

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 617**

51 Int. Cl.:

A61M 5/00 (2006.01)

A61M 37/00 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.05.2014** **PCT/CN2014/078154**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.11.2014** **WO14187342**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.05.2014** **E 14800519 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2019** **EP 2999499**

54 Título: **Liberación prolongada de neuregulina para tratar la insuficiencia cardíaca**

30 Prioridad:

22.05.2013 US 201361826433 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.02.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

ZHOU, MINGDONG

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 743 617 T3

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

DESCRIPCIÓN

Liberación prolongada de neuregulina para tratar la insuficiencia cardíaca

Campo de la invención

- 5 La presente descripción se refiere en general a composiciones y métodos para prevenir, tratar o retrasar diversas enfermedades o trastornos cardiovasculares, especialmente la insuficiencia cardíaca por liberación prolongada de neuregulina. En particular, esta descripción se refiere a la administración de neuregulina a un mamífero por vía de infusión subcutánea con una bomba.

Antecedentes de la invención

- 10 La insuficiencia cardíaca afecta aproximadamente a cinco millones de estadounidenses, y cada año son diagnosticados con la afección más de 550.000 nuevos pacientes. La terapia farmacológica actual para la insuficiencia cardíaca se dirige principalmente a los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA), que son vasodilatadores que hacen que se dilaten los vasos sanguíneos, disminuyendo la presión sanguínea y reduciendo la carga de trabajo del corazón. Si bien la reducción porcentual de la mortalidad ha sido significativa, la reducción real de la mortalidad con los inhibidores de la ECA es por término medio solo del 3%-4% y existen varios efectos secundarios potenciales. Las limitaciones adicionales están asociadas con otras opciones para prevenir o
- 15 tratar la insuficiencia cardíaca. Por ejemplo, el trasplante de corazón es claramente más costoso e invasivo que el tratamiento farmacológico, y está más limitado por la disponibilidad de corazones de donantes. El uso de dispositivos mecánicos, tales como marcapasos biventriculares, es igualmente invasivo y costoso. Por tanto, ha habido una necesidad de nuevas terapias dadas las deficiencias en las terapias actuales.
- 20 Una nueva terapia prometedora implica la administración de neuregulina (denominada en lo sucesivo "NRG") a un paciente que padece o está en riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca. Las NRG, una familia de factores del crecimiento similares al factor de crecimiento epidérmico (FCE), comprenden una familia de factores de crecimiento y diferenciación estructuralmente relacionados que incluyen NRG1, NRG2, NRG3 y NRG4 y sus isoformas, y están implicados en una variedad de respuestas biológicas: estimulación de la diferenciación de células de cáncer de
- 25 mama y secreción de proteínas de la leche; inducción de la diferenciación de células de la cresta neural a células de Schwann; estimulación de la síntesis en células de los músculos esqueléticos de los receptores de acetilcolina; y, promoción de la supervivencia celular miocárdica y síntesis de DNA. Los estudios *in vivo* de embriones de ratón homocigotos dirigidos al gen de neuregulina con defectos graves en la formación de trabéculas ventriculares y desarrollo de ganglios de la raíz dorsal indican que la neuregulina es esencial para el desarrollo cardíaco y neural.
- 30 Las NRG se unen a la familia de receptores de FCE, que comprende RFCE, ErbB2, ErbB3 y ErbB4, cada uno de los cuales desempeña un papel importante en múltiples funciones celulares, incluyendo el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia celular. Son receptores de la proteína tirosina quinasa, que consisten en un dominio de unión a ligandos extracelular, un dominio de quinasa transmembránica y un dominio de tirosina quinasa citoplasmático. Después de que la NRG se une al dominio extracelular de ErbB3 o ErbB4, induce un cambio conformacional que
- 35 conduce a la formación de heterodímeros entre ErbB3, ErbB4 y ErbB2 o a la formación de homodímeros entre ErbB4 consigo mismo, lo que da como resultado la fosforilación del dominio C-terminal del receptor dentro de la membrana celular. El dominio intracelular fosforilado se une entonces a proteínas de señal adicionales dentro de la célula, activando la vía de señalización AKT o ERK aguas abajo correspondiente e induciendo una serie de reacciones celulares, tal como estimulación o depresión de la proliferación celular, diferenciación celular, apoptosis celular, migración celular o adhesión celular. Entre estos receptores, principalmente ErbB2 y ErbB4 se expresan en el corazón.
- 40 Se ha demostrado que los dominios similares a FCE de NRG-1, que varían de tamaño de 50 a 64 aminoácidos, son suficientes para unirse a estos receptores y activarlos. Estudios anteriores han demostrado que la neuregulina-1 β (NRG-1 β) se puede unir directamente a ErbB3 y ErbB4 con alta afinidad. El receptor huérfano, ErbB2, puede formar heterodímero con ErbB3 y ErbB4 con mayor afinidad que los homodímeros de ErbB3 o ErbB4. La investigación en el desarrollo neural ha indicado que la formación del sistema nervioso simpático requiere un sistema de señalización NRG-1 β , ErbB2 y ErbB3 intacto. La interrupción dirigida de la NRG-1 β o ErbB2 o ErbB4 condujo a la letalidad embrionaria debido a defectos en el desarrollo cardíaco. Estudios recientes también destacaron las funciones de NRG-1 β , ErbB2 y ErbB4 en el desarrollo cardiovascular, así como en el mantenimiento de la función cardíaca
- 50 normal de adultos. Se ha demostrado que la NRG-1 β mejora la organización del sarcómero en cardiomiocitos de adultos. La liberación prolongada de la NRG vía infusión intravenosa mejora o protege significativamente contra el deterioro del rendimiento del miocardio en distintos modelos animales con insuficiencia cardíaca, así como en ensayos clínicos. Estos resultados hacen que la NRG-1 sea prometedora como compuesto principal para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. Si bien la administración de la NRG a los pacientes por vía infusión intravenosa durante días consecutivos en el hospital es, hasta cierto punto, incómoda y costosa, existe la necesidad de desarrollar un método eficaz y conveniente para utilizar la NRG para la prevención, el tratamiento o el retraso de enfermedades cardiovasculares, en particular, la insuficiencia cardíaca.
- 55

Sumario de la invención

La sociedad solicitante ha descubierto que la liberación prolongada de neuregulina (NRG) por medio de una infusión intravenosa mejora enormemente el efecto de la NRG en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca en comparación con la NRG administrada por métodos de liberación no prolongada. La liberación prolongada de la NRG por medio de una infusión intravenosa también tiene la ventaja de reducir los efectos secundarios adversos de la NRG en comparación con la NRG administrada por métodos de liberación no prolongada. Esta invención proporciona además composiciones para prevenir, tratar o retrasar diversas enfermedades o trastornos cardiovasculares, especialmente la insuficiencia cardíaca, por liberación prolongada de la NRG por medio de infusión subcutánea a un mamífero, particularmente seres humanos. En particular, esta invención se refiere a composiciones para prevenir, tratar o retrasar diversas enfermedades o trastornos cardiovasculares, especialmente la insuficiencia cardíaca, por liberación prolongada de la NRG usando una mini bomba portátil para infusión subcutánea. La invención está definida por las reivindicaciones.

La sociedad solicitante ha descubierto que la NRG mejora la diferenciación de las células musculares cardíacas y la organización de la estructura del sarcómero y del citoesqueleto, así como la adhesión celular. La sociedad solicitante también ha descubierto que la NRG por medio de infusión intravenosa mejora o protege significativamente contra el deterioro del rendimiento del miocardio en distintos modelos animales de insuficiencia cardíaca y en ensayos clínicos. La neuregulina, el polipéptido de neuregulina, los derivados de neuregulina o los compuestos que imitan las actividades de las neuregulinas están dentro del alcance de la presente descripción.

Por tanto, en un primer aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para prevenir, tratar o retrasar diversas enfermedades o trastornos cardiovasculares, especialmente la insuficiencia cardíaca, que comprende proporcionar una liberación prolongada de neuregulina en un mamífero que la necesite. En una realización del método, la liberación prolongada de neuregulina en un mamífero mejora los valores de la fracción de eyección (FE) del ventrículo izquierdo del mamífero. En otra realización del método, la liberación prolongada de neuregulina en un mamífero reduce el volumen diastólico final del ventrículo izquierdo (VDFVI) o el volumen sistólico final del ventrículo izquierdo (VSFVI). En otra realización del método, la liberación prolongada de neuregulina en un mamífero mejora la distancia caminada en seis minutos y la calidad de vida. En otra realización del método, la liberación prolongada de neuregulina en un mamífero reduce los efectos secundarios. En alguna realización del método para prevenir, tratar o retrasar enfermedades o trastornos cardiovasculares en un mamífero, la liberación prolongada de neuregulina en un mamífero comprende el uso de una mini bomba. En alguna realización del método, la liberación prolongada de neuregulina en un mamífero se administra por infusión subcutánea.

En un segundo aspecto, se proporciona una composición o formulación de liberación prolongada de neuregulina para prevenir, tratar o retrasar diversas enfermedades o trastornos cardiovasculares, especialmente la insuficiencia cardíaca. En una realización, el uso de las composiciones o formulaciones de neuregulina mejora los valores de la FE del ventrículo izquierdo de un mamífero. En otra realización, el uso de las composiciones o formulaciones de neuregulina reduce el volumen diastólico final del ventrículo izquierdo (VDFVI) o el volumen sistólico final del ventrículo izquierdo (VSFVI). En otra realización, el uso de las composiciones o formulaciones de neuregulina mejora la distancia caminada en seis minutos y la calidad de vida. En otra realización, el uso de las composiciones o formulaciones de neuregulina reduce los efectos secundarios. En algunas realizaciones, la composición o formulación de liberación prolongada de neuregulina se administra por infusión subcutánea con una bomba, por ejemplo, una bomba de jeringa. En algunas realizaciones, la bomba de jeringa es una mini bomba. En realizaciones adicionales, la mini bomba es una bomba de insulina.

En un tercer aspecto, se proporciona una dosis eficaz y/o un intervalo de dosis eficaces de neuregulina de liberación prolongada para prevenir, tratar o retrasar diversas enfermedades o trastornos cardiovasculares, especialmente la insuficiencia cardíaca. En algunas realizaciones, la neuregulina se administra por infusión subcutánea. En algunas realizaciones, la dosis eficaz de neuregulina es 0,3 µg/kg. En algunas realizaciones, la dosis eficaz de neuregulina es 1,2 µg/kg. En algunas realizaciones, la dosis eficaz de neuregulina es 2,0 µg/kg. En algunas realizaciones, la dosis eficaz de neuregulina es 3,0 µg/kg. En algunas realizaciones, un intervalo de dosis eficaces de neuregulina es 0,3-3,0 µg/kg. En algunas realizaciones, un intervalo de dosis eficaces de neuregulina es 1,2-2,0 µg/kg.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un kit que comprende una composición o formulación de neuregulina y una mini bomba portátil. En algunas realizaciones, el kit comprende además instrucciones para usar el kit para prevenir, tratar o retrasar la insuficiencia cardíaca en un mamífero. En algunas realizaciones, la mini bomba portátil es una bomba de insulina.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Resultados del % de FEVI al inicio y el día 30.

Figura 2: Cambio absoluto del % de FEVI el día 30 en comparación con el valor inicial.

Figura 3: Resultados de VDFVI al inicio y el día 30.

Figura 4: Cambio absoluto de VDFVI el día 30 en comparación con el valor inicial.

Figura 5: Resultados de VSFVI al inicio y el día 30.

Figura 6: Cambio absoluto de VSFVI el día 30 en comparación con el valor inicial.

Figura 7: Resultados del aumento de distancia caminada el día 30 en comparación con el valor inicial.

Figura 8: Resultados de la disnea después de la caminata el día 30 en comparación con el valor inicial.

5 Figura 9: Resultados de la fatiga después de la caminata el día 30 en comparación con el valor inicial.

Figura 10: Cambio de la puntuación de calidad de vida el día 30 en comparación con el valor inicial.

Figura 11: Porcentaje de clasificación de la *New York Heart Association* (NYHA) al inicio y el día 30.

Descripción detallada de la invención

A. Definiciones

10 Para mayor claridad, y no a modo de limitación, la descripción detallada de la invención se divide a continuación en los sub-apartados siguientes.

Definiciones

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. 15 Todas las patentes, solicitudes, solicitudes publicadas y otras publicaciones mencionadas en esta memoria se incorporan en su totalidad como referencia. Si una definición establecida en este apartado es contraria o de alguna manera contradictoria con una definición establecida en las patentes, solicitudes, solicitudes publicadas y otras publicaciones que se incorporan en la presente memoria como referencia, la definición establecida en este apartado prevalece sobre la definición incorporada en la presente memoria como referencia.

20 Como se usa en la presente memoria, las formas singulares “un”, “uno”, “una”, “el” y “la” significan “al menos uno”, “al menos una”, “uno o más” o “una o más” a no ser que el contexto indique claramente otra cosa.

Como se usa en la presente memoria, “neuregulina” o “NRG” usada en la presente invención se refiere a proteínas o péptidos que pueden unirse a ErbB2, ErbB3, ErbB4 o sus combinaciones y activarlos, incluyendo aunque sin limitación todas las isoformas de la neuregulina, el dominio similar al FCE de neuregulina solo, polipéptidos que 25 comprenden un dominio similar al FCE de neuregulina, mutantes o derivados de neuregulina y cualquier clase de productos génicos similares a la neuregulina que también activan los receptores anteriores como se describe con detalle a continuación. La neuregulina también incluye proteínas, péptidos, fragmentos y compuestos de NRG-1, NRG-2, NRG-3 y NRG-4 que imitan las actividades de la neuregulina. La neuregulina usada en la presente invención puede activar los receptores ErbB anteriores y modular sus reacciones biológicas, por ejemplo, estimular la síntesis del receptor de acetilcolina en las células del músculo esquelético; y/o mejorar la diferenciación de los cardiocitos, la supervivencia y la síntesis de DNA. La neuregulina también incluye aquellas variantes con sustituciones conservadoras de aminoácidos que no alteran sustancialmente su actividad biológica. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos adecuadas son conocidas por los expertos en la técnica y se pueden realizar generalmente sin alterar la actividad biológica de la molécula resultante. Los expertos en la técnica reconocen que, 35 en general, las sustituciones de un solo aminoácido en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (véase, por ejemplo, Watson et al., *Molecular Biology of the Gene*, 4th Edition, 1987, The Bejacmin/Cummings Pub.co., p.224). En realizaciones preferidas, la neuregulina usada en la presente invención se une a los heterodímeros ErbB2/ErbB4 o ErbB2/ErbB3 y los activa, por ejemplo, pero no con fines de restricción, los péptidos que incluyen los residuos 177-237 de la isoforma NRG-1 β 2 que contiene la secuencia de aminoácidos: 40

SHLVKCAEKEKTFVNGGECFMVKDLNPSRYLCKCPNEFTGDRQCQNYVMASFYKAEELYQ (SEQ ID NO: 1).

Los péptidos que incluyen los residuos 177-237 de la isoforma NRG-1 β 2 comprenden el dominio similar al FCE, que se ha demostrado que es suficiente para unirse a los receptores y activarlos.

45 Como se usa en la presente memoria, “dominio similar al factor de crecimiento epidérmico” o “dominio similar al FCE” se refiere a un resto de polipéptido codificado por el gen de la neuregulina que se une a ErbB2, ErbB3, ErbB4 o sus combinaciones y los activa, y tiene una similitud estructural con el dominio de unión al receptor FCE como se ha descrito en el documento WO 00/64400, Holmes et al., *Science*, 256:1205-1210 (1992); Patentes de EE.UU. Nos. 5.530.109 y 5.716.930; Hijazi et al., *Int. J. Oncol.*, 13:1061-1067 (1998); Chang et al., *Nature*, 387:509-512 (1997); Carraway et al., *Nature*, 387:512-516 (1997); Higashiyama et al., *J. Biochem.*, 122:675-680 (1997); y WO 97/09425.

50 En ciertas realizaciones, el dominio similar al FCE se une a ErbB2/ErbB4 o heterodímeros ErbB2/ErbB3 y los activa. En ciertas realizaciones, el dominio similar al FCE comprende la secuencia de aminoácidos del dominio de unión al receptor de NRG-1. En algunas realizaciones, el dominio similar al FCE comprende la secuencia de aminoácidos

correspondiente a los residuos de aminoácidos 177-226, 177-237 o 177-240 de NRG-1 (residuos de aminoácidos 177-226 SHLVKCAEKEKTFVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCQNYVM (SEQ ID NO: 2); residuos de aminoácidos 177-240

SHLVKCAEKEKTFVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCQNYVMASFYKAEELYQKRV (SEQ ID NO: 3)), cada uno de los cuales se considera que es una neuregulina ilustrativa de la invención. En ciertas realizaciones, el dominio similar al FCE comprende la secuencia de aminoácidos del dominio de unión al receptor de NRG-2. En ciertas realizaciones, el dominio similar al FCE comprende la secuencia de aminoácidos del dominio de unión al receptor de NRG-3. En ciertas realizaciones, el dominio similar al FCE comprende la secuencia de aminoácidos del dominio de unión al receptor de NRG-4. En ciertas realizaciones, el dominio similar al FCE comprende la secuencia de aminoácidos de Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro (SEQ ID NO: 4), como se ha descrito en la patente de EE. UU. No. 5.834.229.

La proteína neuregulina se puede formular para administración oral, tópica, inhalatoria, bucal (por ejemplo, sublingual), parenteral (por ejemplo, subcutánea, intramuscular, intradérmica o intravenosa), transdérmica o cualquier otra vía de administración adecuada. La vía más adecuada en cualquier caso dependerá de la naturaleza y gravedad de la afección que se ha de tratar y de la naturaleza de la proteína neuregulina particular que se está usando. La proteína neuregulina se puede administrar sola. Alternativa y preferiblemente, la proteína neuregulina se administra conjuntamente con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. En el presente método se puede usar cualquier vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado (véase, por ejemplo, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Alfonso R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company, April 1997; y *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th ed., Gennaro, ed., Mack Publishing Co. (1990)).

Como se usa en la presente memoria, una "bomba" es un dispositivo suministrador de fármacos que emplea infusiones subcutáneas de fluidos terapéuticos, fármacos, proteínas y/u otros compuestos y tiene la propiedad de una dosificación del medicamento precisa y continua durante su suministro. Una bomba puede emplear un catéter subcutáneo para infusión subcutánea continua. El catéter puede ser externo o el puerto del catéter puede estar incrustado en el mecanismo de la bomba. Una mini bomba es un dispositivo que puede exportar fluidos con precisión y es portátil y manejable. Como ejemplo, una bomba de insulina es un dispositivo médico utilizado para la administración de insulina u otros agentes en el tratamiento de la diabetes mellitus u otras enfermedades, también conocida como terapia de infusión subcutánea continua de insulina. Una bomba de insulina se puede configurar para ser conectada a un tubo de plástico delgado desechable o un catéter a través del cual la insulina u otra sustancia farmacológica pasa al tejido. El catéter se puede insertar subcutáneamente y cambiarse según sea necesario. Una bomba se puede configurar en dispositivos externos, que se conectan a un paciente, y se puede configurar en dispositivos implantables, que se implantan dentro del cuerpo de un paciente. Las bombas externas pueden incluir dispositivos diseñados para uso en una localización estacionaria, tal como un hospital, una clínica o similares, y además pueden incluir dispositivos diseñados para uso ambulatorio o portátil, tal como bombas diseñadas para ser transportadas por un paciente, o similares. Las bombas externas contienen depósitos de medios fluidos, tales como, aunque sin limitación, medios fluidos que contienen la proteína neuregulina.

Las bombas externas se pueden conectar en una comunicación de flujo de fluido a un paciente, por ejemplo, a través de tubos huecos adecuados. El tubo hueco se puede conectar a una aguja hueca que está diseñada para perforar la piel del paciente y administrar medios fluidos a través de ella. Alternativamente, el tubo hueco se puede conectar directamente al paciente a través de una cánula o similar. Una bomba externa se puede poner o sujetar de otro modo sobre o debajo de la ropa del paciente. Los ejemplos de bombas adecuadas incluyen, aunque sin limitación, bomba de insulina MiniMed Paradigm 522, bomba de insulina MiniMed Paradigm 722, bomba de insulina MiniMed Paradigm 515, bomba de insulina MiniMed Paradigm 715, bomba de insulina MiniMed Paradigm 512R, bomba de insulina MiniMed Paradigm 712R, bomba de insulina MiniMed 508, bomba de insulina MiniMed 508R (Medtronic; Northridge, CA) y cualquier dispositivo similar conocido por los expertos en la técnica.

Ejemplos de dispositivos suministradores de tipo bomba externa están descritos en la solicitud de patente de EE. UU. No. de Ser. 11/211.095, presentada el 23 de agosto de 2005, publicada como US2006/0264894 y concedida como Patente de EE.UU. No. 7.686.787, titulada "Infusion Device And Method With Disposable Portion" y la solicitud PCT publicada WO 01/70307 (PCT/US01/09139) titulada "Exchangeable Electronic Cards For Infusion Devices" y la solicitud PCT publicada WO 04/030716 (PCT/US2003/028769) titulada "Components And Methods For Patient Infusion Device" y la solicitud PCT publicada WO 04/030717 (PCT/US2003/029019) titulada "Dispenser Components And Methods For Infusion Device" y la publicación de solicitud de patente de EE. UU. No. 2005/0065760 titulada "Method For Advising Patients Concerning Doses Of Insulin" y la patente de EE.UU. No. 6.589.229 titulada "Wearable Self-Contained Drug Infusion Device".

Las composiciones y métodos farmacéuticamente aceptables para su administración que se pueden emplear para uso en esta invención incluyen, aunque sin limitación, los descritos en las Patentes de EE.UU. No. 5.736.154; 6.197.801; 5.741.511; 5.886.039; 5.941.868; 6.258.374; y 5.686.102.

Debe observarse que una persona experta en la técnica, tal como un médico responsable, sabría cómo y cuándo terminar, interrumpir o ajustar la terapia para reducir la dosificación debido a la toxicidad o a los efectos adversos. Por el contrario, el médico también sabría cómo y cuándo ajustar el tratamiento a mayores niveles si la respuesta clínica no es adecuada (excluyendo los efectos secundarios tóxicos).

En la práctica, la proteína neuregulina, sola o en combinación con otros agentes, se puede combinar como ingrediente activo en una mezcla íntima con un vehículo o excipiente farmacéutico, tal como beta-ciclodextrina y/o 2-hidroxi-propil-beta-ciclodextrina, de acuerdo con las técnicas convencionales de formulación farmacéutica. El vehículo puede tomar una amplia forma de preparación deseada para administración, tópica o parenteral. Al preparar composiciones para la forma de dosificación parenteral, tal como inyección o infusión intravenosa, se pueden emplear medios farmacéuticos similares, incluyendo, aunque sin limitación, agua, glicoles, aceites, tampones, azúcar, conservantes, liposomas, agentes estabilizantes y similares, conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos de dichas composiciones parenterales incluyen, aunque sin limitación, dextrosa al 5% p/v, solución salina normal u otras soluciones. Los tampones ilustrativos incluyen, aunque sin limitación, acetato, citrato y fosfato. Los agentes estabilizantes ilustrativos incluyen, aunque sin limitación, proteínas, tales como albúmina, por ejemplo, seroalbúmina humana, gelatina y similares. Los azúcares ilustrativos incluyen, aunque sin limitación, glucosa (dextrosa), sacarosa, fructosa, manitol, sorbitol y similares. Las sales ilustrativas incluyen, aunque sin limitación, bicarbonato de potasio, bicarbonato de sodio, cloruro de potasio, cloruro de sodio y similares. Los componentes ilustrativos de una composición farmacéutica han sido descritos, por ejemplo, por Remington, *supra*, 1997, y Remington's, *supra*, 1990. La dosis total de la proteína neuregulina, sola o en combinación con otros agentes que se ha administrar, se puede administrar en un vial de fluido intravenoso, que varíe desde aproximadamente 1 mL hasta 2000 mL.

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

Como se usa en la presente memoria, "proteína" es sinónimo de "polipéptido" o "péptido" a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

Como se usa en la presente memoria, "unidad de actividad" o "UE" o "U" significa la cantidad de producto estándar que puede inducir una reacción máxima del 50%. En otras palabras, para determinar la unidad de actividad para un agente activo dado, se debe medir la CE50. Por ejemplo, si la CE50 para un lote de producto era 0,1 µg, entonces esa sería una unidad. Además, si se está utilizando 1 µg de ese producto, entonces se están utilizando 10 UE (1/0,1). La CE50 se puede determinar por cualquier método conocido en la técnica adecuado para realizar dicha determinación, incluido el método empleado por los inventores que se describe en la presente memoria. Esta determinación de la unidad de actividad es importante para el control de calidad de productos modificados genéticamente y los fármacos utilizados clínicamente, y permite que productos de diferentes compañías farmacéuticas y/o diferentes números de lote sean cuantificados con criterios uniformes.

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

Brevemente, el ensayo, denominado ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas por activación del receptor de quinasa (KIRA-ELISA), consiste en dos placas de microtitulación separadas, una para el cultivo celular, estimulación de ligandos y lisis celular/solubilización del receptor y la otra placa para captura de receptores y ELISA con fosfotirosina. El ensayo se desarrolló para el análisis de la activación de ErbB2 inducida por NRG y utiliza la estimulación del receptor intacto sobre la línea celular de carcinoma de mama adherente, MCF-7. Las proteínas de membrana se solubilizan por medio de lisis con Triton X-100 y el receptor se captura en pocillos ELISA recubiertos con anticuerpos específicos de ErbB2 sin reacción cruzada con ErbB3 o ErbB4. El grado de fosforilación del receptor se cuantifica luego por ELISA con antifosfotirosina. Se genera una curva patrón reproducible con una CE50 de aproximadamente 360 pM para la heregulina beta 1 (177-244) (residuos de aminoácidos 177-244 SHLVKCAEKEKTFVNGGECFMVKDLSNPSRYLC KCPNEFTGDRCQNYVMASFYKAEELYQKRVLTIT (SEQ ID N°: 5). Cuando se analizan muestras idénticas de HRG beta 1 (177-244) tanto por el análisis KIRA-ELISA como por la transferencia de Western con antifosfotirosina cuantitativa, los resultados se correlacionan muy estrechamente entre sí. El ensayo descrito en este informe es capaz de cuantificar específicamente la fosforilación de tirosina de ErbB2 que resulta de la interacción de HRG con ErbB3 y/o ErbB4.

Dado que la mayoría de los medicamentos modificados genéticamente son proteínas y polipéptidos, su actividad se puede determinar por sus secuencias de aminoácidos o el centro de actividad formado por su estructura espacial. El título de actividad de proteínas y polipéptidos no es coherente con su calidad absoluta, por tanto, no se puede determinar con la unidad en peso como la de los fármacos químicos. Sin embargo, la actividad biológica de los medicamentos modificados genéticamente es generalmente coherente con su farmacodinámica, y un sistema de determinación de títulos establecido por medio de una actividad biológica dada puede determinar su unidad de titulación. Por tanto, la determinación de la actividad biológica puede ser parte de un proceso de titulación de la sustancia con actividad biológica y es un componente importante del control de calidad de un producto modificado genéticamente. Es importante determinar los criterios de actividad biológica para el control de calidad de productos modificados genéticamente y fármacos utilizados clínicamente.

La cantidad de producto estándar que puede inducir una reacción máxima del 50% se define como una unidad de

actividad (1 UE). Por consiguiente, el producto de diferentes compañías farmacéuticas y de diferentes números de lote se puede cuantificar con criterios uniformes.

5 Como se usa en la presente memoria, una "dosis eficaz" de un agente activo para prevenir, tratar o retrasar una enfermedad particular es una dosis que es suficiente para mejorar, o de alguna manera reducir, los síntomas asociados con la enfermedad. La dosis puede curar la enfermedad, pero se administra típicamente con el fin de mejorar los síntomas de la enfermedad.

10 En realizaciones particulares, una dosis eficaz de neuregulina puede ser al menos 0,2 µg/kg/día, 0,3 µg/kg/día, 0,4 µg/kg/día, 0,5 µg/kg/día, 0,6 µg/kg/día, 0,7 µg/kg/día, 0,8 µg/kg/día, 0,9 µg/kg/día, 1,0 µg/kg/día, 1,1 µg/kg/día, 1,2 µg/kg/día, 1,3 µg/kg/día, 1,4 µg/kg/día, 1,5 µg/kg/día, 1,6 µg/kg/día, 1,7 µg/kg/día, 1,8 µg/kg/día, 1,9 µg/kg/día, 2,0 µg/kg/día, 2,1 µg/kg/día, 2,2 µg/kg/día, 2,3 µg/kg/día, 2,4 µg/kg/día, 2,5 µg/kg/día, 2,6 µg/kg/día, 2,7 µg/kg/día, 2,8 µg/kg/día, 2,9 µg/kg/día o 3,0 µg/kg/día. En una realización, una dosis eficaz de neuregulina es 1,2 µg/kg/día. En otra realización, una dosis eficaz de neuregulina es 2,0 µg/kg/día. En una realización, una dosis eficaz de neuregulina es 3,0 µg/kg. En una realización, un intervalo de dosis eficaces de neuregulina es 0,3-3,0 µg/kg/día. En una realización, un intervalo de dosis eficaces de neuregulina es 1,2-2,0 µg/kg/día,

15 Como se usa en la presente memoria, "agente activo" significa cualquier sustancia destinada al diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento o prevención de enfermedades en seres humanos y otros animales, o si no a la mejora del bienestar físico y mental.

20 Como se usa en la presente memoria, la "mejora" de los síntomas de un trastorno particular por administración de un agente activo particular se refiere a cualquier disminución, ya sea permanente o temporal, duradera o transitoria, que se puede atribuir o asociar con la administración del agente.

25 Como se usa en la presente memoria, "tratar", "tratamiento" y "tratando" se refieren a cualquier manera en la que los síntomas de una afección, trastorno o enfermedad se mejoran o alteran de otro modo de manera beneficiosa. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente una enfermedad o sus síntomas y/o el efecto puede ser terapéutico en términos de una reducción parcial o completa de un signo o síntoma asociado a una enfermedad, cura de una enfermedad y/o reducción de un efecto adverso atribuible a la enfermedad. El tratamiento también abarca cualquier uso farmacéutico de las composiciones de la presente invención.

30 Como se usa en la presente memoria, "insuficiencia cardíaca" significa una anomalía de la función cardíaca en la que el corazón no bombea sangre a la velocidad necesaria para los requisitos de metabolización de los tejidos. La insuficiencia cardíaca incluye una amplia gama de estados morbosos, tales como insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio, taquiarritmia, miocardiopatía hipertrofica familiar, cardiopatía isquémica, miocardiopatía dilatada idiopática, miocarditis y similares. La insuficiencia cardíaca puede ser causada por varios factores, que incluyen, sin limitación, formas isquémicas, congénitas, reumáticas, virales, tóxicas o idiopáticas. La hipertrofia cardíaca crónica es un estado significativamente morbooso que es un precursor de la insuficiencia cardíaca congestiva y del paro cardíaco.

35 Como se usa en la presente memoria, "fracción de eyección" o "FE" significa la porción de sangre que se bombea desde un ventrículo lleno como resultado de un latido. Se puede definir por la siguiente fórmula: (volumen diastólico del VI-volumen sistólico del VI)/volumen diastólico del VI.

40 La presente invención proporciona métodos y composiciones para la liberación prolongada de neuregulina para prevenir, tratar o retrasar diversas enfermedades o trastornos cardiovasculares, tales como la insuficiencia cardíaca. La liberación prolongada de neuregulina permite la simplificación del esquema de administración, mejora la eficacia clínica y atenúa los episodios adversos, por ejemplo, relacionados con el alto nivel de neuregulina en la sangre. Se considera que la liberación prolongada de neuregulina durante un cierto período de tiempo podría inducir o mantener la expresión de ciertos genes para el crecimiento y/o diferenciación de los cardiomiocitos, la remodelación de las estructuras del sarcómero y del citoesqueleto de las células musculares, o las adherencias célula-célula.

45 La liberación prolongada de neuregulina proporciona un nivel terapéutico continuo de neuregulina durante un período de tiempo. En algunas realizaciones, la neuregulina se libera durante un período de 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 11 horas, 12 horas, 13 horas, 14 horas, 15 horas, 16 horas, 17 horas, 18 horas, 19 horas, 20 horas, 21 horas, 22 horas, 23 horas, 24 horas o más. En algunas realizaciones, la neuregulina se libera durante un período de 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 15 días, 16 días, 17 días, 18 días, 19 días, 20 días, 21 días, 22 días, 23 días, 24 días, 25 días, 26 días, 27 días, 28 días, 29 días, 30 días, o más. En otra realización, la neuregulina se libera durante un período de 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas o más. La administración puede ocurrir opcionalmente durante horas consecutivas o en días o semanas consecutivos, si se desea. En otra realización, la neuregulina se libera durante un período de 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses o más. En otra realización, la neuregulina se libera durante un período de 1 año, 2 años, 3 años, 4 años, 5 años o más. En algunas realizaciones, la neuregulina se libera durante un período entre 1 hora y 2 semanas, entre 2 horas y 2 semanas, entre 4 horas y 24 horas, entre 4 días y 10 días. La cantidad de tiempo durante el cual se libera neuregulina puede depender de varios factores, tales

como la tecnología de liberación prolongada o las tecnologías utilizadas.

La neuregulina se puede administrar también en un programa de dosificación o "ciclo terapéutico". La dosificación diaria de neuregulina en el ciclo terapéutico se describe en detalle a continuación. El ciclo terapéutico puede durar 2 días, 5 días, 7 días, 10 días, dos semanas, 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1 año o más. En general, el intervalo de dosis diaria recomendada de neuregulina por kilogramo de peso de los pacientes en los métodos de la invención para las condiciones descritas en la presente invención está dentro del intervalo de aproximadamente 0,001 μg a aproximadamente 1000 mg por día. Especialmente, un intervalo de dosis diaria total por kilogramo de peso de los pacientes debe estar entre 0,001 μg por día y 15 mg por día, 0,005 μg por día y 10 mg por día, 0,01 μg por día y 5 mg por día, 0,1 μg por día y 1 mg por día, 0,5 μg por día y 100 μg por día, 1 μg por día y 10 μg por día, 1,2 μg por día y 2,4 μg por día, 1,2 μg por día y 2,2 μg por día, o 1,2 μg por día y 2,0 μg por día. En la gestión del paciente, la terapia puede ser iniciada con una dosis más baja, quizás de aproximadamente 0,1 μg a aproximadamente 0,3 μg , y ser aumentada, si es necesario, hasta aproximadamente 1 μg a 1000 μg por día, bien sea como una dosis única o dosis divididas, dependiendo de la respuesta global del paciente. Puede ser necesario en algunos casos usar dosificaciones del ingrediente activo fuera de los intervalos descritos en la presente memoria, como será evidente para los expertos en la técnica.

En ciertas realizaciones, la neuregulina se administra diariamente cada día del ciclo terapéutico. En ciertas realizaciones, la neuregulina se administra consecutivamente durante 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 2 semanas, 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1 año o más. En ciertas realizaciones, la neuregulina se administra a los pacientes durante un régimen de inducción. En algunas realizaciones optimizadas, el régimen de inducción incluye una administración de neuregulina durante al menos 3, 5, 7, 10 o 15 días consecutivos. En algunas realizaciones optimizadas, el régimen de inducción incluye la administración de neuregulina al menos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24 horas consecutivas cada día. En algunas realizaciones optimizadas, la neuregulina se administra a los pacientes durante un régimen de mantenimiento durante al menos 3 meses, 6 meses, 12 meses, 1 año, 5 años o incluso más después del régimen de inducción. Se entiende que se pueden usar otros períodos de tiempo descritos en la presente memoria para un régimen de inducción o mantenimiento.

En una realización, la invención proporciona un método para prevenir, tratar o retrasar una enfermedad o trastorno cardiovascular en un mamífero, comprendiendo el método la liberación subcutánea prolongada de neuregulina en un mamífero en una cantidad de 0,3 $\mu\text{g/kg/día}$ a 3,0 $\mu\text{g/kg/día}$, donde la liberación subcutánea prolongada de neuregulina en un mamífero se consigue por el uso de una bomba. La liberación prolongada de neuregulina puede ser proporcionada administrando neuregulina de una formulación de liberación prolongada, tal como una formulación adecuada para administración por el uso de una bomba. En otra realización, la invención proporciona un método para prevenir, tratar o retrasar una enfermedad o trastorno cardiovascular en un mamífero, comprendiendo el método administrar subcutáneamente una liberación prolongada de neuregulina a un mamífero en una cantidad de 0,3 $\mu\text{g/kg/día}$ a 3,0 $\mu\text{g/kg/día}$, en donde la liberación subcutánea prolongada de neuregulina en un mamífero se consigue por el uso de una bomba.

En una realización particular de un método de la invención, la enfermedad o trastorno que se trata con neuregulina es la insuficiencia cardíaca, por ejemplo, en un mamífero tal como un ser humano. En otra realización, la liberación subcutánea prolongada de neuregulina en un mamífero se consigue por el uso de una bomba de jeringa. La bomba de jeringa puede ser, por ejemplo, una mini bomba tal como una bomba de insulina.

En otra realización de un método de la invención, la neuregulina se puede emplear en una cantidad de 1,2 $\mu\text{g/kg/día}$ a 2,0 $\mu\text{g/kg/día}$, u otras cantidades descritas en la presente memoria. En una realización particular, la cantidad de neuregulina es 1,2 $\mu\text{g/kg/día}$. En otra realización particular, la cantidad de neuregulina es 2,0 $\mu\text{g/kg/día}$. En otra realización particular, la cantidad de neuregulina es de 6 UE/kg/día a 60 UE/kg/día. En otra realización, la cantidad de neuregulina es de 24 UE/kg/día a 40 UE/kg/día. En otra realización, la cantidad de neuregulina es 24 UE/kg/día. En otra realización, la cantidad de neuregulina es 40 EU/kg/día.

Todavía en otra realización de un método de la invención, la neuregulina se puede administrar al mamífero durante un régimen de inducción. En una realización, el régimen de inducción incluye una administración de neuregulina durante al menos 3, 5, 7, 10 o 15 días consecutivos. Se entiende que se puede usar otro número de días de administración, si se desea, como se describe en la presente memoria. En otra realización, la neuregulina se puede administrar durante al menos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24 horas consecutivas cada día. Se entiende que se puede usar otro número de horas de administración, si se desea, como se describe en la presente memoria.

En otra realización, la neuregulina se administra a los pacientes durante un régimen de mantenimiento después del régimen de inducción. En una realización, el régimen de mantenimiento puede incluir una administración de neuregulina durante al menos 3 meses, 6 meses, 12 meses, 5 años o incluso más después del régimen de inducción. En otra realización, el régimen de mantenimiento incluye una repetición del régimen de inducción cada 3 meses, 6 meses o 12 meses.

Todavía en otra realización, la liberación prolongada de neuregulina en un mamífero mejora el valor de la fracción de eyección (FE) del mamífero. La fracción de eyección (FE) representa la fracción volumétrica de sangre bombeada desde los ventrículos izquierdo y derecho con cada latido o ciclo cardíaco. Los métodos para medir la fracción de

eyección son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Incluso en otra realización, la liberación prolongada de neuregulina en un mamífero reduce el volumen diastólico final del ventrículo izquierdo (VDFVI) del mamífero. Como es bien conocido en la técnica, el volumen diastólico final (VDF) es el volumen de sangre en el ventrículo derecho y/o izquierdo en la carga o llenado final (diástole). En otra realización, la liberación prolongada de neuregulina en un mamífero reduce el volumen sistólico final del ventrículo izquierdo (VSFVI) del mamífero. Como es bien conocido en la técnica, el volumen sistólico final (VSF) es el volumen de sangre en un ventrículo al final de la contracción, o sístole, y el comienzo del llenado o diástole. Los expertos en la técnica conocen bien los métodos para medir el VDFVI y/o el VSFVI.

Todavía en otra realización de un método de la invención, la liberación prolongada de neuregulina en un mamífero mejora la distancia caminada en 6 minutos (DC6M) del mamífero. Todavía en otra realización, la liberación prolongada de neuregulina en un mamífero mejora la calidad de vida del mamífero. La eficacia de la neuregulina para mejorar las mediciones de la enfermedad cardíaca y/o los mejores resultados del paciente se describen en los Ejemplos de la presente memoria.

La invención proporciona además un kit para prevenir, tratar o retrasar una enfermedad o trastorno cardiovascular en un mamífero, comprendiendo el kit una composición o formulación de neuregulina y una bomba. El kit se puede usar, por ejemplo, para tratar un paciente que tiene una enfermedad o trastorno que es la insuficiencia cardíaca. El paciente puede ser un mamífero, tal como un ser humano. En una realización del kit, la bomba puede ser una bomba de jeringa. En una realización particular, la bomba puede ser una mini bomba. En otra realización particular, la bomba puede ser una bomba de insulina.

Las características de un paciente que tiene una enfermedad o trastorno, tal como una enfermedad cardíaca o insuficiencia cardíaca son muy conocidas por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, *Cecil Textbook of Medicine*, 20th ed., Bennett and Plum, eds., W.B. Saunders Company, Filadelfia (1996)); *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 14th ed., Fauci et al., Eds., McGraw-Hill, San Francisco (1998)). Un experto en la técnica, tal como un médico, puede determinar fácilmente si un paciente tiene una enfermedad o trastorno adecuado para tratamiento con los métodos de la invención que proporcionan una liberación prolongada de neuregulina.

Es muy conocido en la técnica que una insuficiencia cardíaca de un paciente se puede clasificar de acuerdo con la gravedad de sus síntomas. El sistema de clasificación más utilizado es la clasificación funcional de la New York Heart Association (NYHA). Distribuye los pacientes en una de cuatro categorías basadas en cuanta es su limitación durante la actividad física, de la siguiente manera: Clase I: pacientes con enfermedad cardíaca pero que no les produce limitación de la actividad física. La actividad física ordinaria no causa fatiga excesiva, palpitaciones, disnea ni dolor anginoso; Clase II: pacientes con enfermedad cardíaca que les produce una ligera limitación de la actividad física. Se sienten cómodos en reposo. La actividad física ordinaria da como resultado fatiga, palpitaciones, disnea o dolor anginoso; Clase III: pacientes con enfermedad cardíaca que les produce una marcada limitación de la actividad física. Se sienten cómodos en reposo. Una actividad inferior a la normal les causa fatiga, palpitaciones, disnea o dolor anginoso; Clase IV: pacientes con enfermedad cardíaca que produce incapacidad para realizar cualquier actividad física sin malestar. Los síntomas de insuficiencia cardíaca o el síndrome anginoso pueden estar presentes incluso en reposo. Si se realiza cualquier actividad física, aumenta el malestar. En algunas realizaciones, todos los pacientes clasificados por la NYHA (Clase I-Clase IV) son adecuados para los métodos de la invención. En algunas realizaciones preferidas, los pacientes clasificados en la Clase II y/o Clase III según la NYHA son adecuados para los métodos de la invención.

En ciertas realizaciones, en un ciclo terapéutico la neuregulina se administra el día 1 del ciclo y el ciclo concluye con uno o más días sin administración de neuregulina. En algunas realizaciones, la neuregulina se administra diariamente durante 3, 5, 7, 10 o 15 días seguido de un período de descanso en un ciclo terapéutico.

Se entiende que las modificaciones que no afectan sustancialmente a la actividad de las diversas realizaciones de esta invención también se proporcionan dentro de la definición de la invención proporcionada en la presente memoria. Por consiguiente, los siguientes ejemplos pretenden ilustrar, pero no limitar la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1: Estudio aleatorizado, paralelo, doble ciego, multicéntrico y controlado con placebo para evaluar la eficacia y seguridad de la neuregulina humana recombinante I en sujetos con insuficiencia cardíaca crónica estable.

1. Introducción: Para evaluar la eficacia y seguridad de la neuregulina-I humana recombinante por infusión subcutánea en la insuficiencia cardíaca crónica, se realizó un estudio de fase II, aleatorizado, paralelo, doble ciego y controlado con placebo en múltiples centros clínicos en EE.UU. Se inscribieron un total de 67 pacientes con insuficiencia cardíaca crónica estable de Clase II o III según la NYHA. Los sujetos fueron interrogados acerca de su cardioversor-desfibrilador implantable (CDI) entre 1 y 7 días antes de la aleatorización del fármaco. Los sujetos fueron aleatorizados en uno de los tres brazos de tratamiento al final de la selección, después de la tomografía computarizada (TC) cardíaca de referencia. El estudio consistió en cinco períodos, un período de selección e inicial (días -21 a día -3 del estudio), un período de tratamiento (días 1 a 10 del estudio, con un tiempo de inicio de infusión

diaria de 8 am $\pm$ 2 horas), de descarga (día 11), un período de seguimiento (días 30, 90 y 180 $\pm$ 5 días del estudio) y una visita de seguimiento final hasta el día 365 ($\pm$ 5 días) durando aproximadamente 12 meses. Todos los sujetos recibieron instrucciones para adherirse a su régimen cardíaco estable actual durante la participación en el estudio.

2. Diagnóstico y principales criterios de inclusión

- 5 Para la inscripción se consideraron los sujetos que tenían insuficiencia cardíaca crónica con una clasificación de II o III según la NYHA, y estaban en un régimen estable de IECA/bloqueante del receptor de angiotensina (BRA), beta-bloqueante y/o diurético durante al menos 3 meses antes de recibir la medicación del estudio y se anticipó que permanecerían en el régimen estable durante el período de tratamiento. Se requirió que los sujetos tuvieran un CDI implantado al menos 3 meses antes de recibir la medicación del estudio y que tuvieran una fracción de eyección del
- 10 ventrículo izquierdo (FEVI) $\leq$ 40% determinada en la selección por ecocardiografía 2-D.

3. Productos, dosis, duración, modo de administración y número de tanda/lote:

En los días 1 a 10, los sujetos recibieron una infusión subcutánea de uno de los siguientes tratamientos: dosis de placebo (número de lote: TC2952, 250 μ g por vial) o de Neucardin™ (Número de lote: TC2965, 250 μ g/5000UE por vial) 1,2 μ g/kg/día (24 UE/kg/día) o 2,0 μ g/kg/día (40 UE/kg/día).

- 15 Identidad del o de los productos en investigación: Neucardin™ (número de lote: TC2965) y el placebo correspondiente (número de lote: TC2952) se suministraron en un vial de vidrio transparente que contenía 250 μ g de fármaco activo o de placebo por vial. El fármaco activo y el placebo correspondiente fueron polvos blancos a blancuzcos. El fármaco del estudio se preparó de acuerdo con el código de aleatorización proporcionado usando el
- 20 peso de los sujetos en kilogramos para preparar dosis diarias de 1,2 μ g/kg, 2,0 μ g/kg, y placebo como una solución incolora y transparente, esencialmente libre de partículas visibles. La temperatura de conservación fue 2-8°C y el fármaco tuvo que ser protegido de la luz y fuera del alcance de niños.

Bomba de infusión SC: bomba de insulina Medtronic Paradigm 722. Usando la bomba Medtronic, se extrajeron 1,6 mL de fármaco disuelto en el depósito y el caudal de la bomba era 0,2 mL/h durante 8 horas.

4. Criterios de evaluación:

- 25 Eficacia: Las evaluaciones de eficacia incluyeron TC cardíaca al inicio y el día 30; Clasificación según la NYHA, Ensayo de caminata en 6 minutos, Cuestionario de calidad de vida (Cuestionario de miocardiopatía de Kansas City) y niveles de NT-proBNP en la selección y al inicio, y los días 30, 90, 180 y 365; y ecocardiografía 2-D en la selección y al inicio, el día 30 y el día 90.

- 30 Seguridad: Las evaluaciones de seguridad incluyeron la monitorización de episodios adversos (EA), reacciones adversas (RA), episodios adversos graves (EAG), signos vitales, examen físico, oximetría del pulso, parámetros de ECG (por ejemplo, QTc, QRS, HR, PR, RR, aplanamiento/inversión de la onda T, elevación de ST), niveles de anticuerpos anti-Neucardin™, fluido pericárdico medido por TC cardíaca (mL, leve, moderado, grande), examen del CDI (disparo inapropiado, sí o no), fluido pericárdico por ecocardiografía 2D (mL, leve, moderado, grande) y parámetros de laboratorio (química, hematología y urología). En cardiología, el QTc se refiere al intervalo QT, que es una medida del tiempo entre el comienzo de la onda Q y el final de la onda T en el ciclo eléctrico del corazón. El
- 35 intervalo QT representa la despolarización y la repolarización de los ventrículos eléctrica. Un intervalo QT alargado es un marcador del potencial de taquiarritmias ventriculares como las torsades de pointes y un factor de riesgo de muerte súbita. Las ondas Q, R y S se producen en rápida sucesión, no todas aparecen en todas las derivaciones y reflejan un solo episodio y, por lo tanto, generalmente se consideran juntas. Una onda Q es cualquier desviación descendente después de la onda P. Una onda R sigue como una desviación ascendente, y la onda S es cualquier desviación descendente después de la onda R. La onda T sigue a la onda S, y en algunos casos una onda U
- 40 adicional sigue a la onda T. La frecuencia cardíaca (FC) es la velocidad de los latidos del corazón, específicamente el número de latidos por unidad de tiempo. El intervalo PR también se denomina comúnmente intervalo PQ, cuando una onda Q se mide por ECG. RR es el intervalo entre varias R sucesivas durante el ECG. Las variaciones del intervalo RR presentes durante las condiciones de reposo representan variaciones latido por latido en las entradas autónomas cardíacas. La TC se refiere a la tomografía computarizada de rayos X. CDI se refiere al cardioversor
- 45 desfibrilador implantable.

5. Resultados. Los resultados se describen a continuación.

5.1 FEVI

Tabla 1. Resultados del cambio absoluto de FEVI en % y de FEVI en % al inicio y el día 30.

	Placebo (N = 19)	1,2 µg/kg/día (N = 22)	2,0 µg/kg/día (N = 19)
Inicio	30,29	32,46	28.54
Día 30	29,47	34,99	31.74
Día 30 - Inicio	-0,82	2,53	3.20
Día 30 - Placebo	-	3,35	4.02

- 5 El valor de la FEVI en % disminuyó en el grupo placebo mientras que el valor aumentó en ambos grupos de neuregulina (véase la Figura 1 y la Tabla 1). El cambio medio absoluto fue -0,82%, 2,53% y 3,20% respectivamente en el grupo placebo, en los grupos de 1,2 µg/kg y 2,0 µg/kg (véanse la Figura 2 y la Tabla 1), lo que indica que Neucardin™ mejoró la función cardíaca por la vía de infusión subcutánea.

5.2 VDFVI

- 10 Tabla 2. Resultados del cambio absoluto del VDFVI (mL) y VDFVI (mL) en el inicio y el día 30.

	Placebo (N = 19)	1,2 µg/kg/día (N = 22)	2,0 µg/kg/día (N = 19)
Inicio	287,49	289,43	274,50
Día 30	297,71	281,26	276,86
Día 30 - Inicio	10,22	-8,16	2,36
Día 30 - Placebo	-	-18,38	-7,86

- 15 El valor del VDFVI aumentó en el grupo de placebo, mientras que en el grupo de 2,0 µg/kg, el aumento del VDFVI no fue tanto como el del grupo de placebo, y el valor disminuyó significativamente en el grupo de 1,2 µg/kg (véase la Figura 3 y la Tabla 2). El cambio medio absoluto fue 10,22 mL, -8,16 mL y 2,36 mL, respectivamente, en el grupo del placebo, en los grupos de 1,2 µg/kg y de 2,0 µg/kg (véanse la Figura 4 y la Tabla 2). Con respecto al valor del VDFVI, el grupo de 1,2 µg/kg fue mejor que el grupo de 2,0 µg/kg.

5.3 VSFVI

Tabla 3. Resultados del cambio absoluto del VSFVI (mL) y VSFVI (mL) en el inicio y el día 30.

	Placebo (N = 19)	1,2 µg/kg/día (N = 22)	2,0 µg/kg/día (N = 19)
Inicio	206,79	202,29	205,24
Día 30	216,12	191,71	200,06
Día 30 - Inicio	9,33	-10,58	-5,19
Día 30 - Placebo	-	-19,91	-14,52

- 20 El valor del VSFVI aumentó con el placebo mientras que el valor disminuyó en ambos grupos de neuregulina (véanse la Figura 5 y la Tabla 3). El cambio absoluto medio fue 9,33 mL, -10,58 mL y -5,19 mL respectivamente en el grupo placebo, en los grupos de 1,2 µg/kg y de 2,0 µg/kg (véase la Figura 6 y la Tabla 3). Con respecto al valor del VSFVI, el grupo de 1,2 µg/kg fue mejor que el del grupo de 2,0 µg/kg. Tanto los datos del VDFVI como del VSFVI mostraron que Neucardin™ revirtió eficazmente la remodelación ventricular en pacientes con ICC) por la vía de infusión subcutánea.
- 25

5.4 Ensayo de caminata de seis minutos

Tabla 4. Resultados del aumento de la distancia caminada (m) y la disnea después de la caminata y la fatiga después de la caminata en los días 30, 90, 180 y 365 en comparación con el valor inicial

	Tiempo (días)	Placebo (N = 19)	1,2 µg/kg/día (N = 22)	2,0 µg/kg/día (N = 19)
Aumento de la distancia caminada (m)	30	19,2	41,4	1,7
	90	21,6	52,2	-2,0
	180	30,5	47,7	11,7
	365	39,4	62,2	-24,4
Disnea después de la caminata (puntuación)	30	-0,3	-0,8	-0,6
	90	-0,1	-0,7	-0,7
	180	-0,8	-0,8	-0,3
	365	0,3	-0,8	-0,5
Fatiga después de la caminata (puntuación)	30	0,1	-1,4	-1,0
	90	0,2	-1,1	-0,4
	180	-0,2	-1,3	0,2
	365	0,3	-1,3	0,2

Los aumentos de las distancias caminadas en el grupo de 1,2 µg/kg (41,4 m el día 30, 52,2 m el día 90, 47,7 m el día 180, 62,2 m el día 365) fueron todos los mayores en los 3 grupos y el aumento de las distancias caminadas en el grupo del placebo (19,2 m el día 30, 21,6 m el día 90, 30,5 m el día 180, 39,4 m el día 365) era mayor que el del grupo de 2,0 µg/kg (1,7 m el día 30, -2,0 m el día 90, 11,7 m en el día 180, -24,4 m día 365) (véanse la Figura 7 y la Tabla 4). El aumento observado en la distancia caminada observada en el grupo de 1,2 µg/kg/día excedió lo que se habría predicho en base a estudios previos que utilizaron la administración intravenosa de neuregulina. Con respecto a los resultados de la disnea y la fatiga después de la caminata en el día 30 y en el día 90, ambos grupos de neuregulina fueron mejores que en los del grupo del placebo (véanse las Figuras 8 y 9 y la Tabla 4).

5.5 Calidad de vida los días 30, 90, 180 y 365

Tabla 5. Análisis de calidad de vida.

Tiempo (días)	Placebo (N = 19)	1,2 µg/kg/día (N = 22)	2,0 µg/kg/día (N = 19)
30	4,825	15,873	9,649
90	2,778	15,079	9,649
180	8,333	17,460	7,353
365	10,000	16,228	7,870

Como se ve en la Figura 10, la puntuación de la calidad de vida aumentó en 4,825, 15,152 y 9,649 respectivamente en el grupo del placebo, y en los grupos de 1,2 µg/kg y de 2,0 µg/kg (véase también la Tabla 5). Una puntuación más alta significa una mejor calidad de vida. Como se ve en la Tabla 5, la puntuación de calidad de vida en el grupo de 1,2 µg/kg fue la más alta de los 3 grupos. Las puntuaciones de los 3 grupos aumentaron mientras que el grupo de 1,2 µg/kg aumentó mucho más que en el grupo del placebo (véase la Figura 10). El aumento observado en la puntuación de la calidad de vida observada en el grupo de 1,2 µg/kg/día superó lo que se habría predicho en base a estudios previos que utilizaron la administración intravenosa de neuregulina.

5.6 Resultados del cambio de valor de la mediana de NT-proBNP al inicio y los días 30, 90, 180 y 365.

Tabla 6. Cambio de valor de la mediana de NT-proBNP (PG/ML).

Tiempo (días)	Placebo (N = 19)	1,2 µg/kg/día (N = 22)	2,0 g/kg/día (N = 19)
Base	779,00	472,00	678,50
Día 30 - Inicio	-14,00	-73,00	45
Día 90 - Inicio	16,00	-55,00	-70,50
Día 180 - Inicio	-24,00	-69,00	-50,50
Día 365 - Inicio	68,00	-83,50	-20,00

5 NT-proBNP se usa ampliamente como un marcador de diagnóstico o pronóstico para la insuficiencia cardíaca debido a que es generalmente más alto en pacientes con peor resultado. Como se ve en la Tabla 6, el nivel de NT-proBNP en el grupo de 1,2 µg/kg fue más bajo en los 3 grupos y en el grupo de 1,2 µg/kg disminuyó mucho más que el grupo del placebo.

5.7 Clasificación según la NYHA el día 30

Tabla 7. Porcentaje de clasificación de la NYHA al inicio y el día 30.

		NYHA I	NYHA II	NYHA III	NYHA IV
Inicio	Placebo	0	84,2%	15,8%	0
	1,2 µg/kg/día	0	81,8%	18,2%	0
	2,0 µg/kg/día	0	73,7%	26,3%	0
Día 30	Placebo	5,3%	84,2%	10,5%	0
	1,2 µg/kg/día	13,6%	72,7%	13,6%	0
	2,0 µg/kg/día	15,8%	57,9%	26,3%	0

10

Tabla 8. Los números y el porcentaje de pacientes cambiaron en 1 grado o más en la clasificación de la NYHA en comparación con el valor inicial.

Cambio en comparación con el valor inicial	Placebo	1,2 µg/kg/día	2,0 µg/kg/día
Disminución en 1 grado o más	2 (9,5%)	5 (20,8%)	6 (27,3%)
Sin cambio	19 (90,5%)	17 (70,8%)	13 (59,1%)
Aumento en 1 grado o más	0	1 (4,2%)	3 (13,6%)

15

Como se ve en la Figura 11 y en las Tablas 7 y 8, más pacientes disminuyeron en 1 grado o más en la clasificación de la NYHA con el tratamiento con Neucardin™. La disminución observada en la clasificación de la NYHA excedió lo que se habría predicho basándose en estudios previos que utilizaron la administración intravenosa de neuregulina.

5.8 Evaluación de seguridad

Tabla 9. Resumen general de episodios adversos (EA).

	1,2 µg/kg/día (N = 24)	2,0 µg/kg/día (N = 22)	Placebo (N = 21)	Total (N = 67)
Número (%) de sujetos con EA	21 (87,5)	21 (95,5)	15 (71,4)	57 (85,1)
Número (%) de sujetos con EA por relación máxima con el fármaco del estudio				
Independientes ¹	6 (25,0)	5 (22,7)	9 (42,9)	20 (29,9)
No independientes	15 (62,5)	16 (72,7)	6 (28,6)	37 (55,2)
Número (%) de sujetos con EA por gravedad máxima				
Leves	16 (66,7)	10 (45,5)	9 (42,9)	35 (52,2)
Moderados	4 (16,7)	6 (27,3)	3 (14,3)	13 (19,4)
Graves	1 (4,2)	5 (22,7)	3 (14,3)	9 (13,4)
Número (%) de sujetos con EA intensos	1 (4,2)	6 (27,3)	4 (19,0)	11 (16,4)

Como se ve en la Tabla 9, los datos de seguridad mostraron que la administración de Neucardin™ aumentó la incidencia de episodios adversos, aunque la mayoría de estos fueron leves a moderados, especialmente en el grupo de 1,2 µg/kg. En el grupo de 1,2 µg/kg, la incidencia de episodios adversos graves disminuyó, lo que sugiere que el tratamiento con Neucardin™ mejoró la situación general de los pacientes con ICC.

Lista de secuencias

<110> ZENSUN (SHANGHAI) SCIENCE & TECHNOLOGY LIMITED

<120> Liberación prolongada de neuregulina para tratar la insuficiencia cardíaca

<130> 11748-039-228

<140>

<141>

<150> 61/826,433

<151> 22-05-2013

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 61

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> Descripción de desconocido: secuencia de neuregulina desconocida

<400> 1

ES 2 743 617 T3

Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
1 5 10 15

Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
20 25 30

Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr
35 40 45

Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr Gln
50 55 60

<210> 2
<211> 50
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Descripción de desconocido: secuencia de neuregulina desconocida

<400> 2
Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
1 5 10 15

Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
20 25 30

Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr
35 40 45

Val Met
50

<210> 3
<211> 64
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Descripción de desconocido: secuencia de neuregulina desconocida

<400> 3
Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
1 5 10 15

Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
20 25 30

Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr
35 40 45

Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr Gln Lys Arg Val
50 55 60

<210> 4
<211> 23
<212> PRT
<213> Desconocido

ES 2 743 617 T3

<220>

<223> Descripción de desconocido: secuencia de neuregulina desconocida

<400> 4

Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met
1 5 10 15

Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro
20

<210> 5

<211> 68

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> Descripción de desconocido: secuencia de neuregulina desconocida

<400> 5

Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
1 5 10 15

Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
20 25 30

Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr
35 40 45

Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr Gln Lys Arg Val
50 55 60

Leu Thr Ile Thr
65

REIVINDICACIONES

1. Neuregulina para uso en un método para prevenir, tratar o retrasar una enfermedad o trastorno cardiovascular en un ser humano, en donde el método comprende la liberación subcutánea prolongada de neuregulina en el ser humano en una cantidad de 0,3 µg/kg/día a 3,0 µg/kg/día, y en donde la liberación subcutánea prolongada de neuregulina en el ser humano se consigue mediante el uso de una bomba.
2. La neuregulina para uso de la reivindicación 1, en donde la enfermedad o trastorno es insuficiencia cardíaca.
3. La neuregulina para uso de la reivindicación 1 o 2, en donde la liberación subcutánea prolongada de neuregulina en el ser humano se consigue mediante el uso de una bomba de jeringa.
4. La neuregulina para uso de la reivindicación 3, en donde la bomba de jeringa es una mini bomba.
5. La neuregulina para uso de la reivindicación 4, en donde la mini bomba es una bomba de insulina.
6. La neuregulina para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la neuregulina está en una cantidad de:
 - (a) 1,2 µg/kg/día a 2,0 µg/kg/día;
 - (b) 1,2 µg/kg/día;
 - (c) 2,0 µg/kg/día;
 - (d) 6 UE/kg/día a 60 UE/kg/día;
 - (e) 24 UE/kg/día a 40 UE/kg/día;
 - (f) 24 UE/kg/día; o
 - (g) 40 UE/kg/día.
7. La neuregulina para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la neuregulina se administra al ser humano durante un régimen de inducción.
8. La neuregulina para uso de la reivindicación 7, en donde el régimen de inducción incluye una administración de neuregulina durante:
 - (a) al menos 3, 5, 7, 10 o 15 días consecutivos;
 - (b) 10 días consecutivos;
 - (c) al menos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24 horas consecutivas cada día; o
 - (d) 8 horas consecutivas cada día.
9. La neuregulina para uso de la reivindicación 7 u 8, en donde la neuregulina se administra al ser humano durante un régimen de mantenimiento después del régimen de inducción.
10. La neuregulina para uso de la reivindicación 9, en donde el régimen de mantenimiento incluye una administración de neuregulina durante al menos 3 meses, 6 meses, 12 meses, 5 años o incluso más después del régimen de inducción.
11. La neuregulina para uso de la reivindicación 9, en donde el régimen de mantenimiento incluye una repetición del régimen de inducción cada 3 meses, 6 meses o 12 meses.
12. La neuregulina para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la liberación prolongada de neuregulina en el ser humano:
 - (a) mejora el valor de fracción de eyección (FE) del ser humano;
 - (b) reduce el volumen diastólico final del ventrículo izquierdo (VDFVI) del ser humano;
 - (c) reduce el volumen sistólico final del ventrículo izquierdo (VSFVI) del ser humano;
 - (d) mejora la distancia caminada en 6 minutos (DC6M) del ser humano; o
 - (e) mejora la calidad de vida del ser humano.
13. Un kit que comprende una composición o formulación de neuregulina y una bomba para usar en un método para

prevenir, tratar o retrasar una enfermedad o trastorno cardiovascular en un ser humano por liberación subcutánea prolongada de neuregulina en un mamífero en una cantidad de 0,3 µg/kg/día a 3,0 µg/kg/día.

14. El kit para uso de la reivindicación 13, en donde la enfermedad o trastorno es insuficiencia cardíaca.

15. El kit para uso de la reivindicación 13 o 14, en donde la bomba es:

- 5
- (a) una bomba de jeringa;
 - (b) una mini bomba; o
 - (c) una bomba de insulina.

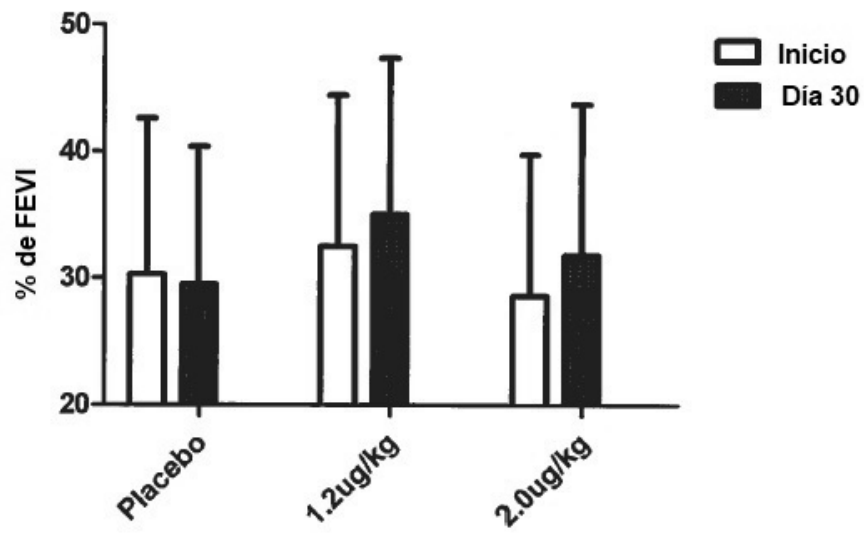


Figura 1

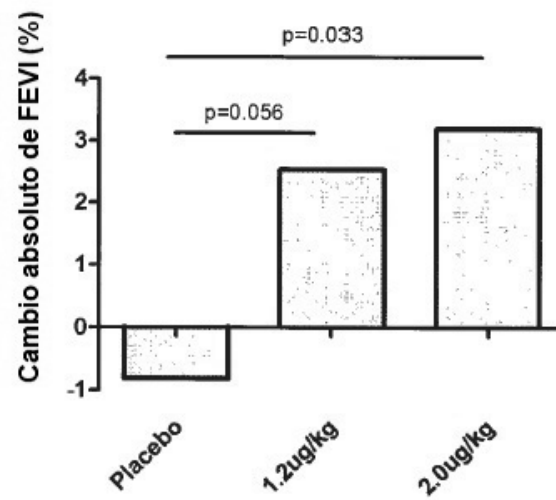


Figura 2

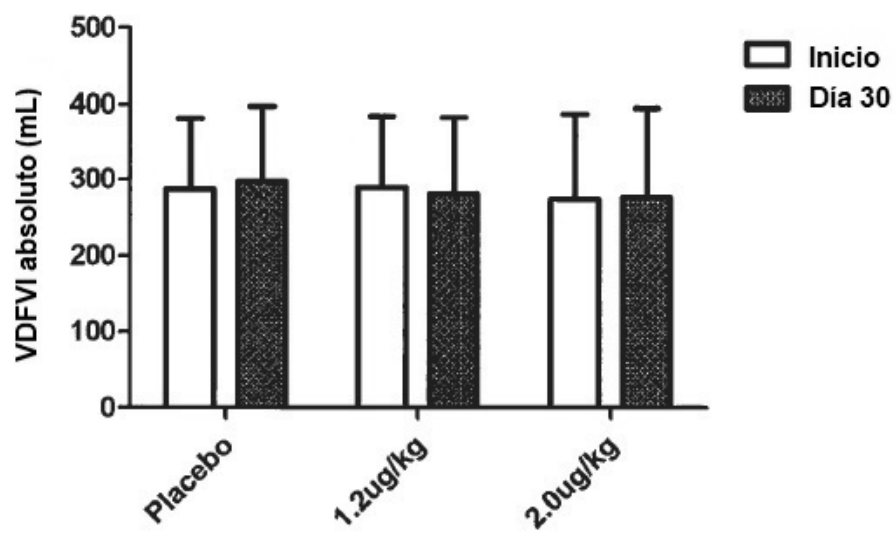


Figura 3

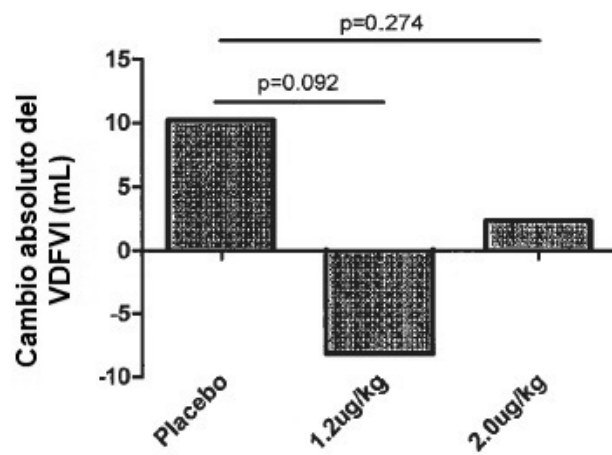


Figura 4

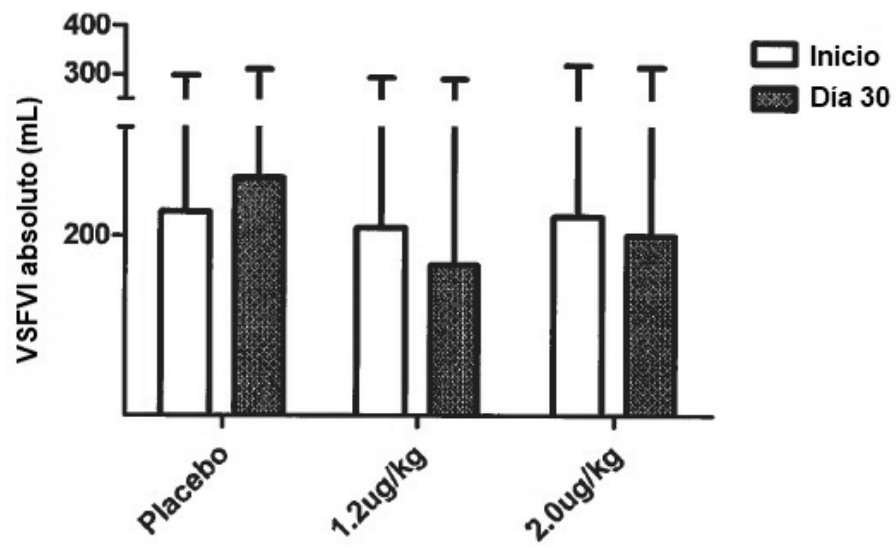


Figura 5

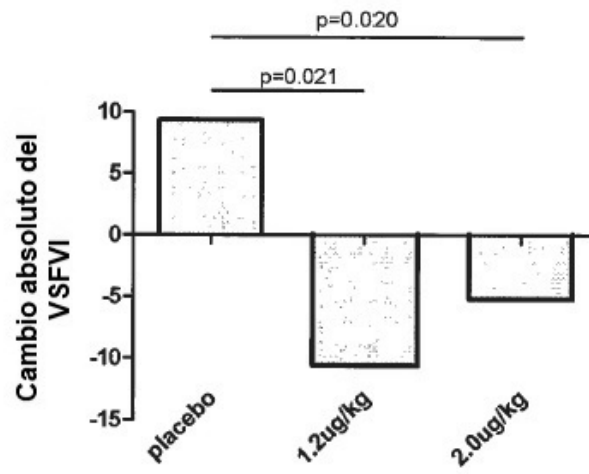


Figura 6

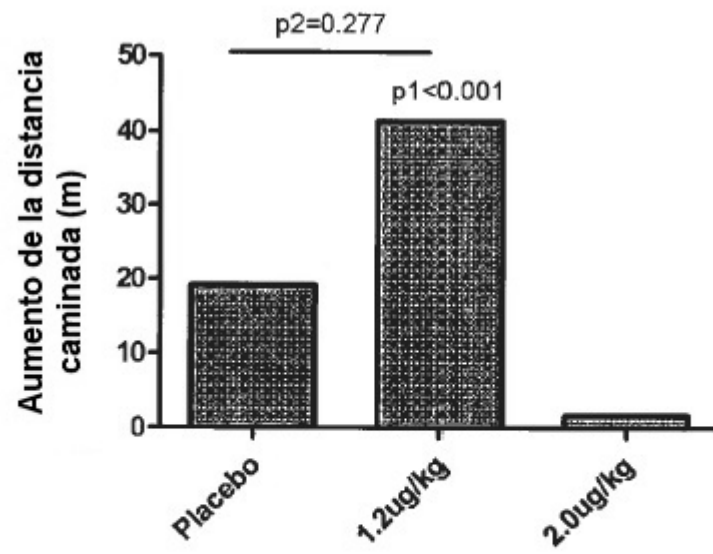


Figura 7

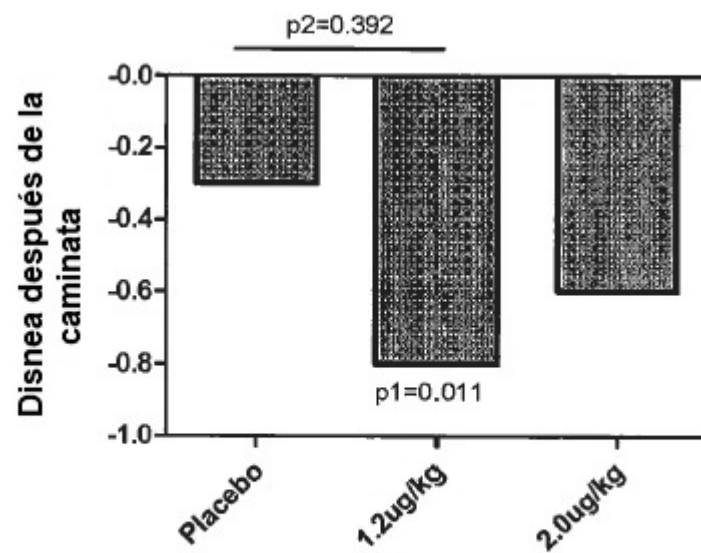


Figura 8

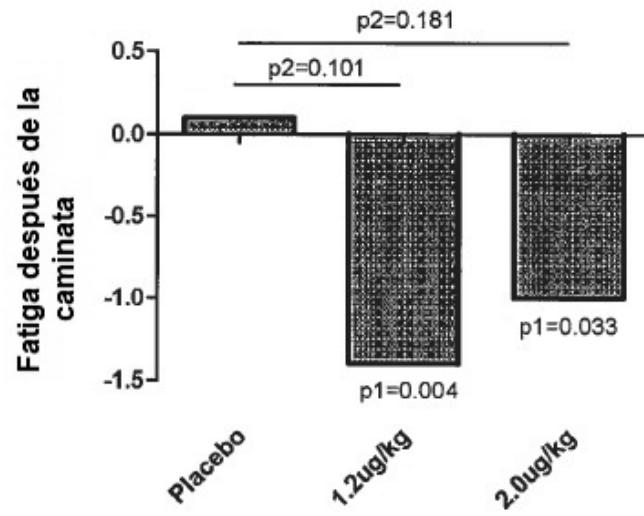


Figura 9

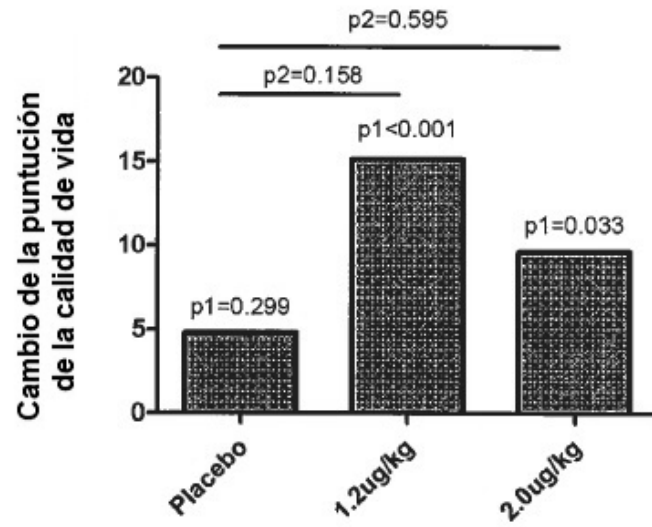


Figura 10

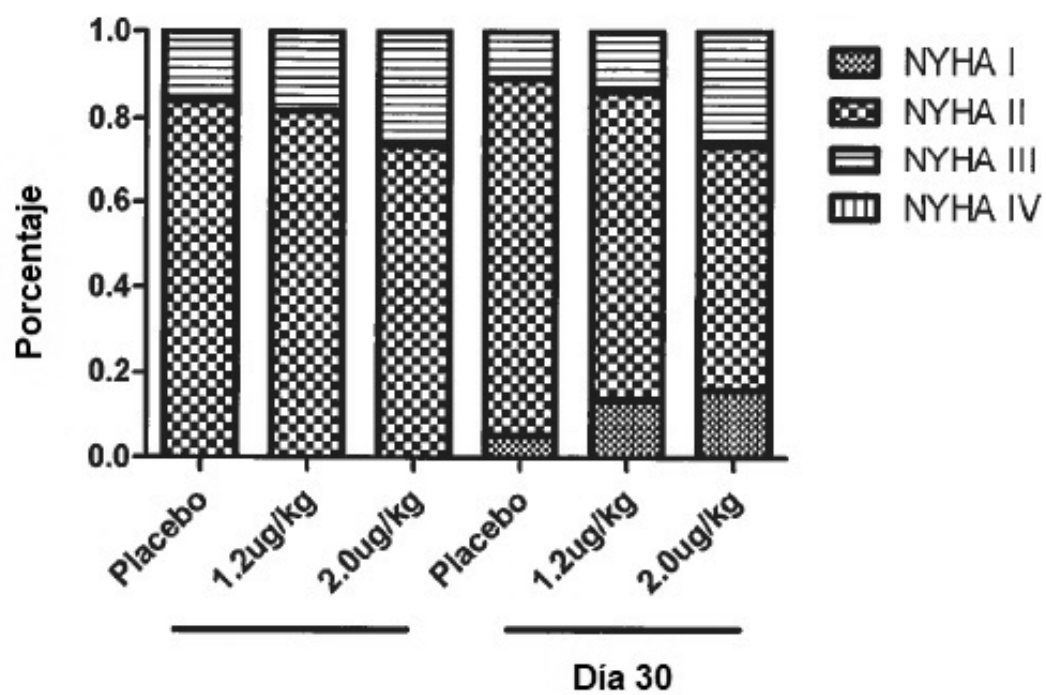


Figura 11