

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 812 104**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/18** (2006.01)

**A61P 9/04** (2006.01)

**A61K 45/06** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**A61K 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2012 E 16183775 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2020 EP 3135685**

54 Título: **Neuregulina para tratar la insuficiencia cardíaca**

30 Prioridad:

**10.10.2011 WO PCT/CN2011/001691**

**02.11.2011 WO PCT/CN2011/081699**

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

**16.03.2021**

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:

**MINGDONG, ZHOU**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 812 104 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 tratar la insuficiencia cardíaca

**1. Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere al uso de proteína neuregulina para la preparación de medicación para prevenir, tratar o retrasar la insuficiencia cardíaca en seres humanos y métodos para prevenir, tratar o retrasar la insuficiencia cardíaca en seres humanos usando dicha medicación. En particular, la presente invención proporciona métodos para prevenir, tratar o retrasar la insuficiencia cardíaca usando la medicación que comprende una proteína neuregulina en poblaciones específicas de pacientes con insuficiencia cardíaca crónica.

**2. Antecedentes de la invención**

10 La insuficiencia cardíaca afecta aproximadamente a cinco millones de americanos, y más de 550.000 pacientes se diagnostican con la afección cada año. La terapia farmacológica actual para la insuficiencia cardíaca se dirige principalmente a los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE, de sus siglas en inglés), que son vasodilatadores que causan la expansión de los vasos sanguíneos, reduciendo la presión sanguínea y reduciendo la carga de trabajo del corazón. Aunque el porcentaje de reducción de la mortalidad ha sido significativo, la actual  
15 reducción en la mortalidad con inhibidores ACE, ha sido sólo del 3%-4% en promedio, y existen varios efectos secundarios potenciales. Se han asociado limitaciones adicionales con otras opciones para prevenir o tratar la insuficiencia cardíaca. Por ejemplo, el trasplante de corazón es claramente más caro e invasivo que el tratamiento farmacológico, y está limitado además por la disponibilidad de corazones de los donantes. El empleo de dispositivos mecánicos, tales como los marcapasos ventriculares, son invasivos y caros de manera similar. Por tanto, existe una  
20 necesidad de nuevas terapias, dado las deficiencias en las terapias actuales.

Una nueva terapia prometedora implica la administración de una neuregulina (aquí en lo sucesivo referida como "NRG") a un paciente que padece o que corre el riesgo de desarrollar una insuficiencia cardíaca. Las NRGs, una familia similar a los factores de crecimiento EGF (factor de crecimiento epitelial), comprende a una familia relacionada estructuralmente con los factores de crecimiento y diferenciación, que incluyen la NRG1, NRG2, NRG3 y  
25 NRG4 y las isoformas de las mismas, implicadas en un conjunto de respuestas biológicas: estimulación de la diferenciación celular del cáncer de mama y secreción de proteínas de la leche; inducción de la diferenciación de células de la cresta neural a células Schwann; estimulación de la síntesis de receptores de acetilcolina en células del músculo esquelético; y promoción de células miocárdicas supervivientes, y síntesis de ADN. En estudios in vivo dirigidos a genes de neuregulina de embriones de ratón homocigóticos con graves defectos en la formación trabecular y ventricular, y en el desarrollo de los ganglios de la raíz dorsal, indican que la neuregulina es esencial para el desarrollo neural y cardíaco.

Las NRGs se unen al receptor de la familia de EGF, el cual comprende EGFR, ErbB2, ErbB3 y ErbB4, cada uno de los cuales juega un papel importante en múltiples funciones celulares, que incluyen el crecimiento, la diferenciación y la supervivencia celular. Existen receptores de la proteína tirosina quinasa, que consiste en un dominio que se une al  
35 ligando extracelular, un dominio de quinasa transmembrana y un dominio de tirosina quinasa citoplasmático. Después de que la NRG se haya unido al dominio extracelular de ErbB3 o ErbB4, se induce un cambio conformacional que conduce a la formación del heterodímero entre ErbB3, ErbB4 y ErbB2, o la formación del homodímero entre ErbB4 consigo mismo, que da como resultado una fosforilación del dominio C-terminal del receptor dentro de la membrana celular. El dominio intracelular fosforilado se une después a proteínas señal  
40 adicionales dentro de la célula, que activan la correspondiente ruta señalización descendente AKT o ERK, e induce una serie de reacciones celulares, tales como la estimulación o supresión de la proliferación celular, diferenciación celular, apoptosis celular, migración celular o adhesión celular. Entre estos receptores, en el corazón se expresan principalmente ErbB2 y ErbB4.

Se ha demostrado que los dominios de NRG-1 similares a EGF, que oscilan en un tamaño de 50 a 64 aminoácidos, son suficientes para unir y activar a estos receptores. Estudios anteriores han demostrado que la neuregulina-1β (NRG-1β) puede unirse directamente a ErbB3 y ErbB4 con una alta afinidad. El receptor huérfano, ErbB2, puede formar el heterodímero con ErbB3 y ErbB4 con una afinidad mayor que los homodímeros ErbB3 o ErbB4. La investigación en el desarrollo neuronal ha indicado que la formación del sistema nervioso simpático requiere de un sistema de señalización de NRG-1β, ErbB2 y ErbB3 intacto. La alteración de la diana del NRG-1β o ErbB2 o ErbB4  
50 conduce a la muerte embrionaria debido al desarrollo de defectos cardíacos. Estudios recientes destacaron también los papeles del NRG-1β, ErbB2 y ErbB4, en el desarrollo cardiovascular, así como en el mantenimiento de las funciones cardíacas normales del adulto. El NRG-1β ha demostrado mejorar la organización sarcómera de los cardiomiocitos del adulto. La administración de un NRG-1β recombinante de dominio similar a EGF mejora o protege significativamente frente a deterioro del rendimiento miocárdico en distintos modelos, así como en ensayos clínicos, de animales con insuficiencia cardíaca. Estos resultados hacen que la NRG-1 sea prometedora como un compuesto principal para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. Sin embargo, aún existe una necesidad de más pruebas de si el tratamiento con NRG-1 puede proporcionar beneficios a largo plazo en los pacientes con insuficiencia cardíaca, y si los beneficios se pueden proporcionar en todos los pacientes con insuficiencia cardíaca crónica o sólo en algunas subpoblaciones.

### 3. Compendio de la invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. El solicitante descubrió que evaluar la clasificación funcional cardíaca de la New York Heart Association (NYHA) o medir el nivel plasmático de NT-proBNP o BNP en los pacientes en ensayos clínicos de neuregulina en humanos para tratar la insuficiencia cardíaca, permitía la selección de los pacientes con insuficiencia cardíaca que recibirían significativamente los beneficios del tratamiento de la neuregulina. Tales beneficios incluyen una reducción significativa en la tasa de mortalidad.

El solicitante ha descubierto que la NRG mejora la diferenciación de células musculares cardíacas y la organización de la estructura sarcomérica y del citoesqueleto, así como la adhesión celular. El solicitante también ha descubierto que la NRG mejora o protege significativamente frente al deterioro del rendimiento del miocardio en diferentes modelos y ensayos clínicos de animales con insuficiencia cardíaca. La neuregulina, polipéptido de neuregulina, o derivados de neuregulina, entran dentro del alcance de la presente invención.

Por tanto, en un primer aspecto de la descripción, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de neuregulina para tratar a pacientes con insuficiencia cardíaca crónica, y los pacientes recibieron beneficios significativos de la composición farmacéutica. En algunas realizaciones, el beneficio es la reducción significativa de la tasa de mortalidad. En algunas realizaciones, el beneficio es la reducción significativa de la re-hospitalización. En algunas realizaciones, el beneficio es la mejora de los niveles de biomarcadores que indican la mejora de la insuficiencia cardíaca. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra a los pacientes mediante un régimen de inducción, aquí en lo sucesivo referido en la solicitud como "régimen de introducción". En algunas realizaciones optimizadas, el régimen de introducción incluye una administración de la composición farmacéutica durante al menos 3, 5, 7 ó 10 días consecutivos. En algunas realizaciones optimizadas, la composición farmacéutica se administra a los pacientes durante un régimen de mantenimiento durante al menos 3, 6 ó 12 meses después del régimen de introducción. En algunas realizaciones optimizadas, el régimen de mantenimiento incluye la administración de la composición farmacéutica cada 3, 5, 7 ó 10 días.

En un segundo aspecto, la descripción proporciona un método para mejorar la supervivencia o reducir la mortalidad de los pacientes con insuficiencia cardíaca crónica, que comprende administrar una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de neuregulina a los pacientes con insuficiencia cardíaca crónica. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra a los pacientes durante un régimen de introducción. En algunas realizaciones optimizadas, el régimen de introducción incluye la administración de la composición farmacéutica durante al menos 3, 5, 7 ó 10 días consecutivos. En algunas realizaciones optimizadas, la composición farmacéutica se administra a los pacientes durante un régimen de mantenimiento durante al menos 3, 6 ó 12 meses después del régimen de introducción. En algunas realizaciones optimizadas, el régimen de mantenimiento incluye una administración de la composición farmacéutica cada 3, 5, 7 ó 10 días.

En un tercer aspecto, se proporciona en la presente memoria una cantidad de neuregulina eficaz farmacéuticamente para usar en el tratamiento a pacientes con insuficiencia cardíaca crónica cuyo nivel de NT-proBNP plasmático está dentro de una zona de tratamiento favorita antes del tratamiento con neuregulina. La zona de tratamiento favorita no es superior a 1600 fmol/ml. En otra realización preferida, el nivel plasmático se mide mediante un inmunoensayo.

En un cuarto aspecto de la descripción, una cantidad de neuregulina eficaz farmacéuticamente se usa para tratar a pacientes con insuficiencia cardíaca crónica que tiene una clase específica de función cardíaca clasificada mediante la clasificación funcional cardíaca de la NYHA. En algunas realizaciones, la clase específica de función cardíaca es la clase II de la NYHA. En algunas realizaciones, la clase específica de función cardíaca es la clase III de la NYHA.

En un quinto aspecto se proporciona en la presente memoria, un método para seleccionar un paciente con insuficiencia cardíaca para el tratamiento mediante neuregulina. Este método comprende medir el nivel plasmático de NT-proBNP en el paciente. Un nivel de no más de 1600 fmol/ml es indicativo de que el paciente es adecuado para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca mediante neuregulina.

En un sexto aspecto, la descripción caracteriza un método para seleccionar un paciente con insuficiencia cardíaca para el tratamiento mediante neuregulina. Este método comprende evaluar la clase funcional cardíaca mediante la clasificación de la función cardíaca de la NYHA. En una realización, la clase II de la NYHA es indicativo de que el paciente es adecuado para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca mediante neuregulina. En otra realización, la clase III de la NYHA es indicativo de que el paciente es adecuado para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca mediante neuregulina.

En un séptimo aspecto, la descripción caracteriza unos kits de diagnóstico para seleccionar a un paciente con insuficiencia cardíaca para el tratamiento mediante neuregulina. En una realización, los kits de diagnóstico comprenden reactivos de inmunoensayo para medir el nivel plasmático de NT-proBNP en un paciente con insuficiencia cardíaca, en donde un nivel de no más de 1600 fmol/ml es indicativo de que el paciente es adecuado para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca mediante neuregulina.

En un octavo aspecto de la descripción, se proporcionó el uso de una proteína neuregulina para la preparación de una medicación. La medicación se puede proporcionar a pacientes con insuficiencia cardíaca crónica para beneficios a largo plazo. En una realización, el beneficio a largo plazo es la mejora de la supervivencia. En una

realización, el beneficio a largo plazo es la reducción de la re-hospitalización. En otra realización, el beneficio a largo plazo es la mejora de los biomarcadores que indican el pronóstico a largo plazo de la insuficiencia cardíaca crónica. En algunas realizaciones, la medicación se administra a los pacientes durante un régimen de introducción. En algunas realizaciones optimizadas, el régimen de introducción incluye la administración de medicación durante al menos 3, 5, 7 ó 10 días consecutivos. En algunas realizaciones optimizadas, la medicación se administra a los pacientes durante un régimen de mantenimiento durante al menos 3, 6 ó 12 meses después del régimen de introducción. En algunas realizaciones optimizadas, el régimen de mantenimiento incluye una administración de la medicación cada 3, 5, 7 ó 10 días.

En un noveno aspecto, se proporcionó un ensayo de diagnóstico complementario para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca mediante una proteína neuregulina. La prohormona N-terminal del péptido natriurético (NT-proBNP) se usa como un biomarcador para el ensayo de diagnóstico complementario. Un nivel de no más de 1600 fmol/ml es indicativo de que el paciente es adecuado para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca mediante neuregulina.

En un décimo aspecto de la descripción, se proporciona un método para tratar la insuficiencia cardíaca crónica empleando neuregulina. El método comprende un procedimiento de evaluación antes del tratamiento y decidir si cada paciente es adecuado para recibir el tratamiento de neuregulina según el resultado de la evaluación. En una realización, el procedimiento de evaluación incluye la clasificación de la función cardíaca de la NYHA de un paciente con insuficiencia cardíaca crónica. En otra realización, el procedimiento de evaluación incluye el ensayo plasmático de NT-proBNP o BNP para cada paciente con insuficiencia cardíaca crónica.

En un undécimo aspecto de la descripción, se proporciona un kit de diagnóstico complementario para decidir si un paciente con insuficiencia cardíaca crónica es adecuado para recibir el tratamiento con proteína neuregulina. El kit de diagnóstico complementario comprende un kit de ensayo NT-proBNP o BNP plasmático, y las instrucciones de cómo usar el kit y cómo determinar si el sujeto es adecuado para el tratamiento con proteína neuregulina según el resultado del ensayo.

#### 4. Descripción detallada de la invención

Para mayor claridad de la divulgación, y no a modo de limitación, la descripción detallada de la invención se divide aquí en lo sucesivo dentro de las siguientes subsecciones.

##### A. Definiciones

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

Como se emplea en la presente memoria, las formas en singular “un”, “uno”, y “el” significan “al menos uno” o “uno o más” a menos que el contexto lo determine claramente de otra manera.

Como se emplea en la presente memoria, “neuregulina” o “NRG” empleado en la presente invención se refiere a las proteínas o péptidos que se pueden unir y activar a ErbB2, ErbB3, ErbB4 o a combinaciones de los mismos, que incluyen pero no se limitan a todas las isoformas de neuregulina, neuregulina con dominio similar a EGF en solitario, polipéptidos que comprenden neuregulina con dominio similar a EGF, neuregulinas mutantes o derivados, y cualquier tipo de producto genético similar a neuregulina que active también a los receptores anteriores que se describen en detalle a continuación. Neuregulina también incluye a las proteínas NRG-1, NRG-2, NRG-3 y NRG-4, péptidos, y fragmentos. La neuregulina empleada 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 musculares esqueléticas; y/o mejorar la supervivencia y diferenciación del cardiomiocito, y la síntesis de ADN. La neuregulina también incluye a aquellas variantes con sustituciones de aminoácidos conservadoras que no alteran sustancialmente su actividad biológica. Sustituciones de aminoácidos conservadoras adecuadas son bien conocidas por los expertos en esta técnica, y se pueden realizar generalmente sin alterar la actividad biológica de la molécula resultante. Los expertos en esta técnica reconocerán que, en general, sustituciones de un único 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, 4ª Edición, 1987, The Bejacmin/Cummings Pub.co.,p.224). En realizaciones preferidas, la neuregulina empleada en la presente invención se une y activa heterodímeros ErbB2/ErbB4 o ErbB2/ErbB3, por ejemplo, pero no con propósitos de restricción, péptidos que incluyen de 177-237 restos de la isoforma β2 de NRG-1 que contiene la secuencia de aminoácidos: SHLVKCAEKEKTFVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKPNEFTGDRCQNYVMASFYKAEELYQ (SEQ ID NO:1). Los péptidos que incluyen de 177-237 restos de la isoforma β2 de NRG-1 comprende el dominio similar a EGF, el cual se ha demostrado ser suficiente para unirse y activar a los receptores.

Como se emplea en la presente memoria, “dominio similar al factor de crecimiento epidérmico” o “dominio similar a EGF” se refiere a un polipéptido codificado por un gen de neuregulina que se une y activa a ErbB2, ErbB3, ErbB4, o a combinaciones de las mismas, y que soporta una estructura similar a la del dominio de unión al receptor EGF como se divulga en WO 00/64400, Holmes et al., Science, 256:1205-1210 (1992); Patentes US N<sup>os</sup> 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. En determinadas realizaciones, el dominio similar a EGF se une y activa a heterodímeros ErbB2/ErbB4 o ErbB2/ErbB3. En determinadas realizaciones, el dominio similar a EGF comprende la secuencia de aminoácidos del receptor que se une al dominio de NRG-1. En algunas realizaciones, el dominio similar a EGF comprende la secuencia de aminoácidos que corresponde a los restos aminoácidos 177-226, 177-237, o 177-240 de la NRG-1. En determinadas realizaciones, el dominio similar a EGF comprende la secuencia de aminoácidos del receptor que se une al dominio de NRG-2. En determinadas realizaciones, el dominio similar a EGF comprende la secuencia de aminoácidos del receptor que se une al dominio de NRG-3. En determinadas realizaciones, el dominio similar a EGF comprende la secuencia de aminoácidos del receptor que se une al dominio de NRG-4. En determinadas realizaciones, el dominio similar a EGF comprende la secuencia de aminoácidos de Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro, (SEQ ID NO: 2) como se describe en la patente US N° 5.834.229.

La formulación, dosis y vía de administración de una proteína neuregulina, preferiblemente en la forma de composiciones farmacéuticas, se puede determinar según los métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Remington; *The Science and Practice of Pharmacy*, Alfonso R. Gennaro (Editor) Mack Publishing Company, Abril 1997; *Therapeutic Peptides and Proteins; Formulation, Processing, and Delivery Systems*, Banga, 1999; y *Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins*, Hovgaard y Frkjr (Ed.), Taylor & Francis, Inc., 2000; *Medical Applications of Liposomes*, Lasic and Papahadjopoulos (Ed.), Elsevier Science, 1998; *Textbook of Gene Therapy*, Jain, Hogrefe & Huber Publishers, 1998; *Adenoviruses: Basic Biology to Gene Therapy*, Vol. 15, Seth, Landes Bioscience, 1999; *Biopharmaceutical Drug Design and Development*, Wu-Pong and Rojanasakul (Ed.), Humana Press, 1999; *Therapeutic Angiogenesis: From Basic Science to the Clinic*, Vol. 28, Dole et al., (Ed.), Springer-Verlag Nueva York, 1999).

La proteína neuregulina, se puede formular para administración oral, rectal, 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 de la gravedad de la afección que se está tratando, y de la naturaleza de la proteína neuregulina en particular que se está empleando. La proteína neuregulina se puede administrar en solitario. De forma alternativa y preferiblemente, la proteína neuregulina se co-administra con un transportador o excipiente aceptable farmacéuticamente. En el presente método se puede emplear cualquier transportador o excipiente adecuado aceptable farmacéuticamente (véase, por ejemplo, Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, Alfonso R. Gennaro (Editor) Mack Publishing Company, Abril 1997).

Según la presente invención, la proteína neuregulina, en solitario o en combinación con otros agentes, transportadores o excipientes, se puede formular para cualquier vía de administración adecuada, tal como la inyección intracavernosa, inyección subcutánea, inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intradérmica, administración oral o tópica. El método puede emplear formulaciones para administración inyectable en forma de dosis unitaria, en ampollas o en recipientes múltiples, con un conservante adicional. Las formulaciones pueden adoptar tales formas como suspensiones, disoluciones o suspensiones en vehículos acuosos u oleosos, y pueden contener agentes formuladores tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o agentes dispersantes. Alternativamente, el ingrediente activo puede ser en forma de polvo para reconstitución con un vehículo adecuado, agua estéril apirógena u otros disolventes, antes de su uso. La administración tópica en la presente invención puede emplear el uso de una espuma, gel, crema, pomada, parche transdérmico, o pasta.

Composiciones y métodos aceptables farmacéuticamente para su administración que se pueden emplear para usar en esta invención incluyen, pero no se limitan a los descritos en las Patentes U.S. N°s 5.736.154; 6.197.801 B1; 5.741.511; 5.886.039; 5.941.868; 6.258.374 B1; y 5.686.102.

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

Conviene señalar que el médico responsable sabrá cómo y cuándo terminar, interrumpir o ajustar la terapia a la dosis más baja debido a la toxicidad, o a los efectos adversos. Por otro lado, el médico sabrá también cómo y cuándo ajustar el tratamiento a los niveles más altos si la respuesta clínica no es la adecuada (evitando los efectos tóxicos secundarios).

Se puede emplear cualquier vía de administración adecuada. Las formas de dosificación incluyen comprimidos, pastillas, papelillos, dispersiones, suspensiones, disoluciones, cápsulas, parches, y similares. Véase, *Pharmaceutical Sciences* de Remington. En casos prácticos, la proteína neuregulina, en solitario o en combinación con otros agentes, se puede combinar como el activo en mezcla íntima con un transportador o excipiente farmacéutico, tal como beta-ciclodextrina y 2-hidroxi-propil-beta-ciclodextrina, según técnicas de elaboración farmacéuticas convencionales. El transportador puede adoptar una forma amplia de preparación requerida para la administración, tópica o parenteral. En la preparación de composiciones para formas de dosificación parenteral, tal como inyección intravenosa o infusión, se puede emplear un medio farmacéutico similar, agua, glicoles, aceites, tampones, azúcar, conservantes, liposomas, y similares, conocidos por los expertos en la técnica. Ejemplos de tales

composiciones parenterales incluyen, pero no se limitan a, dextrosa 5% p/v, disoluciones normales salinas u otras disoluciones. La dosis total de la proteína neuregulina, en solitario o en combinación con otros agentes para administrarse, se puede administrar en un vial de fluido intravenoso, que oscila de a aproximadamente 1 ml a 2000 ml. El volumen del fluido de dilución variará según la dosis total administrada.

- 5 La descripción también proporciona kits para llevar a cabo los regímenes terapéuticos de la invención. Tales kits comprenden en uno o más recipientes, cantidades de la proteína neuregulina eficaces terapéuticamente, en solitario o en combinación con otros agentes, en la forma aceptable farmacéuticamente. Formas farmacéuticas preferidas estarán en combinación con una disolución estéril salina, una disolución de dextrosa, o una disolución tampón, u otro fluido estéril aceptable farmacéuticamente. Alternativamente, la composición se puede liofilizar o desecar; en este caso, el kit comprende además opcionalmente en un recipiente, una disolución aceptable farmacéuticamente, preferiblemente estéril, para reconstituir el complejo para formar una disolución para inyección. Ejemplos de disoluciones aceptables farmacéuticamente son la disolución salina y la dextrosa.

- 10 En otra realización, un kit de la descripción comprende además una aguja o jeringa, preferiblemente envasada en forma estéril, para inyectar la composición, y/o una gasa envasada con alcohol. Se incluyen opcionalmente las instrucciones para la administración de la composición por un médico o por el paciente.

- 15 Como se emplea en la presente memoria, “tratar” y “tratamiento” se refiere a cualquier manera en la que se mejoran o se modifican de otra manera beneficiosa, los síntomas de una afección, trastorno o enfermedad. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutica en términos de una cura parcial o completa de una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. El tratamiento también abarca cualquier uso farmacéutico de las composiciones de la presente memoria.

- 20 Como se emplea en la presente memoria, “insuficiencia cardíaca” significa una anomalía de la función cardíaca donde el corazón no bombea sangre al ritmo necesario para los requerimientos de los tejidos metabolizadores. La insuficiencia cardíaca incluye una amplia variedad de estados de la enfermedad, tal como, la insuficiencia cardíaca congestiva, infarto de miocardio, taquiarritmia, cardiomiopatía hipertrófica familiar, enfermedad cardíaca isquémica, cardiomiopatía dilatada idiopática, miocarditis y similares. La insuficiencia cardíaca se puede producir por un número indefinido de factores que incluyen, sin limitación, formas isquémicas, congénitas, reumáticas, virales, tóxicas o idiopáticas. La hipertrofia cardíaca crónica es un significativo estado de la enfermedad, que es precursor de la insuficiencia cardíaca congestiva y de la parada cardíaca.

- 25 Como se emplea en la presente memoria, “proteína” es sinónimo de “polipéptido” o “péptido”, a menos que el contexto lo determine claramente de otra manera.

Como se emplea en la presente memoria, “plasma” es sinónimo de “suero” a menos que el contexto lo determine claramente de otra manera.

- 30 Como se emplea en la presente memoria, “beneficio a largo plazo” significa un beneficio causado por un tratamiento o intervención que no se puede observar en un corto periodo de tiempo después del tratamiento o intervención. Para pacientes con insuficiencia cardíaca crónica, el beneficio a largo plazo puede ser una mejora de la supervivencia, una reducción de la re-hospitalización o una mejora de los biomarcadores que indican el pronóstico a largo plazo. En algunas realizaciones, el periodo de tiempo para la observación del beneficio es aproximadamente 6 meses. En algunas realizaciones, el periodo de tiempo para la observación del beneficio es aproximadamente 1 año. En algunas realizaciones, el periodo de tiempo para la observación del beneficio es aproximadamente 2 años. Y en otras realizaciones, el periodo de tiempo para la observación del beneficio es aproximadamente 3 años, 5 años, 10 años o más.

- 35 Como se emplea en la presente memoria, “supervivencia” significa el tiempo o probabilidad de que un sujeto pueda permanecer vivo o con vida. Se podría expresar como el tiempo de supervivencia o la tasa de supervivencia. El tiempo de supervivencia es el periodo de tiempo desde el comienzo del diagnóstico o tratamiento hasta el final de la vida. La tasa de supervivencia significa el porcentaje de gente que sobrevive durante un periodo de tiempo dado, después del diagnóstico o tratamiento. Para cada sujeto, el tiempo de supervivencia prolongado por un tratamiento o intervención, podría considerarse como un beneficio. Para un grupo de sujetos o de grandes poblaciones, un tiempo de supervivencia media prolongada o una tasa de supervivencia aumentada, podría considerarse como un beneficio.

- 40 Como se emplea en la presente memoria, “re-hospitalización” significa los tiempos o frecuencia en los que se ingresa al paciente en el hospital en un periodo de tiempo dado. El ingreso en el hospital puede ser causado por todas las afecciones, o estar causado sólo por la misma afección que se está tratando. Para cada sujeto, una reducción de los tiempos de re-hospitalización en un periodo de tiempo dado, podría considerarse como un beneficio. Y para un grupo de sujetos o grandes poblaciones, una reducción del tiempo total o del tiempo medio de las re-hospitalizaciones, podría considerarse como un beneficio.

- 45 Como se emplea en la presente memoria, el “péptido natriurético cerebral N-terminal” o “NT-proBNP” significan la proBNP N-terminal inactiva remanente, la última es la prohormona del BNP, el cual es un péptido natriurético activo hormonalmente que se libera principalmente a partir de los cardiomicitos en la pared ventricular izquierda. En la

reacción de contracción y dilatación de la pared del miocardio, la prohormona proBNP se divide mediante ruptura proteolítica, en BNP y en la NT-proBNP remanente, inactiva hormonalmente.

Los niveles plasmáticos de BNP y NT-proBNP son herramientas prometedoras en el manejo diario de sospechas o establecimientos de la insuficiencia cardíaca. Muchos estudios en el uso de BNP y de NT-proBNP en la práctica clínica han abordado sus propiedades diagnósticas, y está disponible una cantidad cada vez más creciente de pruebas que apoyan el valor pronóstico de la BNP y NT-proBNP. Como la NT-proBNP tiene aproximadamente una vida media en sangre aproximadamente 6 veces mayor que la BNP, es el marcador de diagnóstico o pronóstico de la insuficiencia cardíaca más ampliamente utilizado. El nivel plasmático de NT-proBNP se puede analizar mediante kits comerciales. Con propósitos ejemplarizantes, pero no como limitación, están disponibles los kits comerciales de Roche o Biomedica. En los ejemplos de la presente invención, el nivel de NT-proBNP se detectó mediante un kit de Biomedica (Austria).

Tanto los niveles de BNP como de NT-proBNP en la sangre se emplean para el cribado y diagnóstico de la insuficiencia cardíaca, y son útiles para establecer el pronóstico de la insuficiencia cardíaca, ya que ambos marcadores se encuentran normalmente aumentados en los pacientes con peores resultados. Y, se descubrió en la presente invención que el nivel plasmático de BNP o NT-proBNP es indicativo de que el paciente es adecuado para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca mediante neuregulina. De hecho, cualquier marcador para el diagnóstico o pronóstico de la insuficiencia cardíaca se puede emplear para determinar si un paciente es adecuado para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca mediante neuregulina. El nivel plasmático de NT-proBNP identificado en esta invención se deberá emplear como orientación, y no como una limitación para la selección de los pacientes con insuficiencia cardíaca que recibirán los beneficios significativos del tratamiento con neuregulina. Por ejemplo, empleando un nivel plasmático de 5000 fmol/ml aún será capaz de seleccionar a los pacientes con insuficiencia cardíaca que recibirán los beneficios del tratamiento con neuregulina, pero algunos de estos pacientes recibirán los beneficios del tratamiento en un menor grado.

Como se emplea en la presente memoria, la clasificación de la función cardíaca de la "New York Heart Association" o "NYHA", es una manera simple de clasificar la extensión de la insuficiencia cardíaca. Ésta sitúa a los pacientes en una de las cuatro categorías en base a cómo se ven limitados durante la actividad física; las limitaciones/síntomas se refieren a la respiración normal y a distintos grados de dificultad respiratoria y/o dolor anginoso: I, no hay síntomas y no hay limitación en la actividad física normal, por ejemplo, dificultad respiratoria cuando camina, sube las escaleras, etc; II, síntomas leves (leve dificultad respiratoria y/o angina) y escasa limitación durante la actividad normal; III, marcada limitación en la actividad debido a los síntomas, incluso durante una actividad menor a la normal, por ejemplo, caminando cortas distancias (20-100 m), cómodo sólo con descanso; y IV, limitaciones graves, experimentan síntomas incluso mientras descansan, principalmente los pacientes encamados.

Como se emplea en la presente memoria, "unidad de actividad" o "EU" o "U" significa la cantidad de producto estándar que puede inducir el 50% de la reacción máxima. En otras palabras, para determinar la unidad de actividad de un agente activo dado, se deberá medir la EC50. Por ejemplo, si la EC50 para el lote de un producto fuese 0,1 µg, que sería una unidad. Además, si se está empleando 1 µg del producto, entonces se estarían empleando 10 EU (1/0,1). La EC50 se puede determinar mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo el método empleado por los inventores. Esta determinación de la unidad de actividad es importante para el control de calidad de los productos modificados genéticamente y los fármacos empleados clínicamente, permite que el producto a partir de diferentes fármacos y/o números de lote diferentes, se cuantifiquen con criterios uniformes.

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

Brevemente, el ensayo, llamado ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima por activación del receptor quinasa (KIRA-ELISA), consiste en dos placas de microtitulación separadas, una para el cultivo celular, estimulación del ligando, y la lisis celular/solubilización del receptor, y la otra placa, para la captura del receptor y de la ELISA fosfotirosina. El ensayo se desarrolló por análisis de NRG inducido por la activación de ErbB2 y utiliza la estimulación del receptor intacto en la línea celular de carcinoma de mama adherente, MCF-7. Las proteínas de membrana se solubilizan a través de Triton X-100 de lisis y el receptor se captura en los pocillos ELISA recubiertos con anticuerpos específicos para ErbB2 sin reacción de entrecruzamiento para ErbB3 o ErbB4. Después se cuantificó el grado de fosforilación del receptor mediante ELISA antifosfotirosina. Se generó una curva estándar reproducible con un EC50 de aproximadamente 360pM para heregulina beta 1 (177-244). Cuando se analizan muestras idénticas de HRG beta 1 (177-244) por KIRA-ELISA y se cuantifica la antifosfotirosina por análisis Western Blot, los resultados correlativos están muy próximos el uno con el otro. 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.

Ya que muchos de los medicamentos modificados genéticamente son proteínas y polipéptidos, su actividad se puede determinar mediante sus secuencias de aminoácidos o el centro de actividad formado por su estructura

espacial. El título de actividad de la proteína y del polipéptido no es compatible con su calidad absoluta, por lo tanto, no se puede determinar con unidades de peso como la de los fármacos químicos. Sin embargo, la actividad biológica de los medicamentos modificados genéticamente es generalmente compatible con su farmacodinámica y un sistema de determinación del título establecido a través de una actividad biológica dada, puede determinar su

5 unidad de título. Por lo 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 genéticamente modificado. Es importante determinar los criterios de actividad biológica para el control de calidad de un producto modificado genéticamente y para los fármacos empleados clínicamente.

10 Cuantificar un producto estándar que puede inducir el 50% de la reacción máxima se define como una unidad de actividad (1 EU). Por consiguiente, se puede cuantificar el producto de diferentes medicamentos y de números de lote diferentes, con criterios uniformes.

### Ejemplos

Ejemplo 1: El efecto de la administración de Neucardin<sup>TM</sup> por vías diferentes, sobre la tasa de supervivencia de ratas con insuficiencia cardíaca.

15 Introducción:

En este estudio, se empleó un modelo de insuficiencia cardíaca inducido por la ligadura de la arteria coronaria (CAL, de sus siglas en inglés) para investigar si la administración de Neucardin<sup>TM</sup> por goteo intravenoso, IV, empleando una bomba de micro-inyección o mediante bolo subcutáneo (SC), tenía algún efecto en la tasa de supervivencia y en la hemodinámica cardíaca, 120 días después del inicio de la administración de Neucardin<sup>TM</sup> 4 semanas después de

20 la CAL. También se emplearon el ecocardiograma y la remodelación cardíaca para determinar la función cardíaca y la recuperación de la CAL.

2. Métodos:

2.1. Animales de ensayo:

Cepa, Origen: ratas Wistar, Shanghai SLAC Laboratory Animal CO. LTD; Peso, 200 ± 10 g, macho;

25 2.2 Producto de ensayo:

2.2.1. Neucardin<sup>TM</sup>

Identificación: Neuregulina 1 humana recombinante para inyección (rhNRG-1, Neucardin<sup>TM</sup>)

Número de Lote: 200607009

Fabricante: Zensun (Shanghai) Sci & Tech Co., Ltd

30 Forma de dosificación: Polvo liofilizado

Apariencia: Blanco o blanquecino

Contenido de rhNRG-1 marcado: 250 µg/vial

Actividad específica: 4897 U/vial

Condiciones de almacenamiento: 2~8°C

35 2.2.2 Vehículo:

Identificación: Placebo para neuregulina-1 humana recombinante

Forma de dosificación: Polvo liofilizado

Apariencia: Blanco o blanquecino

Composición: Albúmina sérica humana, manitol, fosfato, NaCl

40 Condiciones de almacenamiento: 2~8°C

2.3 Procedimiento:

2.3.1 Establecer el modelo de rata con insuficiencia cardíaca:

Se ligó el LAD de las ratas. Brevemente, las ratas se anestesiaron con ketamina hidrocloreto (100 mg/kg, IP) y se les afeitó y esterilizó el pecho. Se intubó a las ratas endotraquealmente y se les ventiló mecánicamente con aire de

la habitación (tasa respiratoria 60 respiraciones/min, volumen corriente 20 ml). Después se les realizó una toracotomía izquierda entre el 4<sup>o</sup> y 5<sup>o</sup> espacio intercostal y a continuación se realizó una incisión a lo largo del borde izquierdo del esternón. Después se cortó la cuarta costilla próxima al esternón. Se perforó el saco del pericardio y el corazón quedó expuesto. El LAD se ligó aproximadamente 2 mm desde su origen empleando hilo de seda de sutura de calibre 6-0. Posteriormente, se eliminó el aire dentro del tórax y el pecho se cerró en tres bordes (costillas, músculos y a continuación la piel). Después se permitió a las ratas retomar la respiración espontánea, y recuperarse de la anestesia, y después se les devolvió a sus jaulas. Las ratas se mantuvieron durante un período de 4 semanas, después se evaluó el ecocardiograma, incluido en el estudio formal si mostraba un valor EF% de 30-45%. Se alojaron 5 animales por caja de todos los grupos, se les alimentó a voluntad con una dieta estándar y tuvieron acceso libre a agua pura. La temperatura ambiente se mantuvo a  $21 \pm 1^\circ\text{C}$  y en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas.

### 2.3.2 Bomba de micro-inyección a través de goteo IV:

El método del goteo IV del vehículo de Neucardin<sup>TM</sup> fue a través de la vena caudal. Para este procedimiento, se empleó un dispositivo de inmovilización de la rata apropiado según el peso del animal. La rata se colocó cerca del dispositivo de inmovilización y se le colocó con cuidado en el aparato. Normalmente las ratas entran en el dispositivo de inmovilización sin ayuda. Posteriormente, se frota la cola de la rata con una gasa empapada en alcohol para incrementar el flujo sanguíneo a la vena caudal y al estrato córneo. Se localizaron las dos venas caudales laterales (en los lados) y con el bisel de la aguja hacia arriba, con la aguja casi paralela a la vena, la aguja se insertó 2 mm en la vena caudal a 2-3 cm del final de la cola. Para confirmar que la aguja se hubiese insertado con éxito, se extrajo sangre en el centro de la aguja. La aguja se fijó en la cola usando un cinta adhesiva médica. Se inició la infusión del fármaco o vehículo a la velocidad adecuada (0,2-0,4 ml/h) mediante bomba de micro-inyección o inyección en bolo.

### 2.3.3 Bolo SC

El Bolo SC del vehículo o Neucardin<sup>TM</sup> se realizó desde la espalda de la rata. Para este procedimiento, se empleó un dispositivo de inmovilización de la rata apropiado según el peso del animal. Se frotó la espalda de la rata con una gasa empapada en alcohol para esterilizar la piel. Con el bisel de la aguja hacia arriba, con la aguja casi paralela a la piel, la aguja se insertó subcutáneamente 3-4 cm en la espalda de la rata. La aguja se fijó en la espalda usando una cinta adhesiva médica y se conectó al tubo de perfusión. Después, la rata se colocó cerca del dispositivo de inmovilización y se colocó con cuidado en el aparato. Normalmente las ratas entran en el dispositivo de inmovilización sin ayuda. Tras sujetar el dispositivo de inmovilización, se inició la inyección del bolo.

### 2.3.4 Grupos experimentales e infusión del fármaco:

Las ratas MI se distribuyeron mediante el valor EF% en cuatro grupos, como sigue:

Grupo A (Control negativo) para el bolo IV y el SC. n=58 ratas: goteo IV del vehículo durante 10 días mediante bomba de micro-inyección a una velocidad de 0,2 ml/h durante 8 horas cada día durante los primeros 10 días, bolo SC del vehículo (igual volumen que el Neucardin<sup>TM</sup>), cada 5 días hasta el Día 120;

Grupo B (Neucardin<sup>TM</sup> en bolo SC), n=58: goteo IV del vehículo mediante bomba de micro-inyección a una velocidad de 0,2 ml/h durante 8 horas cada día durante los primeros 10 días, bolo SC de Neucardin<sup>TM</sup> (10 µg/día), cada 5 días hasta el Día 120;

Grupo C (goteo IV de Neucardin<sup>TM</sup>), n=57: goteo IV de Neucardin<sup>TM</sup> (0,625 µg/kg/h) mediante bomba de micro-inyección a una velocidad de 0,2 ml/h durante 8 horas cada día durante los primeros 10 días, bolo SC del vehículo (igual volumen que el Neucardin<sup>TM</sup>), cada 5 días hasta el Día 120;

Grupo D (goteo IV y bolo SC de Neucardin<sup>TM</sup>), n=57: goteo IV de Neucardin<sup>TM</sup> (0,625 µg/kg/h) mediante bomba de micro-inyección a una velocidad de 0,2 ml/h durante 8 horas cada día durante los primeros 10 días, bolo SC del vehículo (igual volumen que el Neucardin<sup>TM</sup>), en el 1<sup>o</sup>, 6<sup>o</sup> y 11<sup>o</sup> día, y después bolo SC de Neucardin<sup>TM</sup> (10 µg/kg), cada 5 días desde el día 16<sup>o</sup> hasta el final.

### 2.3.5 Adquisición de datos

Tasa de supervivencia; Parámetros del ecocardiograma; Parámetros hemodinámicos;

## 3. Resultados

### 3.1 Tasa de supervivencia:

La Tabla 1 ilustra las tasas de supervivencia entre cada Grupo. Las tasas de supervivencia fueron del 48,3%, 62,1%, 64,9% y 82,5% en el goteo IV y el bolo SC del vehículo en el Grupo A, bolo SC de Neucardin<sup>TM</sup> del Grupo B, goteo IV de Neucardin<sup>TM</sup> del Grupo C y goteo IV y bolo SC de Neucardin<sup>TM</sup> del Grupo D, respectivamente. Todas las tasas de supervivencia o tiempo medio de supervivencia de las mortalidades en los Grupos B, C y D eran mejores y más prolongados en comparación con el Grupo A, el Grupo D tenía la mejor eficacia.

Tabla 1: Mortalidad, Tasa de supervivencia y Tiempo medio de supervivencia en los cuatro Grupos

Grupo	Tratamiento	Número inicial de ratas	Muertes	Número de ratas supervivientes	Tasa de supervivencia (%)	Tiempo medio de supervivencia en el día S.E.
A	Vehículo	58	30	28	48,3%	83,8±5,9
B	Bolo SC Neucardin™	58	22	36	62,1%	91,4±5,5
C	Goteo IV Neucardin™	57	20	37	64,9%	97,5±5,1
D	Bolo SC y goteo IV Neucardin™	57	10	47	82,5%	107,5±4,1

## 3.2 Parámetros del ecocardiograma:

5 Los parámetros del ecocardiograma se muestran en la Tabla 2. Cuatro semanas después de la ligadura de la arteria coronaria y antes de la administración del producto de ensayo, las ratas con insuficiencia cardíaca crónica se distribuyeron en cuatro Grupos según sus valores EF%. Como se muestra en la Tabla 2, no hubo diferencias significativas entre los cuatro grupos antes del tratamiento (BT). 120 días después del inicio de la administración, los valores EF% fueron de  $30,7 \pm 3,1$ ,  $32,9 \pm 4,1$ ,  $33,5 \pm 3,4$ ,  $36,2 \pm 4,8\%$  en los Grupos del vehículo, Neucardin™ a través de bolo SC, Neucardin™ a través de goteo IV y Neucardin™ de goteo IV más bolo SC, respectivamente. Después del tratamiento, EF% y FS% del Grupo B, C y D, fueron todos superiores a los del Grupo A.

10

Tabla 2: Parámetros del ecocardiograma en los cuatro Grupos

Grupo		N	LVEDd	LVEDs	EF%	FS <sup>a</sup>
A. Control Negativo	BT	58	0,987±0,083	0,829±0,088	38,0±5,5	16,2±
	AT	25	1,100±0,089	0,961±0,090	30,7±3,1	12,7±
B. Bolo SC Neucardin™	BT	58	0,992±0,066	0,831±0,066	38,2±4,0	16,3±
	AT	33	1,104±0,063	0,952±0,070	33,1±4,1	13,9±
C. Goteo IV Neucardin™	BT	57	0,985±0,061	0,824±0,068	38,5±4,4	16,3±
	AT	36	1,080±0,072	0,929±0,073	33,4±3,4	14,0±
D. Bolo SC y goteo IV Neucardin™	BT	57	0,979±0,065	0,818±0,066	38,7±4,3	16,5±
	AT	44	1,052±0,087	0,893±0,092	36,2±4,8	15,3±

BT: Antes del tratamiento; AT: Después del tratamiento;

## 3.3 Parámetros hemodinámicos:

15 La Tabla 3 muestra los valores MAP, HR,  $\pm dp/dt$ , LVEDP y LVSP como se midieron en los cuatro Grupos de los animales anestesiados en el día 121. Cuando se administró Neucardin™ sólo por bolo SC o por goteo IV (Grupo B y C), Neucardin™ incrementó significativamente  $dp/dt$  y  $-dp/dt$  mediante 19,6% y 27,1%, 22,5% y 29,8%, comparado con el Grupo A. Cuando Neucardin™ se administró tanto por goteo IV como por a través de bolo SC (Grupo D), la presión arterial media aumenta significativamente (MAP,  $112,3 \pm 5,5$  mmHg), la presión sistólica ventricular izquierda (LVSP,  $139,4 \pm 9,8$  mmHg),  $+dp/dt$  ( $7012,1 \pm 903,0$  mmHg/s),  $-dp/dt$  ( $-4353,2 \pm 847,6$  mmHg/s) en comparación con los obtenidos en el vehículo. Curiosamente, estos valores de MAP, LVSP,  $+dp/dt$  y  $-dp/dt$  fueron del 10,6%, 9,2%, 38,5% y 37,8% superiores a los de las ratas tratadas con el vehículo,

20

respectivamente. Los resultados muestran que los parámetros hemodinámicos de los Grupos B, C y D, eran todos mejores que los del Grupo A, y que el grupo D tenía la mejor eficacia.

Tabla 3: Parámetros hemodinámicos en los cuatro Grupos

Grupo	Tratamiento	N	SBP (mmHg)	DBP (mmHg)	MAP (mmHg)	LVSP (mmHg)
A	Vehículo	14	118,7±11,5	94,1±12,3	102,3±11,7	128,5±14,7
B	Bolo SC Neucardin™	27	123,8±11,5	95,3±8,9	104,9±9,5	129,5±13,6
C	Goteo IV Neucardin™	25	122,5±10,5	95,0±7,5	104,4±8,2	131,7±10,0
D	Bolo SC y goteo IV Neucardin™	35	132,6±7,1	102,1±5,3	112,3±5,5	139,4±9,8

  

Grupo	Tratamiento	N	LVEDP (mmHg)	dp/dt (mmHg/s)	(-dp/dt) (mmHg/s)	Ritmo cardíaco (Latido/min)
A	Vehículo	14	5,8±3,5	4995,6±532,2	3087,5±715,7	297,2±16,0
B	Bolo SC Neucardin™	27	4,5±2,8	6050,9±1231,3	4013,8±838,3	292,6±23,0
C	Goteo IV Neucardin™	25	4,0±3,2	6199,9±709,5	4098,9±823,5	296,3±13,5
D	Bolo SC y goteo IV Neucardin™	35	3,9±2,5	7012,1±903,0	4353,2±847,6	292,5±19,1

5

#### 4. Conclusión

Una administración combinada de Neucardin™ por goteo IV y bolo SC o una administración del péptido dado mediante cada vía en solitario, incrementó todas las tasas de supervivencia de las ratas con insuficiencia cardíaca crónica inducida mediante CAL y mejoró los parámetros funcionales cardíacos en comparación con las ratas tratadas con el vehículo.

10

Ejemplo 2: Estudio controlado con placebo, aleatorio, doble ciego, y multicéntrico para evaluar la eficacia y seguridad de la neuregulina 1 humana recombinante en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica basado en un tratamiento estándar

15

Para evaluar la eficacia en la insuficiencia cardíaca crónica de la neuregulina-1 humana recombinante para inyección, se llevó a cabo un estudio en fase II, basado en un tratamiento estándar controlado con placebo, multicéntrico, doble ciego, en varios centros clínicos en China. Se reclutó y distribuyó un total de 195 pacientes con insuficiencia cardíaca crónica estable de Clase II o III según la NYHA dentro de tres grupos: placebo, o con rhNRG-1 0,6 µg/kg y 1,2 µg/kg. No hubo variaciones significativas en las terapias demográficas o antecedentes entre los grupos. Según el programa, a los pacientes se les administró primero el fármaco durante 10 días consecutivos en el hospital, después de finalizar el día 11 se les dio el alta del hospital, y se realizó el seguimiento. Se realizaron otros dos seguimientos en los días 30 y 90. Un año después de reclutar al último paciente se realizó una entrevista telefónica.

20

Producto en investigación:

25

Especificación: Neucardin™, isoforma β2 de la Neuregulina-1 de dominio similar a EGF que comprende un polipéptido de 61 aminoácidos, con el peso molecular de 7054 Dal (1µg=0,14 nmol). 250 µg (5000 EU)/vial (1µg=20 EU).

Preparación: Para inyección.

Modo de administración: Goteo intravenoso.

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

Placebo:

Especificación: Excipiente para Neucardin<sup>TM</sup> (250 µg/vial sin proteína neuregulina-1 humana recombinante activa).

Grupos de dosificación:

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

## 5 Procedimiento del estudio

Los criterios para la participación en el estudio incluyeron a pacientes con insuficiencia cardíaca crónica (Clase II o III de la NYHA) con edades entre 18 y 65 años, LVEF  $\leq$ 40%, en una condición clínica relativamente estable (que incluye signos y síntomas clínicos, y un tratamiento estándar aceptado para la insuficiencia cardíaca crónica en la dosis diana o dosis de máxima tolerancia de más de 1 mes). Los criterios importantes de exclusión incluyen infarto de miocardio agudo, cardiomiopatía hipertrófica, pericarditis constrictiva, enfermedad valvular significativa o enfermedad cardíaca congénita, hipertensión pulmonar grave, presión sanguínea sistólica  $<$ 90mmHg o  $>$ 160mmHg, arritmia ventricular grave, cirugía cardíaca o un evento cerebrovascular dentro de los seis meses previos, claustrofobia o mujeres embarazadas. Todos los pacientes dieron su consentimiento por escrito.

Los pacientes fueron asignados aleatoriamente en tres grupos, se trataron con placebo o rhNRG-1 (0,6 ó 1,2 µg/kg/día) durante 10 días consecutivos, después de finalizar el día 11 se realizó el seguimiento, y se les dio el alta del hospital. Se realizaron otros dos seguimientos en el día 30 y el día 90. Se tomaron muestras de sangre de cada paciente antes del tratamiento y en los días 11, 30 y 90. Se evaluó el NT-proBNP plasmático en el laboratorio con ensayos NT-proBNP (kit de Biomedica). Un año después de reclutar al último paciente, se realizó una entrevista telefónica para recoger la información de las re-hospitalizaciones, todas las entrevistas telefónicas se grabaron en una forma especial con la firma de los investigadores.

De los 48 pacientes con información de re-hospitalización disponible en el grupo placebo, 12 (25,0%) fueron re-hospitalizados al menos una vez por empeoramiento de la insuficiencia cardíaca. Para el grupo de 0,6 µg/kg, sólo 4 (8,7%) de los 46 pacientes reingresaron en el hospital ( $P=0,05$  en comparación con el placebo); la tasa de re-hospitalización del grupo con 1,2 µg/kg fue del 22,0% (11/50). Los tiempos medios de re-hospitalización fueron de 0,458 (22/48) por paciente en el grupo placebo, mientras que se redujeron al 57,4% y 17,0% respectivamente en el grupo de 0,6 (8/41) y de 1,2 µg/kg (19/50).

En el grupo placebo, la NT-proBNP era casi la misma durante el estudio comparado con la referencia. En el día 11, la NT-proBNP era significativamente inferior en los grupos tratados con rhNRG-1 (de  $1853\pm 1512$  a  $2399\pm 1841$  fmol/ml en el grupo de 0,6 µg/kg,  $P<0,01$ ; de  $1562\pm 1275$  a  $2774\pm 1926$  fmol/ml en el grupo de 1,2 µg/kg,  $P<0,01$ ). Pero su incremento era transitorio y no fue causado por un empeoramiento de la función cardíaca, como se mostró en el aumento de la función cardíaca, la NT-proBNP descendió hasta el nivel de referencia en el día 30 y en el día 90 en el grupo de 1,2 µg/kg. Por otra parte, en el grupo de 0,6 µg/kg, la NT-proBNP se redujo significativamente en el día 30 ( $1323\pm 1124$  fmol/ml,  $P=0,01$ ) y en el día 90 ( $1518\pm 1403$  fmol/ml,  $P=0,01$ ) cuando se le compara a la referencia.

Estos resultados mostraron que el tratamiento con rhNRG-1 puede reducir las re-hospitalizaciones y el nivel plasmático de NT-proBNP, que puede indicar que rhNRG-1 puede proporcionar beneficios a largo plazo en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica.

Ejemplo 3: Estudio de supervivencia controlado con placebo, aleatorio, doble ciego y multicéntrico de la neuregulina 1 humana recombinante en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica basado en un tratamiento estándar

Para evaluar la eficacia en la insuficiencia cardíaca crónica de la neuregulina-1 humana recombinante para inyección, se llevó a cabo un estudio en fase II, basado en un tratamiento estándar controlado con placebo, multicéntrico, doble ciego, en varios centros clínicos en China. Se reclutó y distribuyó un total de 351 pacientes con insuficiencia cardíaca crónica estable de Clase III o IV según la NYHA en el grupo placebo o en el grupo rhNRG-1 (0,6 µg/kg). No hubo variaciones significativas en las terapias demográficas o antecedentes entre los grupos. Según el programa, a los pacientes se les administró primero el fármaco durante 10 días consecutivos en el hospital, después de finalizar el día 11 se les dio el alta del hospital, y se les administró el fármaco una vez a la semana de la 3ª semana a la 25ª semana como pacientes ambulatorios. Se tomaron muestras de sangre de cada paciente antes del tratamiento (referencia) y en cada seguimiento. Se evaluó el nivel plasmático de NT-proBNP en el laboratorio con

ensayos de NT-proBNP (kit de Biomedica). La información sobre la supervivencia se tomó en la 52ª semana del estudio.

Producto de investigación:

5 Especificación: Neucardin™, isoforma β2 de la Neuregulina-1 de dominio similar a EGF que comprende un polipéptido de 61 aminoácidos, con el peso molecular de 7054 Dal (1μg=0,14 nmol). 250 μg (5000 EU)/vial (1μg=20 EU).

Preparación: Para inyección.

Modo de administración: Goteo intravenoso o infusión.

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

10 Placebo:

Especificación: Excipiente para Neucardin™. (250 μg/vial sin proteína neuregulina-1 humana recombinante activa).

Dosificación y regímenes:

	Día 1-10	Semana 3-25
Dosis	0,6 μg/kg/día rhNRG-1 o placebo	0,8 μg/kg/día rhNRG-1 o placebo
Vía	Goteo intravenoso	Infusión intravenosa
Régimen	10 horas por día durante 10 días	Infusión de 10 minutos a la semana

15 Los criterios para la participación en el estudio incluyeron a pacientes con insuficiencia cardíaca crónica (Clase III o IV de la NYHA) con edades entre 18 y 80 años, LVEF ≤40%, en una condición clínica relativamente estable (que incluye signos y síntomas clínicos, y un tratamiento estándar aceptado para la insuficiencia cardíaca crónica en la dosis diana o dosis de máxima tolerancia de más de 1 mes). Los criterios importantes de exclusión incluyen infarto de miocardio agudo, cardiomiopatía hipertrófica, pericarditis constrictiva, enfermedad valvular significativa o enfermedad cardíaca congénita, hipertensión pulmonar grave, presión sanguínea sistólica <90 mmHg o >160  
20 mmHg, arritmia ventricular grave, cirugía cardíaca o un evento cerebrovascular dentro de los seis meses previos, claustrofobia o mujeres embarazadas. Todos los pacientes dieron su consentimiento por escrito.

La mortalidad en general en el grupo placebo en la semana 52 es del 15,91%, con 28 muertes en 176 pacientes, mientras que el número es de 9,71% en el grupo rhNRG-1, con 16 muertes en 175 pacientes terminado el ensayo (Cociente de riesgo=0,425, 95%CI 0,222-0,813, p=0,0097). Teniendo en cuenta la mortalidad a causa de acontecimientos cardiovasculares, el número es de 14,77% en el grupo placebo en la semana 52, con 26 muertes en 176 pacientes, y 9,71% en el grupo rhNRG-1. A partir de los resultados se pueden encontrar alrededor del 40% de descenso de la mortalidad en el grupo con administración de rhNRG-1 en comparación con el grupo placebo, incluso cuando el grupo placebo mantenía su tratamiento estándar previo para la insuficiencia cardíaca crónica.

30 También se analizó la mortalidad en general en base a la clasificación de la NT-proBNP de referencia. Cuando el nivel de NT-proBNP se clasifica en tres grupos como ≤1600 fmol/ml, >1600 fmol/ml y ≤4000 fmol/ml, o >4000 fmol/ml, la mortalidad del grupo rhNRG-1 frente al grupo placebo es 1,49% frente a 8,49%, 8,96% frente a 23,33%, y 26,67% frente a 28,00%, respectivamente. Y si el nivel de NT-proBNP se clasifica como ≤4000 fmol/ml o >4000 fmol/ml, la mortalidad del grupo de rhNRG-1 frente al grupo placebo es 5,22% frente 14,89% (p=0,0092), y 26,67% frente 28,00%, respectivamente. Estos resultados muestran una relevancia estadística de que rhNRG-1 puede  
35 mejorar eficazmente la supervivencia de los pacientes con insuficiencia cardíaca crónica.

Además, los pacientes se clasificaron según su clase de función cardíaca de referencia de la NYHA, por ser de la clase III o clase IV. La mortalidad en general de los pacientes de Clase III en el grupo rhNRG-1 o grupo placebo es de 6,06% (8 muertes en 132 pacientes) y 15,49% (22 muertes en 142 pacientes), respectivamente, p=0,0189. Mientras que la mortalidad en general de los pacientes de clase IV en el grupo rhNRG-1 o grupo placebo es de  
40 20,93% (9 muertes en 43 pacientes) y 17,65% (6 muertes en 34 pacientes), respectivamente, p=0,7789.

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> ZENSUN (SHANGHAI) SCIENCE AND TECHNOLOGY, Co., Ltd.  
 <120> COMPOSICIONES Y METODOS PARA TRATAR LA INSUFICIENCIA CARDIACA  
 <130> 103508PCEPT1

10 <150> PCT/CN2011/081699  
 <151> 02-11-2011

<150> PCT/CN2011/001691  
 <151> 10-10-2011

15 <160> 2  
 <170> PatentIn versión 3.5

20 <210> 1  
 <211> 61  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

25 <400> 1  
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn  
 1 5 10 15  
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr  
 20 25 30  
 Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr  
 35 40 45  
 Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr Gln  
 50 55 60

30 <210> 2  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2  
 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

35

**REIVINDICACIONES**

1. Neuregulina para usar en un método para tratar la insuficiencia cardíaca crónica en un paciente, donde el paciente tiene un nivel plasmático de NT-proBNP de  $\leq 1600$  fmol/ml.
- 5 2. La neuregulina para el uso de la reivindicación 1, donde la neuregulina es neuregulina-1; o donde la neuregulina comprende el dominio similar a EGF de neuregulina-1; o donde la neuregulina comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1.
3. La neuregulina para el uso de la reivindicación 1 ó 2, donde la insuficiencia cardíaca crónica es causada por factores isquémicos, congénitos, reumáticos, idiopáticos, virales o tóxicos.
- 10 4. La neuregulina para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el método comprende además administrar al menos un fármaco para la insuficiencia cardíaca.
5. La neuregulina para el uso según la reivindicación 4, donde al menos un fármaco para la insuficiencia cardíaca se selecciona de un grupo que consiste en: inhibidores de la ACE,  $\beta$ -bloqueantes, ARBs, diuréticos, y digitálicos.
- 15 6. La neuregulina para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el beneficio a largo plazo del método se indica mediante el nivel de expresión de un biomarcador para el diagnóstico o pronóstico de la insuficiencia cardíaca.
7. La neuregulina para el uso según la reivindicación 6, donde el biomarcador es NT-proBNP o BNP.
8. La neuregulina para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la neuregulina se administra a los pacientes durante un régimen de introducción.
- 20 9. La neuregulina para el uso de la reivindicación 8, donde el régimen de introducción incluye una administración de neuregulina durante al menos 3, 5, 7 ó 10 días consecutivos.
10. La neuregulina para el uso según la reivindicación 8 ó 9, donde la neuregulina se administra a los pacientes durante un régimen de mantenimiento después del régimen de introducción.
- 25 11. La neuregulina para el uso según la reivindicación 10, donde el régimen de mantenimiento incluye una administración de neuregulina cada 3, 5, 7 ó 10 días.
12. Un método para seleccionar un paciente con insuficiencia cardíaca para tratar mediante neuregulina, donde el método comprende:
  - (i) realizar un ensayo *in vitro* del nivel plasmático de NT-proBNP antes del tratamiento, y
  - 30 (ii) decidir si el resultado del ensayo es indicativo para el tratamiento mediante neuregulina,
 donde el resultado del ensayo es indicativo para el tratamiento mediante neuregulina cuando el nivel plasmático de NT-proBNP es  $\leq 1600$  fmol/ml.
13. El método de la reivindicación 12, donde la neuregulina es neuregulina-1; o donde la neuregulina comprende el dominio similar a EGF de neuregulina-1; o donde la neuregulina comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1.
- 35