 (panel C). La densidad de la tinción muestran tendencias hacia la conservación de la tinción de TH con el tratamiento de GGF2.

Ejemplo 6: GGF2 es neuroprotector en la disfunción eréctil causada por lesión de nervio cavernoso en un modelo de

rata.

La disfunción eréctil (ED) es una complicación común después de una prostatectomía radical. Está reconocido que es debido a una neuropatía eréctil; sin embargo, no existe un tratamiento eficaz. El factor de crecimiento glial 2 (GGF2) es un miembro de la familia de las neuregulinas de los factores de crecimiento que han demostrado proteger las neuronas de la lesión y estimular su crecimiento en un intervalo de los modelos animales de neuropatía. Nuestros datos previos sugieren que la GGF2 repartida subcutáneamente (sc) puede ser una terapia viable para la lesión de nervio cavernoso (CN). En este estudio, se analizó un intervalo de dosis de GGF2 eficaz para recuperar la función eréctil (EF) y examinar su efecto en la supervivencia del CN.

Ratas macho adultas (de media, peso de aproximadamente 325-350 gramos) se sometieron a lesión por aplastamiento del nervio cavernoso bilateral (CN) (BCI) o a cirugía de simulación (Control) y se dividieron en los siguientes grupos (n=10-12/grupo, tratamiento farmacológico ciego): Control+vehículo (Grupo A); Control+GGF2 (15 mg/kg) (grupo B); BCI+vehículo (Grupo E); BCI+GGF2 (5 mg/kg) (Grupo C); BCI + GGF2 (15 mg/kg) (Grupo D). El tratamiento con GGF2 se administró subcutáneamente (sc) 24 horas antes de la cirugía (1ª dosis), 24 horas después de la cirugía (2ª dosis) y una vez a la semana hasta el final del estudio durante 5 semanas después de BCI o de la cirugía de simulación (de la 3ª a la 7ª dosis). Al final del tratamiento, se examinó la función eréctil (EF) mediante monitorización de las respuestas de la presión intracavernosa (ICP) a estimulación eléctrica del CN a 0,3, 1 y 4 volts. Los CNS se procesaron para el análisis y cuantificación al microscopio electrónico de las fibras nerviosas desmielinizadas.

La Figura 13 muestra el incremento de los pesos corporales para cada grupo experimental de la primera a la última dosis de GGF2 o vehículo.

La EF descendió significativamente en los grupos con BCI+vehículo y BCI+GGF2 (15 mg/kg) ($p < 0,05$) pero no para el grupo con BCI+GGF2 (5 mg/kg) ($p > 0,05$) comparado con el grupo Control+vehículo a 0,3 y 1 voltio (Figura 14A y B). A 4 voltios, la EF descendió significativamente en ambos grupos BCI+GGF2 (5 y 15 mg/kg) en comparación con el grupo BCI+vehículo ($p > 0,05$), y no hubo diferencia con el grupo Control+vehículo ($p > 0,05$) (figura 14A y B). En el grupo BCI+GGF2 (5 mg/kg), el número de células de Schwann denervadas sin fibras desmielinizadas era significativamente menor que en el grupo de BCI+vehículo ($p < 0,05$), y el histograma de fibras nerviosas desmielinizadas demostró un cambio hacia la derecha, indicando un incremento en el número de axones desmielinizados por célula Schwann (Figura 15).

El tratamiento con GGF2 a 5 mg/kg sc, protegió de forma eficaz la EF en ratas tras la lesión por aplastamiento del CN con un incremento en el número de fibras nerviosas desmielinizadas supervivientes. Estos resultados indican que el GGF2 es un potente agente neuroprotector en la inervación del pene y proporciona un nuevo enfoque terapéutico para tratar o prevenir la ED después de una cirugía de próstata.

Ejemplo 7: Realizaciones Alternativas

La lesión de nervio periférico puede aparecer en casi cualquier contexto quirúrgico. La probabilidad de la lesión nerviosa se correlaciona con la localización y la extensión de la disección del tejido en cualquier cirugía. Por ejemplo, la cirugía de mastectomía tiene complicaciones frecuentes resultantes de la lesión de nervio periférico que incluye la insensibilización de la axila y del brazo (por ejemplo, lesión de nervio intercostobraquial), aleteo de la escápula (lesión a lo largo del nervio torácico), parálisis del músculo dorsal ancho (lesión de nervio toracodorsal). (Véase Watt-Boolsen et al., 1988; Aitken y Minton, 1983).

Por consiguiente, la neuregulina se usa bien antes, después o tanto antes como después de la mastectomía para limitar la lesión de los nervios y/o mejorar la recuperación de la función del nervio periférico. A los pacientes programados para someterse a una mastectomía se les trata aproximadamente 24 horas antes de la cirugía con una cantidad apropiada de neuregulina. Opcionalmente, a los pacientes se les trata también durante un periodo de hasta aproximadamente 6 semanas o más después de la cirugía para mejorar la recuperación neuronal. En realizaciones alternativas, a los pacientes se les trata sólo antes o sólo después de la cirugía. Como se indica en la presente memoria, la neuregulina se usa para prevenir la lesión nerviosa resultante de las cirugías de resección tumorales (prostatectomía, mastectomía, tiroidectomía, etc). Cabe destacar que las neuregulinas se han implicado como promotoras y como supresoras de la formación y crecimiento de células tumorales (Atlas et al., 2003; Chua et al., 2009). El tratamiento con neuregulina puede o no estar contraindicado en pacientes con determinados tumores. Las neuregulinas se usan en pacientes con tumores ErbB positivos sólo cuando hay suficientes estudios de seguridad que demuestran que las neuregulinas no incrementan el crecimiento de tal tumor.

Por otra parte, el tratamiento de la lesión nerviosa a partir de una cirugía no se limita a la mastectomía y a la prostatectomía. La lesión de nervio aparece frecuentemente en cualquier cirugía que implica una disección y/o resección significativa. Estas cirugías pueden incluir, pero no se limitan a, la cirugía de la extremidad superior, cirugía de mano, cirugía/reemplazamiento de rodilla, cirugía/reemplazamiento de cadera, cirugía/reemplazamiento de codo, disección del cuello para cirugía arterial y venosa, cirugía de tiroides, amigdalectomía, cirugía de mano y pie. La lesión de nervio periférico es común en la cirugía pélvica, cirugía abdominal y colorrectal. Las lesiones nerviosas también aparecen en cirugías orales o faciales.

Además de la lesión directa de los nervios a través de la disección y resección en la cirugía, la lesión de nervio frecuentemente resulta de la compresión o estiramiento de los nervios durante la cirugía debido a la posición del paciente, compresión en puntos de contacto o por paños, amarres, sujetadores, cintas u otro material que puede comprimir el tejido. Esto se puede deber a resultados inevitables de la cirugía o al resultado de una técnica inadecuada. Sea cual sea la ubicación o la etiología de la lesión de nervio periférico, se ha descubierto que las neuregulinas previenen y/o tratan tal lesión.

En los seres humanos, los ensayos clínicos demuestran con datos la eficacia de las NRG para la prevención y el tratamiento de la lesión de nervio periférico, a partir de la evaluación de la función sensorial y/o motora de regiones nerviosas frecuentemente afectadas en pacientes que se tratan con neuregulina o con un placebo control. Por ejemplo, la insensibilidad de la axila se puede ensayar mediante métodos neurológicos estándar de la función sensorial que incluyen ensayos de alodinia, hiperalgesia, umbral o agudeza sensorial (dos puntos de discriminación). Estos métodos son estándar en el campo de la técnica. A los pacientes se les sigue durante un periodo de varios meses después de la cirugía y se realizan comparaciones estadísticas entre los grupos de pacientes tratados con neuregulinas y los tratados con un control. De conformidad con estas medidas, se descubrió que el tratamiento con NRG antes y/o después de un evento quirúrgico previene y/o trata la lesión de nervio periférico evaluada.

También se evalúan de una manera similar ensayos análogos a los anteriormente mencionados, para el estiramiento motor, el campo de movimiento y el campo de coordinación. De conformidad con estas medidas, se descubrió que el tratamiento con NRG antes y/o después de un evento quirúrgico previene y/o trata la lesión de nervio periférico que da como resultado un deterioro del estiramiento motor, el campo de movimiento o el campo de coordinación.

Ejemplo 8: Uso de GGF2 para disminuir el dolor neuropático y/o mejorar la función sensorial después de una lesión de nervio periférico

El diseño general del estudio descrito en la presente memoria se ilustra en la Tabla 2 de a continuación.

Tabla 2. Diseño del estudio

Grupo	Nº de animales	Lesión de nervio ciático	Tratamiento	Nivel de Dosis (mg/kg)	Volumen de Dosificación	Vía/ Régimen	Periodo de tiempo
1	12	Aplastamiento	GGF2/ Tampón	2,6	1	IV Dos veces por semana	6 animales durante 2 semanas 6 animales durante 6 semanas
2	12	Aplastamiento	Formulación Tampón	0	1	IV Dos veces por semana	6 animales durante 2 semanas 6 animales durante 6 semanas
3	12	Transección	GGF2/ Tampón	2,6	1	IV Dos veces por semana	6 animales durante 2 semanas 6 animales durante 6 semanas
4	12	Transección	Formulación Tampón	0	1	IV Dos veces por semana	6 animales durante 2 semanas 6 animales durante 6 semanas
5	6	Simulación	NA	0	0	NA	3 animales durante 2

Grupo	Nº de animales	Lesión de nervio ciático	Tratamiento	Nivel de Dosis (mg/kg)	Volumen de Dosificación	Vía/ Régimen	Periodo de tiempo
							semanas 3 animales durante 6 semanas

5 Para este estudio, se emplearon ratas macho Sprague Dawley (CD) de 8-10 semanas de edad. Los animales se agruparon de manera aleatoria en grupos quirúrgicos según sus pesos corporales y se sometieron posteriormente bien a una lesión de nervio ciático izquierdo (aplastamiento o transección) a 8-10 mm próximo a la trifurcación del nervio ciático (Figura 1) o bien se sometieron a una cirugía de simulación en la pata posterior izquierda. Los animales con lesión de nervio ciático se trataron con una dosis única en bolo de GGF2 (2,6 mg/kg, vía intravenosa) o con el vehículo veinticuatro horas después de la lesión y a continuación dos veces por semana durante la duración del estudio. Se ensayaron los cohortes de los animales que representan todos los grupos de tratamiento para las respuestas de comportamiento provocadas al inicio (referencia) inmediatamente antes de la cirugía y luego cada dos semanas después hasta que se sacrificaron a las 2 ó 6 semanas después de la lesión. Se evaluó la sensibilidad mecánica de la pata ipsilateral (nervio lesionado) usando filamentos de von Frey en donde se aplicó una serie de estímulos táctiles escalonados en la base de la pata empleando filamentos calibrados para ejercer fuerzas específicas. El umbral de la respuesta táctil (mecánica) se midió mediante el registro de la fuerza que causa que la pata afectada se retire de manera brusca. Se promedió por grupo los umbrales mecánicos obtenidos a las 2, 4 y 6 semanas después de la lesión y se comparó en todos los tratamientos.

15 Se ensayó también la sensibilidad al frío de la pata ipsilateral antes y dos semanas después de la lesión de nervio o de la cirugía de simulación. Para enfriar de forma selectiva sólo la pata posterior de las ratas, se colocaron individualmente en cámaras con una superficie del suelo elevado y perforado, y se aplicó acetona (100 µL) a la pata posterior. Los sujetos sensibles a este enfriamiento por evaporación mostraron una rápida retirada/lamido de la pata posterior. Se tomó como medida de sensibilidad al frío el porcentaje de respuestas positivas provocadas por cinco aplicaciones secuenciales de acetona, separadas una de la otra por al menos 10 minutos. Se tomó la media por grupo de las sensibilidades al frío después de la lesión obtenidas a las 2, 4 y 6 semanas y se comparó en todos los tratamientos.

20 Las ratas que se sometieron a una lesión parcial del nervio ciático, tal como aplastamiento ciático, a menudo desarrollan síntomas de dolor neuropático. Esto se ejemplificó en el presente estudio mediante la drástica reducción vista en los umbrales mecánicos de las ratas lesionadas por aplastamiento (Fig 16A). Cabe señalar que las ratas que se sometieron a cirugía de simulación se mantuvieron a límites mecánicos de 15 g o superiores mientras que las ratas lesionadas por aplastamiento tratadas con el vehículo mostraron sensibilidades mecánicas consideradas por estar en el intervalo de la alodinia. Se vio que el tratamiento con GGF2 de las ratas lesionadas por aplastamiento mitiga ligeramente la gravedad de la alodinia mecánica. Se vio un patrón similar en el ensayo de la sensibilidad al frío después de la lesión por aplastamiento en donde las ratas tratadas con GGF2 mostraron un menor porcentaje de respuesta al enfriamiento por evaporación de acetona en comparación con las ratas tratadas con el vehículo (Fig 17A).

25 Las ratas que se sometieron a la lesión completa del nervio ciático, como una transección, muestran síntomas de desaferentación, tales como una pérdida completa de sensibilidad mecánica y al frío. Además, la falta de sensación aferente junto con las disestesias aparentes de forma ocasional genera comportamientos de auto-mutilación (autotomía o autofagia) dirigido hacia la extremidad denervada. En la transección ciática de ratas, el tratamiento con GGF2, al contrario que con el tratamiento del vehículo, se vio que promovía fácilmente el re-establecimiento de la sensación mecánica, sin producir alodinia (Fig 16B). Las sensibilidades de la pata al frío mejoró de forma similar mediante el tratamiento con GGF2 después de la transección del nervio ciático (Fig 17B) en comparación con el tratamiento con el vehículo. Finalmente, pocas ratas mostraron autotomía por desaferentación causada por la transección cuando después de las 6 semanas de tratamiento con GGF2 (1 de 6 ratas) se comparó con las 6 semanas de tratamiento con el vehículo (2 de 6 ratas).

Listado de secuencias

45 <110> Acorda Therapeutics, Inc.
Caggiano, Anthony
Bella, Anthony
Iaci, Jennifer
Ganguly, Anindita
50 Parry, Thomas
Colburn, Ray

ES 2 647 917 T3

<120> Uso de neuregulina para tratar una lesión de nervio periférico

<130> 43509-525001WO

<150> 61/618,381

<151> 2012-03-30

5 <150> 61/674,060
<151> 2012-07-20

<150> 61/693,589
<151> 2012-08-27

10 <150> 61/693,585
<151> 2012-08-27

<150> 61/785,419
<151> 2013-03-14

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

15 <210> 1
<211> 422
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Arg Trp Arg Arg Ala Pro Arg Arg Ser Gly Arg Pro Gly Pro Arg
1 5 10 15

Ala Gln Arg Pro Gly Ser Ala Ala Arg Ser Ser Pro Pro Leu Pro Leu
20 25 30

Leu Pro Leu Leu Leu Leu Gly Thr Ala Ala Leu Ala Pro Gly Ala
35 40 45

Ala Ala Gly Asn Glu Ala Ala Pro Ala Gly Ala Ser Val Cys Tyr Ser
50 55 60

Ser Pro Pro Ser Val Gly Ser Val Gln Glu Leu Ala Gln Arg Ala Ala
65 70 75 80

20 Val Val Ile Glu Gly Lys Val His Pro Gln Arg Arg Gln Gln Gly Ala
85 90 95

ES 2 647 917 T3

Leu Asp Arg Lys Ala Ala Ala Ala Ala Gly Glu Ala Gly Ala Trp Gly
 100 105 110

Gly Asp Arg Glu Pro Pro Ala Ala Gly Pro Arg Ala Leu Gly Pro Pro
 115 120 125

Ala Glu Glu Pro Leu Leu Ala Ala Asn Gly Thr Val Pro Ser Trp Pro
 130 135 140

Thr Ala Pro Val Pro Ser Ala Gly Glu Pro Gly Glu Glu Ala Pro Tyr
 145 150 155 160

Leu Val Lys Val His Gln Val Trp Ala Val Lys Ala Gly Gly Leu Lys
 165 170 175

Lys Asp Ser Leu Leu Thr Val Arg Leu Gly Thr Trp Gly His Pro Ala
 180 185 190

Phe Pro Ser Cys Gly Arg Leu Lys Glu Asp Ser Arg Tyr Ile Phe Phe
 195 200 205

Met Glu Pro Asp Ala Asn Ser Thr Ser Arg Ala Pro Ala Ala Phe Arg
 210 215 220

Ala Ser Phe Pro Pro Leu Glu Thr Gly Arg Asn Leu Lys Lys Glu Val
 225 230 235 240

Ser Arg Val Leu Cys Lys Arg Cys Ala Leu Pro Pro Gln Leu Lys Glu
 245 250 255

Met Lys Ser Gln Glu Ser Ala Ala Gly Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys
 260 265 270

Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser Ser Leu Arg Phe Lys Trp Phe Lys Asn
 275 280 285

Gly Asn Glu Leu Asn Arg Lys Asn Lys Pro Gln Asn Ile Lys Ile Gln
 290 295 300

Lys Lys Pro Gly Lys Ser Glu Leu Arg Ile Asn Lys Ala Ser Leu Ala
 305 310 315 320

Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys Lys Val Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp
 325 330 335

Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr Ile Val Glu Ser Asn Ala Thr Ser Thr
 340 345 350

ES 2 647 917 T3

Ser Thr Thr Gly Thr Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys
355 360 365

Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser
370 375 380

Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp
385 390 395 400

Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro
405 410 415

Phe Leu Ser Leu Pro Glu
420

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una cantidad eficaz de una neuregulina para uso en un método para disminuir el dolor neuropático en un sujeto que corre el riesgo de tener una lesión de nervio periférico debido a un procedimiento quirúrgico.
- 5 2. Una composición que comprende una cantidad eficaz de una neuregulina para uso en un método para disminuir el dolor neuropático en un sujeto que tiene una lesión de nervio periférico existente debido a un procedimiento quirúrgico.
3. Una composición para uso según la reivindicación 1 ó 2, en donde el nervio periférico es un nervio ciático o un nervio cavernoso, o en donde la lesión de nervio periférico da como resultado una disfunción eréctil.
- 10 4. Una composición para uso según la reivindicación 1 ó 2, en donde el procedimiento quirúrgico es una disección de un tejido o una resección de un tumor, en donde opcionalmente el tejido o tumor es un cáncer, preferiblemente en donde el cáncer es un cáncer sólido o en donde el cáncer es un cáncer de próstata o mama.
- 15 5. Una composición para uso según la reivindicación 1 ó 2, en donde el procedimiento quirúrgico es una cirugía pélvica, abdominal, o colorrectal.
6. Una composición para uso según la reivindicación 1 ó 2, en donde la lesión de nervio periférico es una transección del nervio, un aplastamiento del nervio, o una desmielinización del nervio.
7. Una composición para uso según la reivindicación 1 ó 2, en donde en el método la composición se administra según un régimen de dosificación discontinuo.
- 20 8. Una composición para uso según la reivindicación 7, en donde el régimen de dosificación discontinuo comprende administrar la composición a intervalos específicos, en donde opcionalmente
 - a) los intervalos específicos se seleccionan del grupo que consiste en cada 24 horas, cada 48 horas, y cada 72 horas, o del grupo que consiste en al menos cada 24 horas, al menos cada 48 horas, y al menos cada 72 horas, y preferiblemente en donde el régimen de dosificación discontinuo continua durante un periodo de tiempo que se selecciona del grupo que consiste en aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas, y aproximadamente 12 semanas, o
 - 30 b) el intervalo específico es al menos una vez por semana, y preferiblemente en donde el régimen de dosificación discontinuo continua durante un periodo de tiempo que se selecciona del grupo que consiste en aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, o aproximadamente 3 meses.
9. Una composición para uso según la reivindicación 1 ó 2, en donde la cantidad eficaz de neuregulina está entre aproximadamente 0,001 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal.
- 35 10. Una composición para uso según la reivindicación 9, en donde la cantidad eficaz de neuregulina está entre aproximadamente 0,001 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 0,5 mg/kg de peso corporal.
11. Una composición para uso según la reivindicación 9, en donde la neuregulina es GGF2, y en donde la cantidad eficaz de GGF2 se selecciona de
 - a) de aproximadamente 0,06 mg/kg a aproximadamente 0,1 mg/kg,
 - 40 b) de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 0,3 mg/kg,
 - c) de aproximadamente 0,3 mg/kg a aproximadamente 0,5 mg/kg,
 - d) de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 0,7 mg/kg,
 - e) de aproximadamente 0,7 mg/kg a aproximadamente 1,0 mg/kg,
 - f) de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 1,0 mg/kg, o
 - 45 g) de aproximadamente 1,0 mg/kg a aproximadamente 1,5 mg/kg.

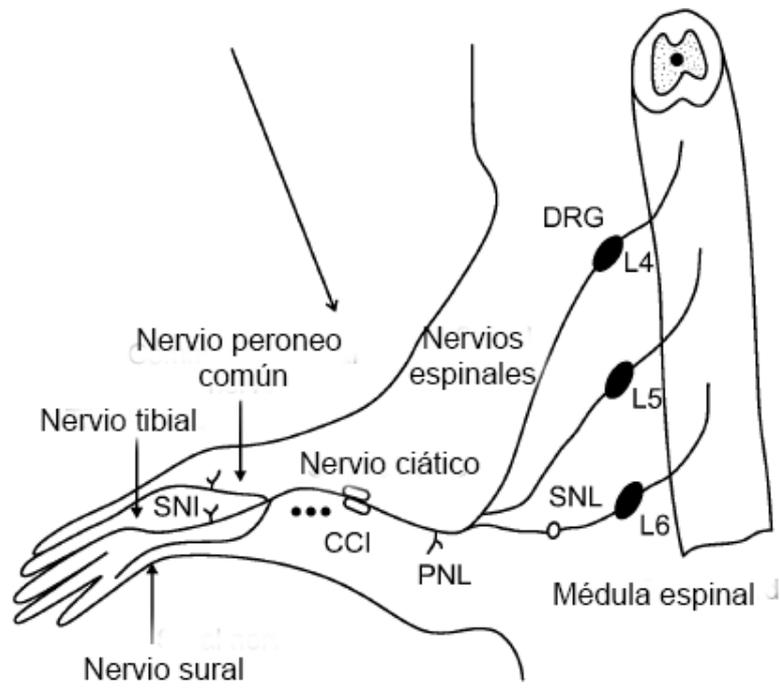


FIG. 1

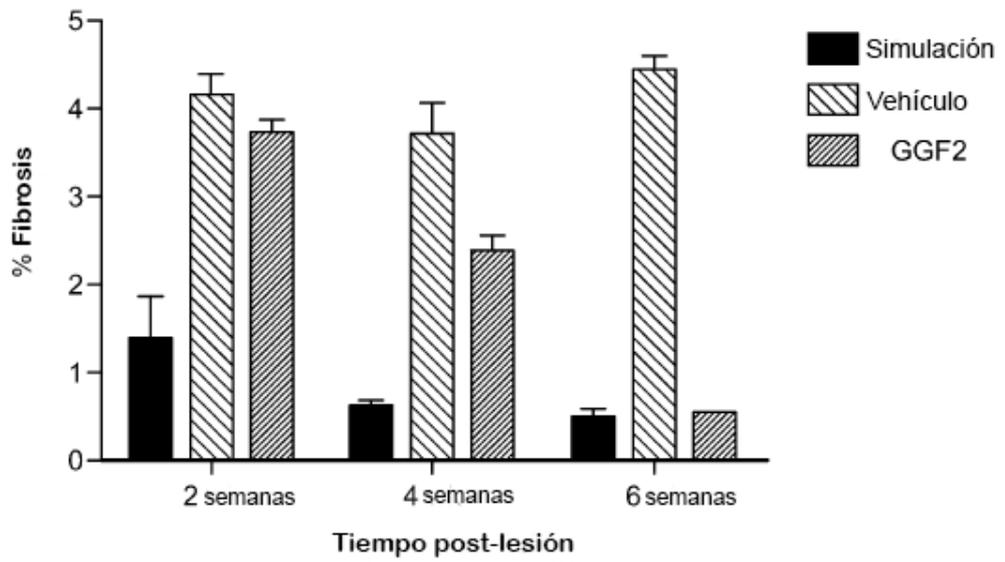


FIG. 2

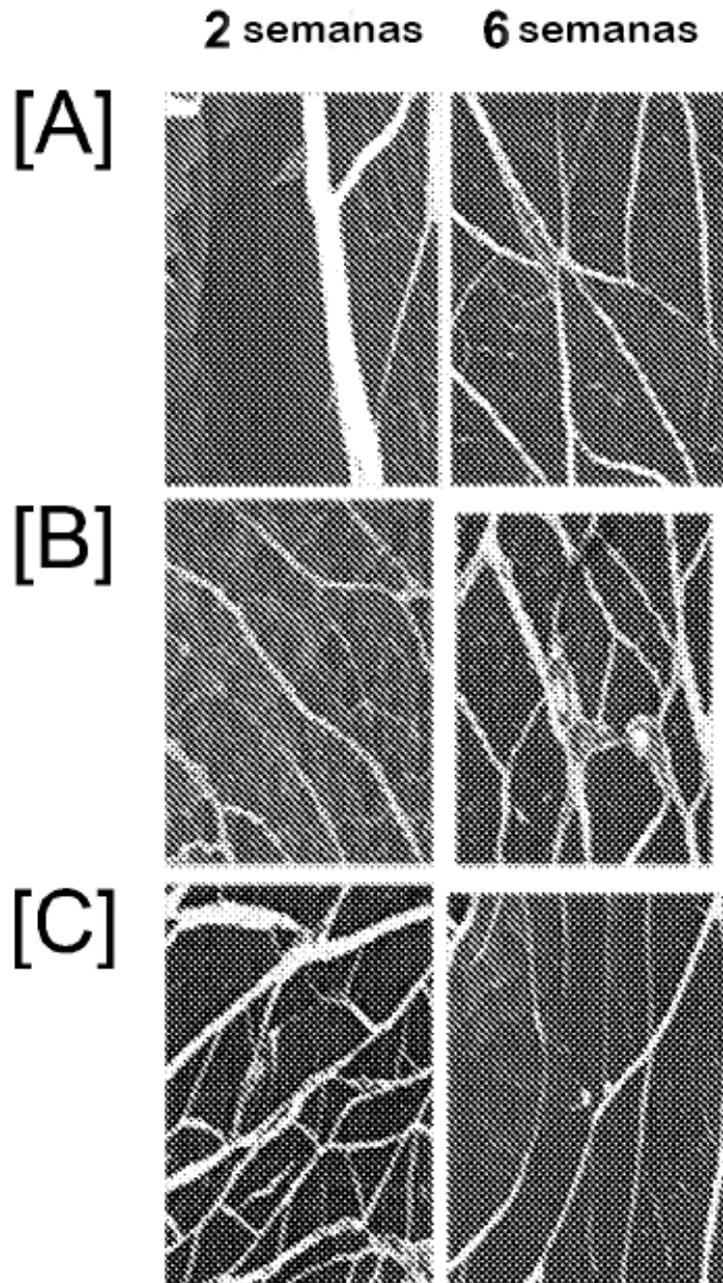


FIG. 3

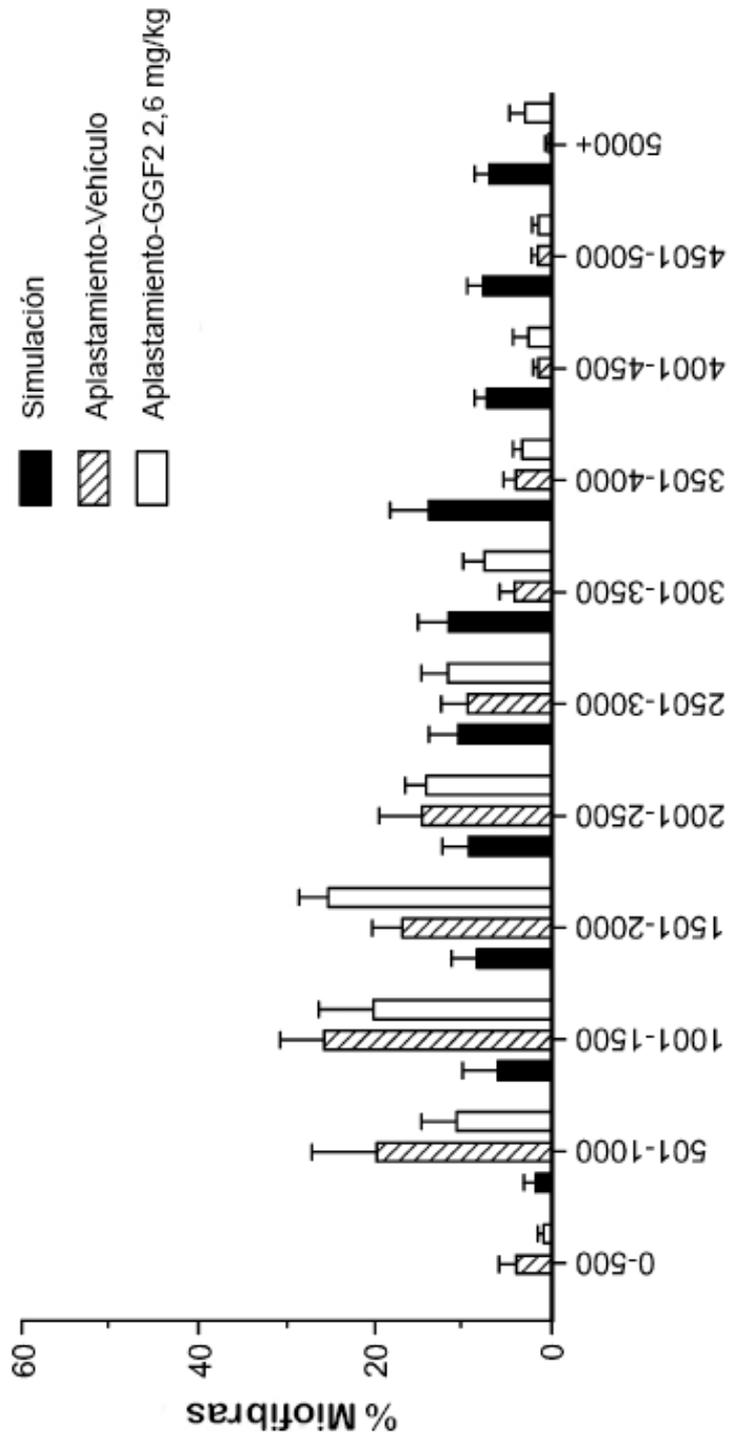


FIG. 4A

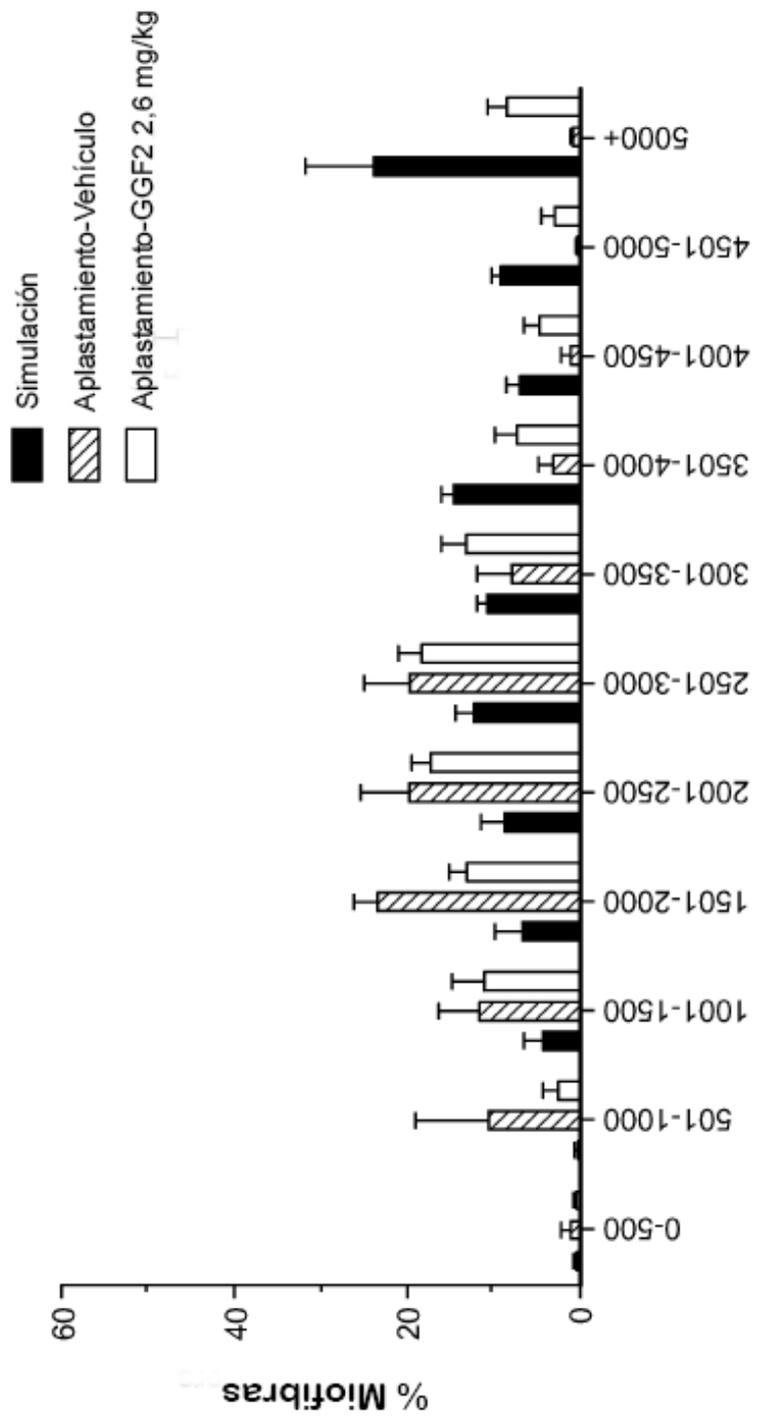


FIG. 4B

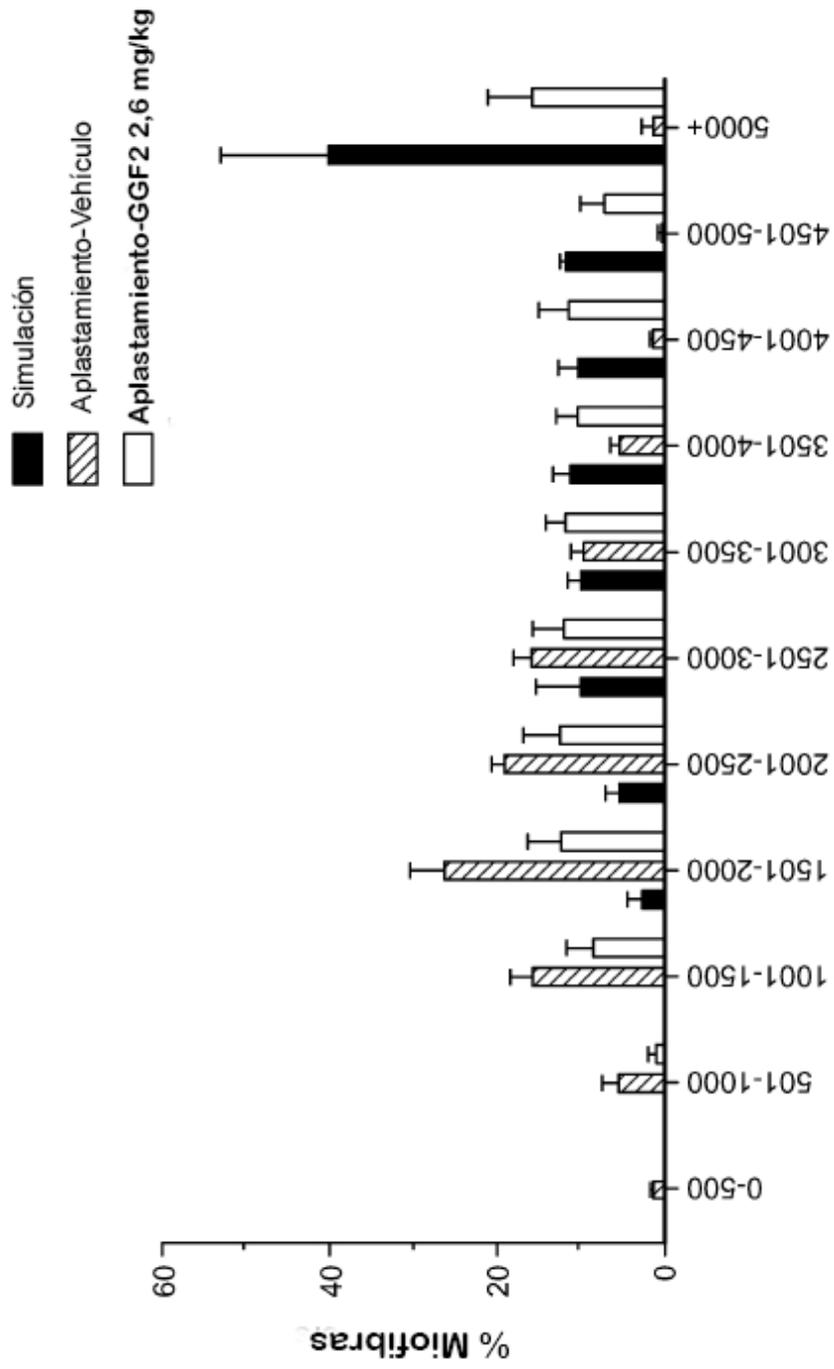


FIG. 4C

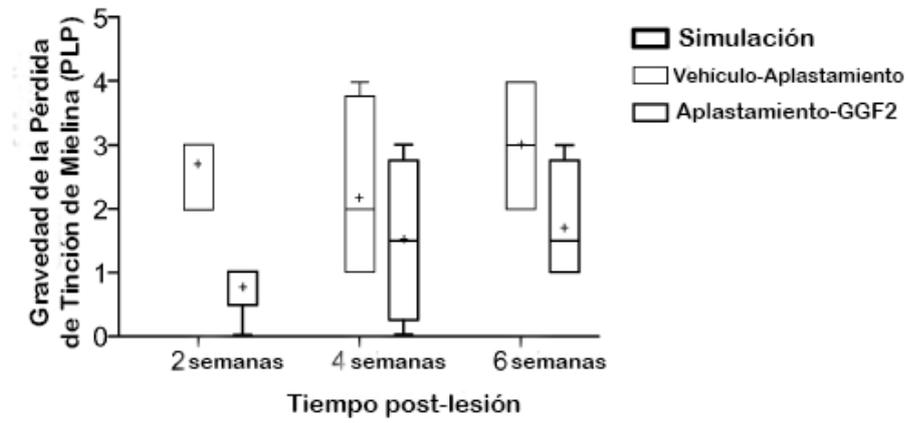


FIG. 5

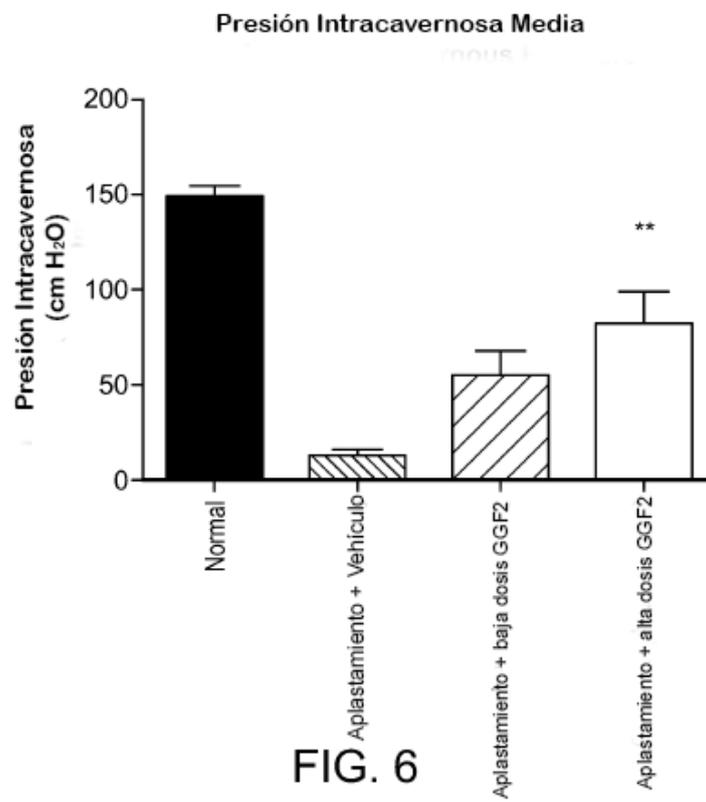
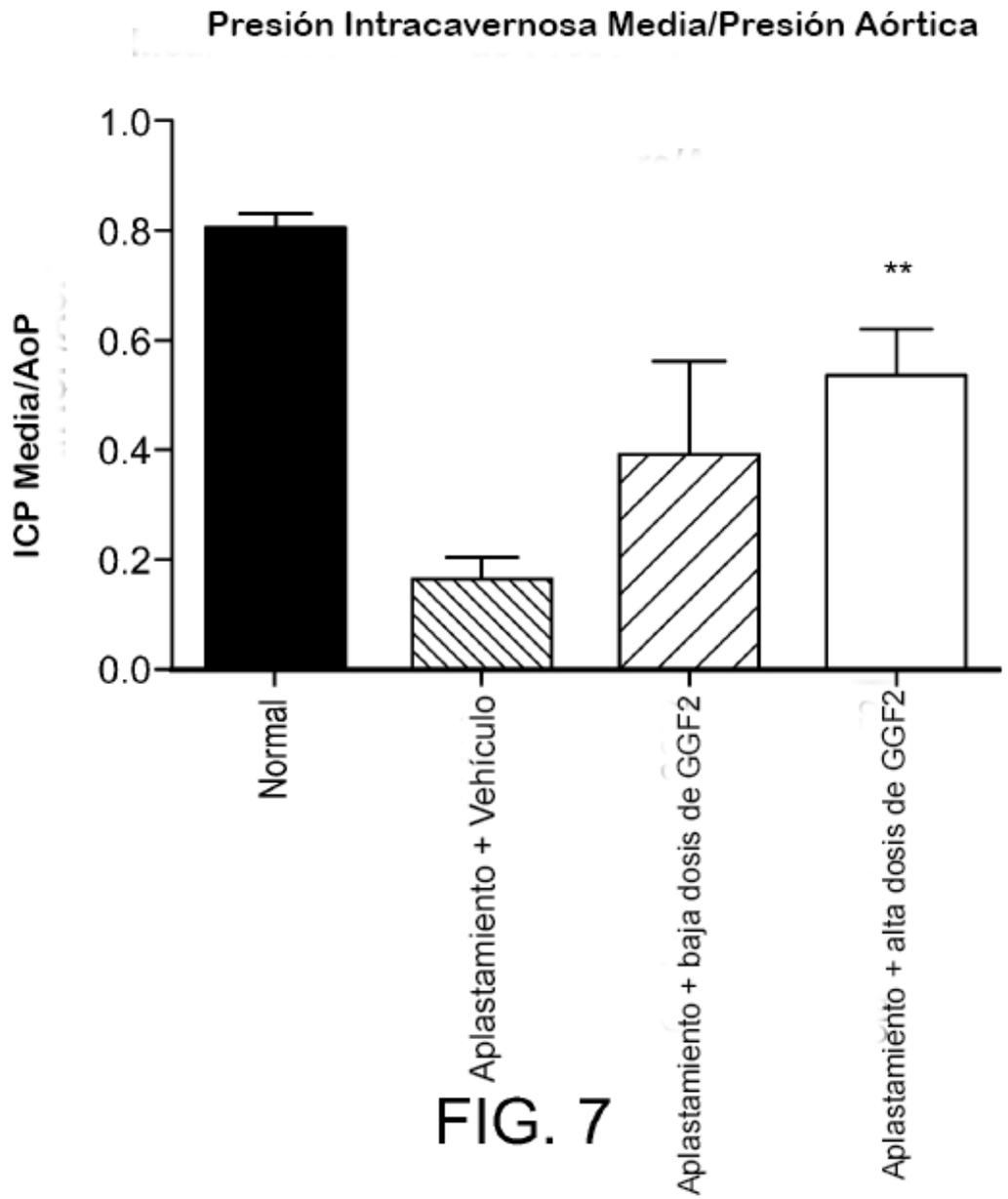


FIG. 6



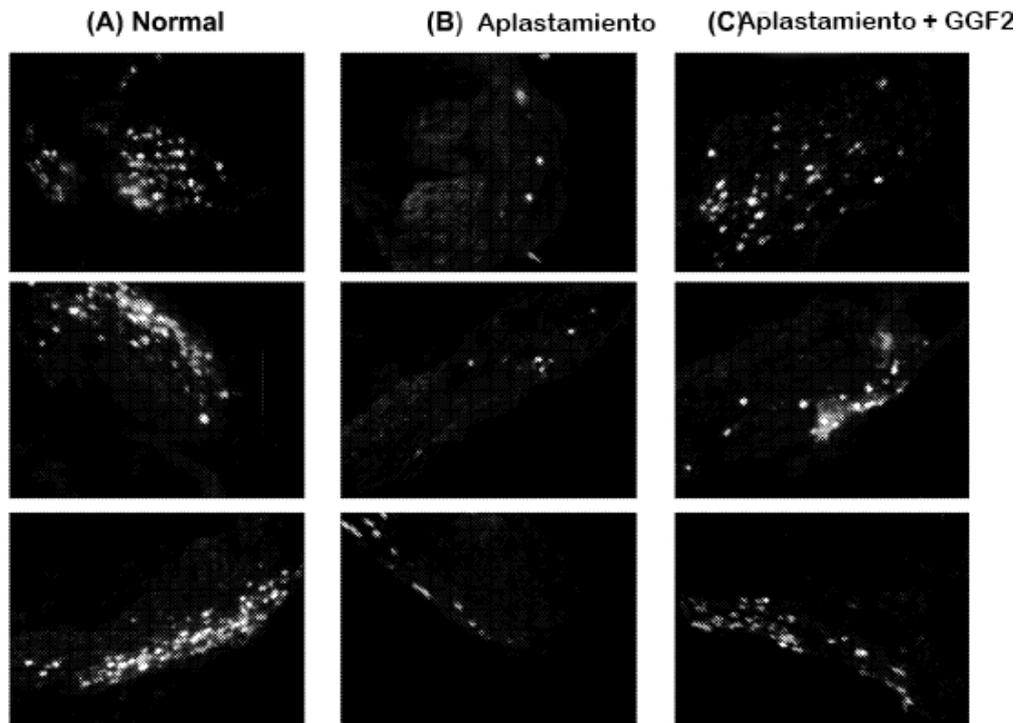


FIG. 8

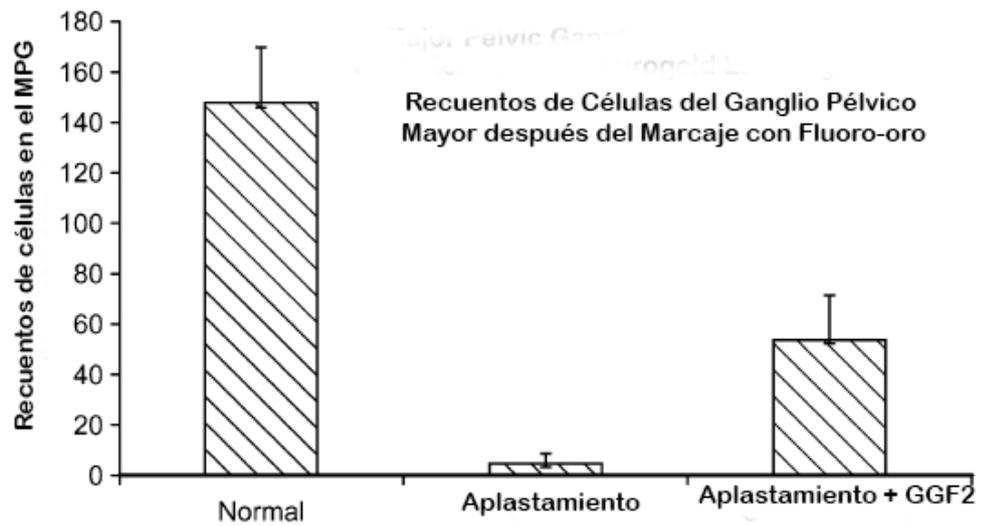


FIG. 9

FIG. 10A

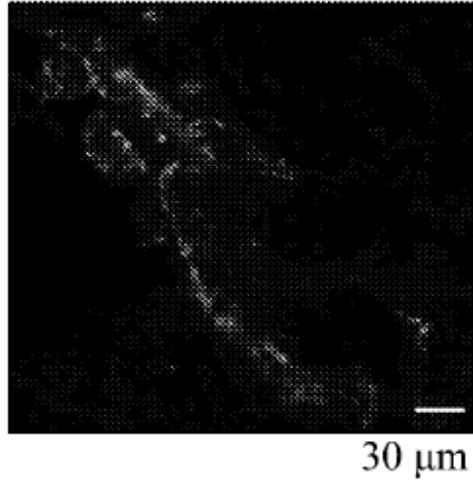


FIG. 10B

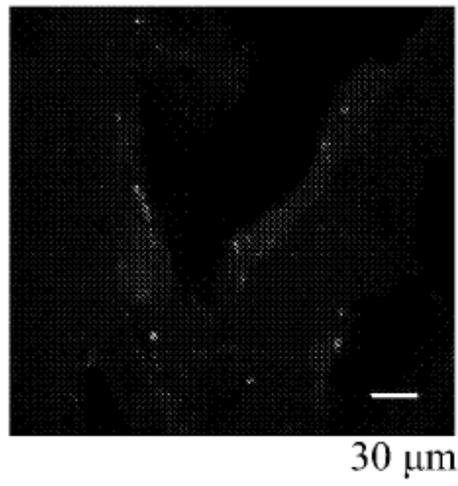
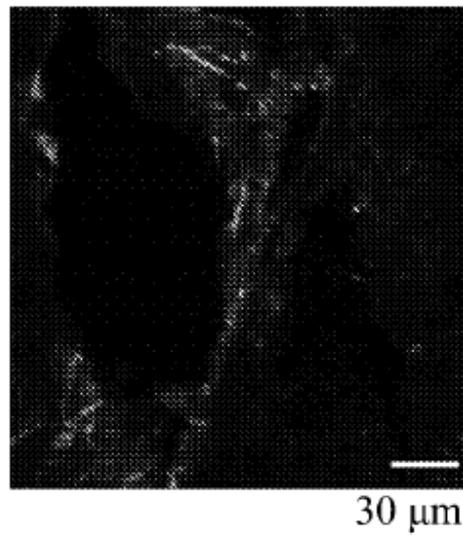


FIG. 10C



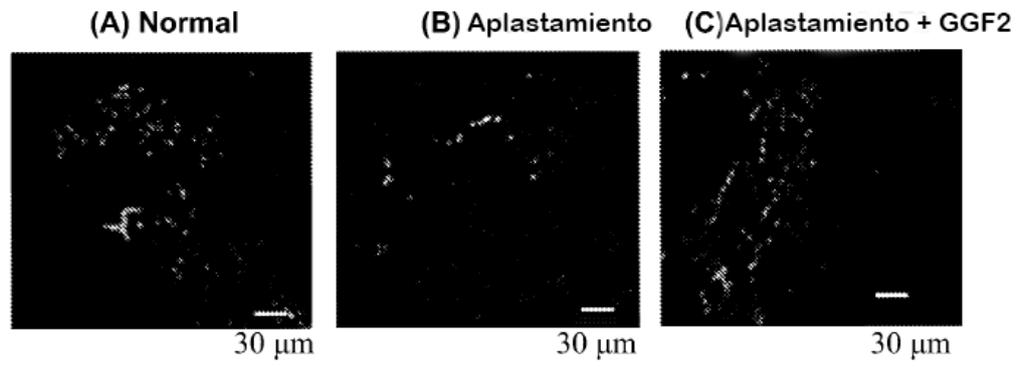


FIG. 11

FIG. 12A

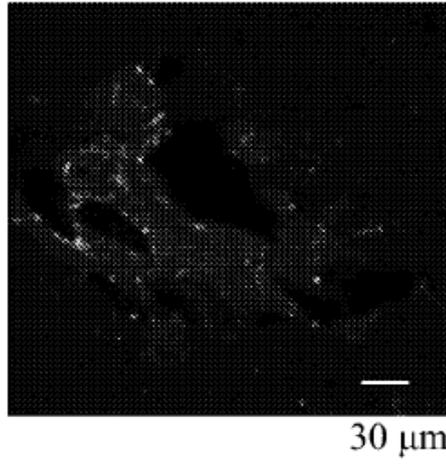


FIG. 12B

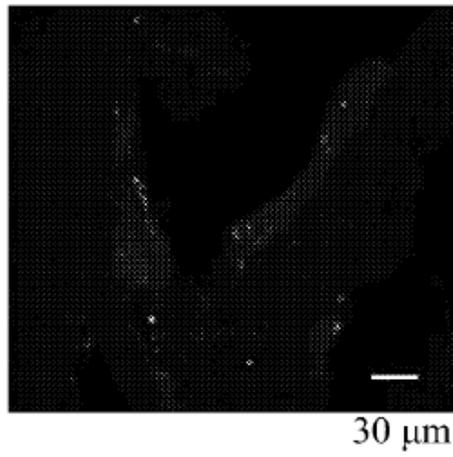
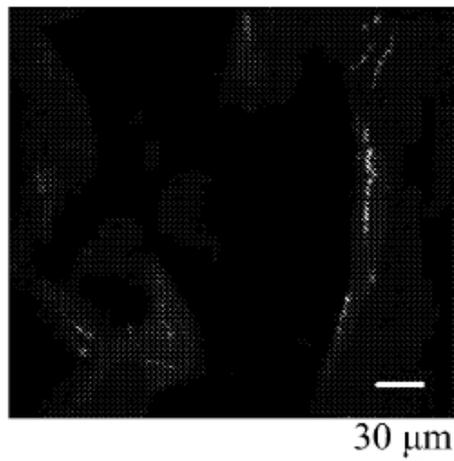


FIG. 12C



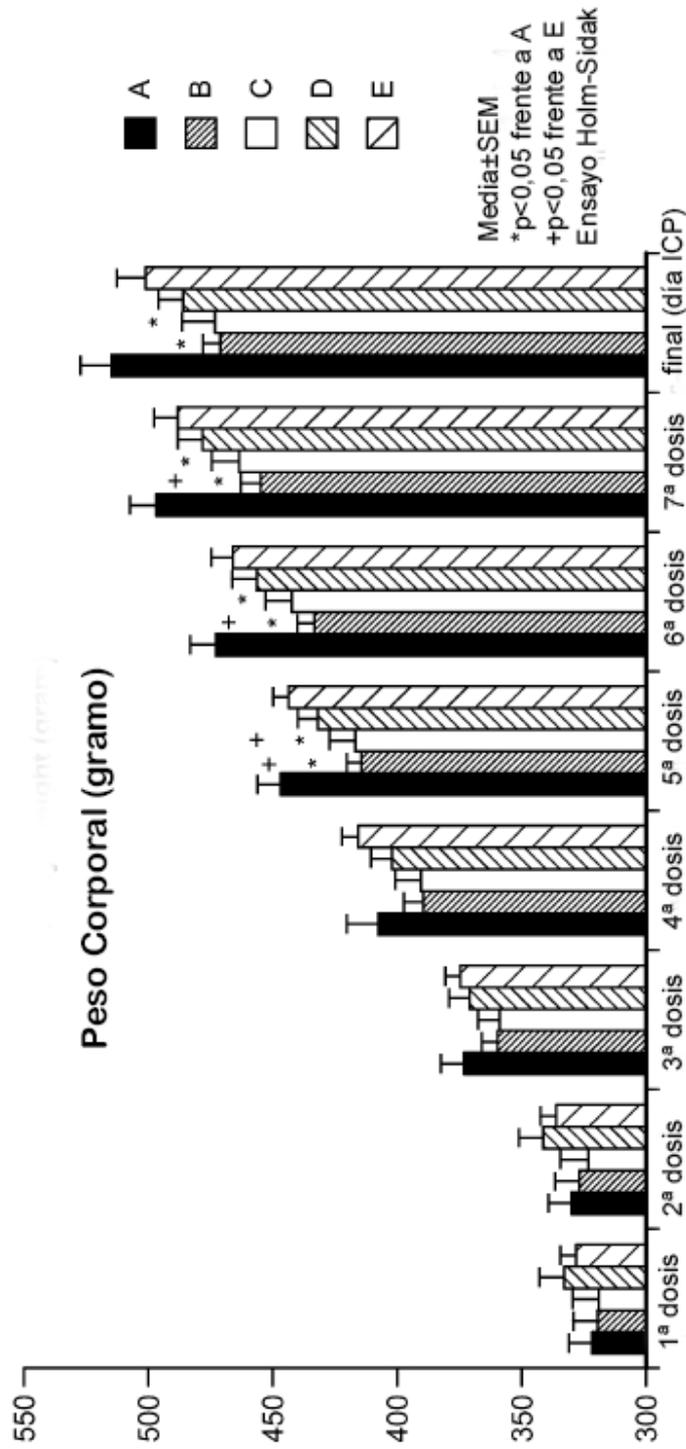


FIG. 13

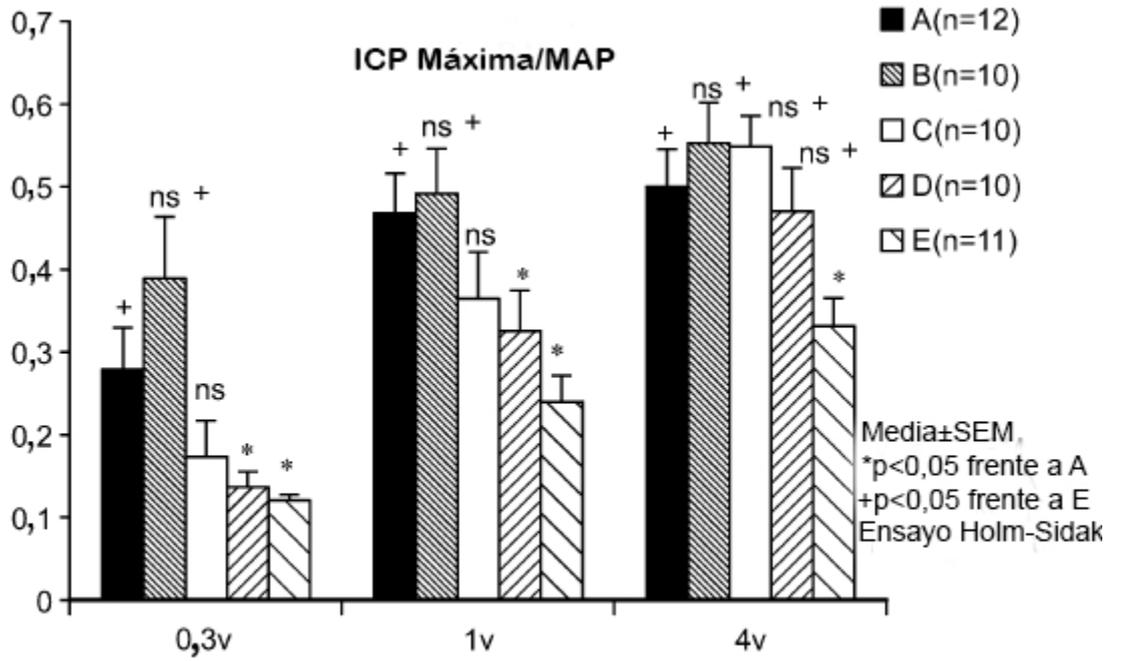


FIG. 14A

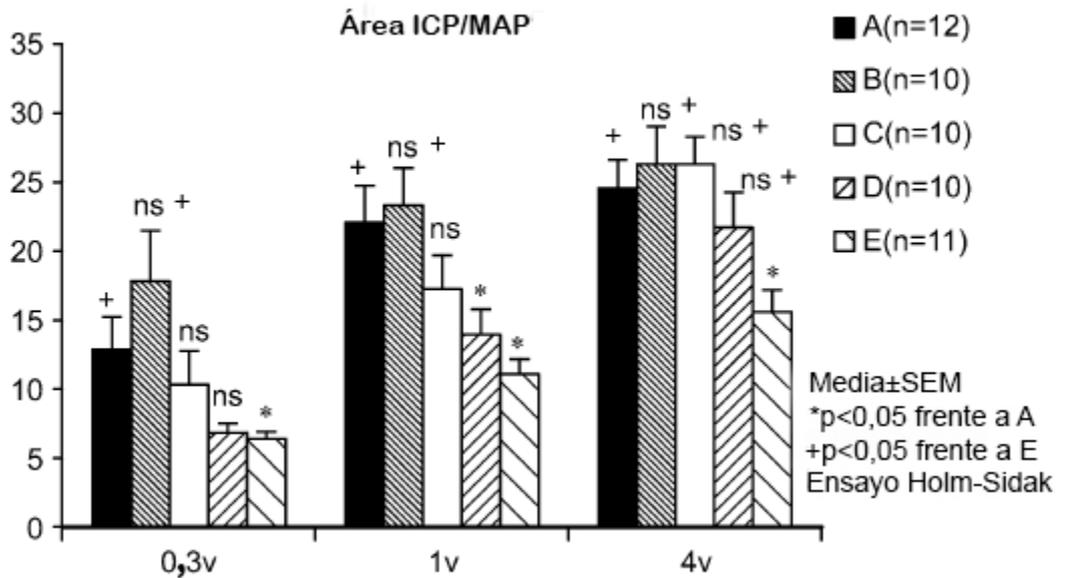


FIG. 14B

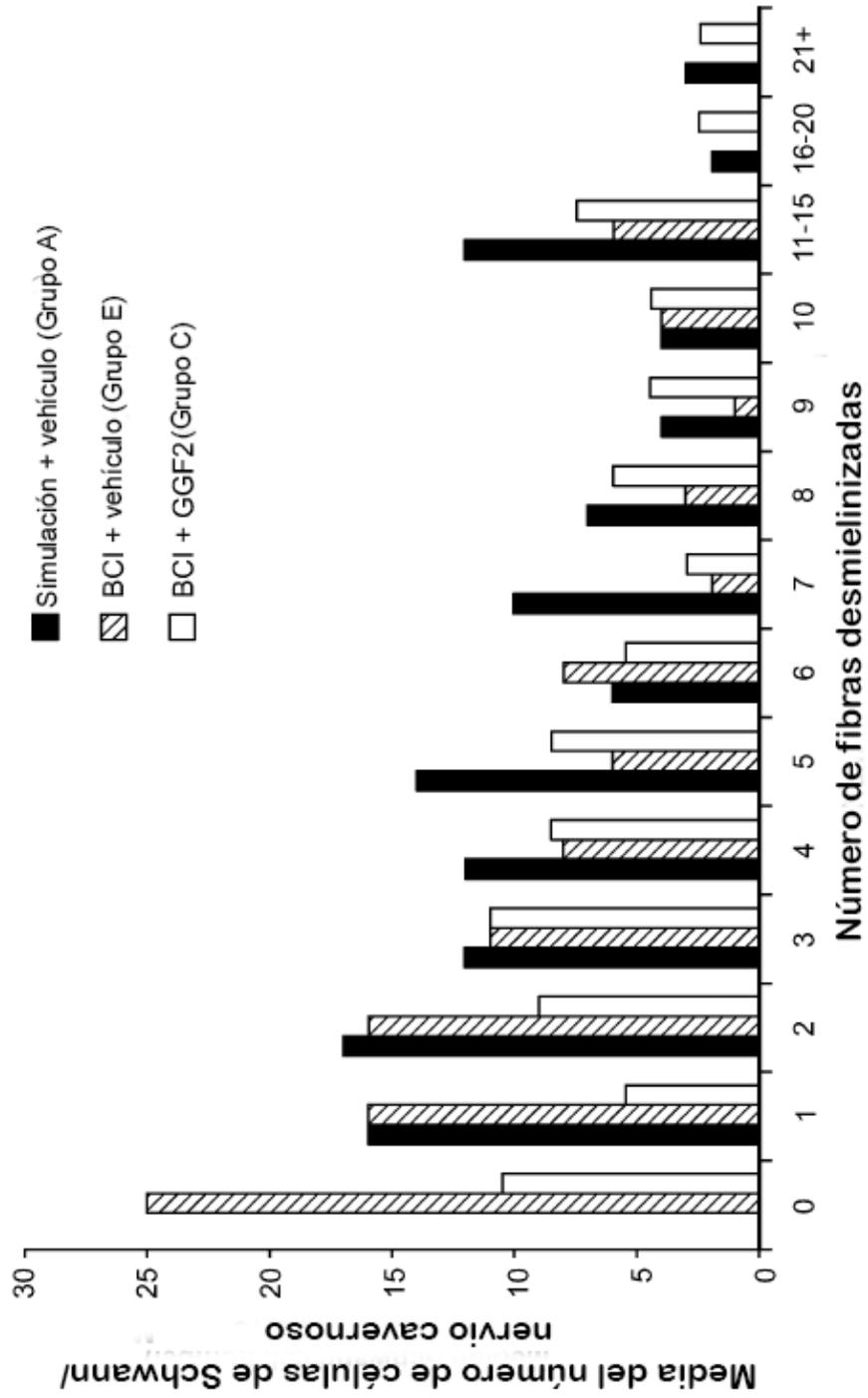


FIG. 15

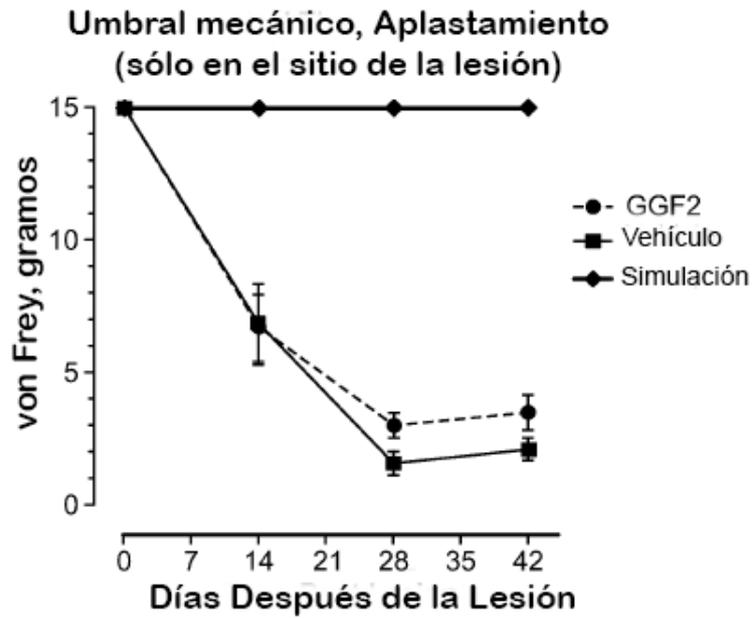


FIG. 16A

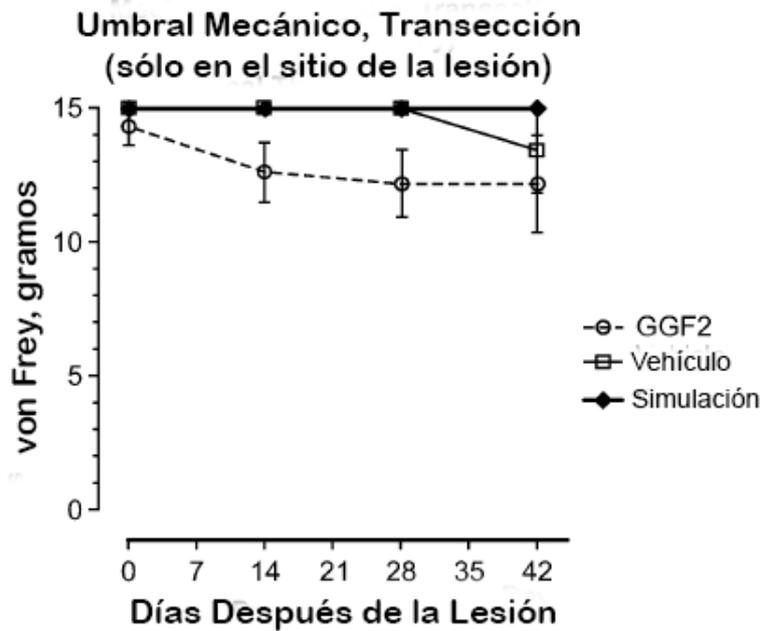


FIG. 16B

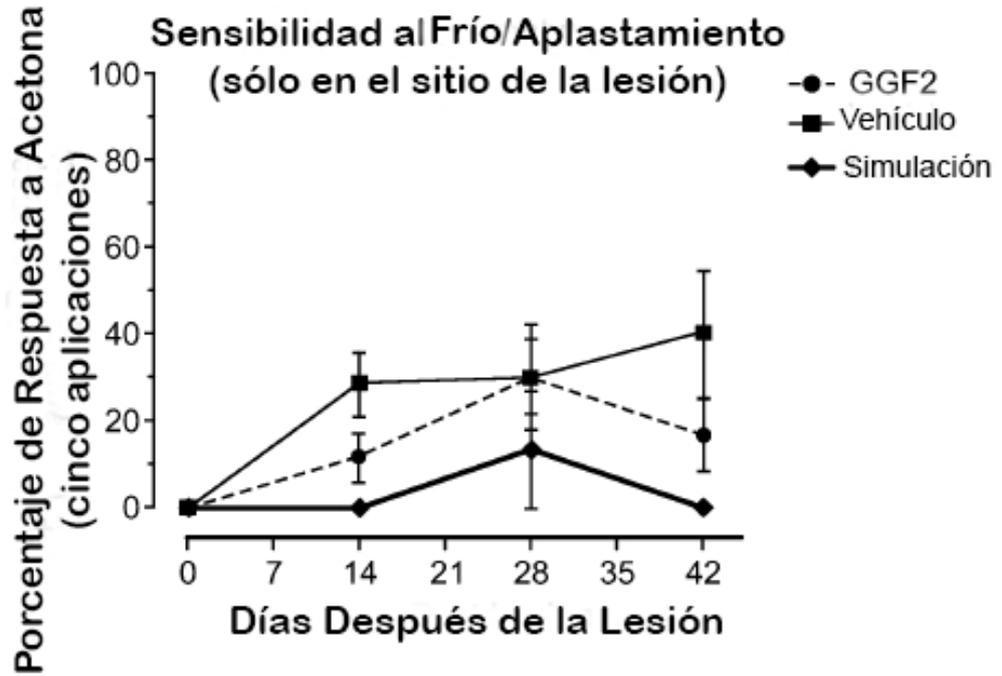


FIG. 17A

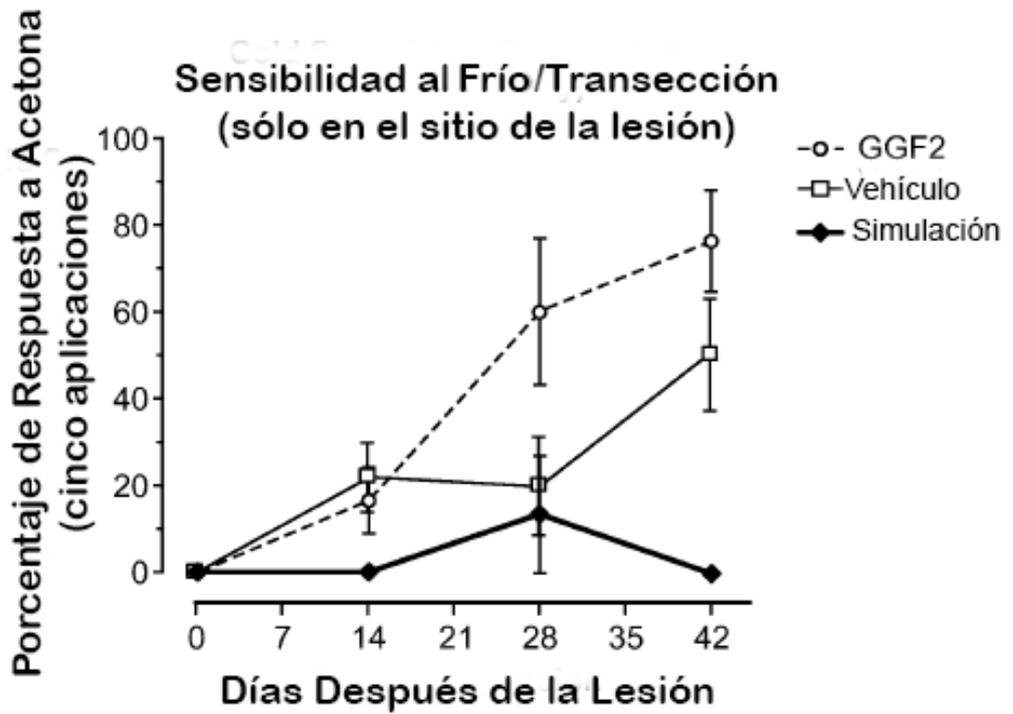


FIG. 17B