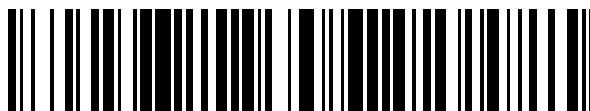


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 875**

51 Int. Cl.:
C07K 14/475 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)
C12N 15/74 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01941609 .8**
96 Fecha de presentación: **23.05.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1289553**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.03.2003**

54 Título: **MOLECULAS DE ÁCIDO NUCLEICO NRG-2, POLIPÉPTIDOS Y MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO Y TERAPÉUTICOS.**

30 Prioridad:
23.05.2000 US 206495 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.12.2011

73 Titular/es:
Acorda Therapeutics, Inc.
15 Skyline Drive
Hawthorne, NY 10532, US

72 Inventor/es:
MARCHIONNI, Mark, A.

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

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).

ES 2 370 875 T3

DESCRIPCIÓN

Moléculas de ácido nucleico NRG-2, polipéptidos y métodos de diagnóstico y terapéuticos

Campo de la Invención

La invención se refiere a las neurregulinas y a los métodos para su uso.

5 Antecedentes de la Invención

Las neurregulinas (NRGs) y sus receptores constituyen un sistema factor de crecimiento-receptor con actividad de tirosina quinasa para la señalización célula-célula que se ha implicado en la organogénesis en el nervio, músculo, epitelios, y otros tejidos (Lemke, *Mol. Cell. Neurosci.* 7: 247-262, 1996; Burden *et al.*, *Neuron* 18: 847-855, 1997). Los tres genes de NRG conocidos, *NRG-1*, *NRG-2*, y *NRG-3*, están localizados en distintos loci cromosómicos (Pinkas-Kramarski *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9387-91, 1994; Carraway *et al.*, *Nature* 387: 512-516, 1997; Chang *et al.*, *Nature* 387:509-512, 1997; y Zhang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 9562-9567, 1997), y codifican colectivamente una serie diversa de proteínas NRG. La familia de proteínas NRG incluye al menos 20 (y quizás 50 o más) isoformas secretadas y asociadas a membranas que contienen dominios similares al factor de crecimiento epidérmico (EGFL), inmunoglobulina (Ig), y otros dominios reconocibles.

La mayoría de las proteínas NRG estudiadas a fondo hasta la fecha son los productos génicos de *NRG-1*, lo que incluye un grupo de aproximadamente 15 isoformas diferentes relacionadas estructuralmente (Lemke, *Mol. Cell. Neurosci.* 7: 247-262, 1996 y Peles y Yarden, *BioEssays* 15: 815-824, 1993). Las isoformas de *NRG-1* incluyen el factor de diferenciación Neu (NDF; Peles *et al.*, *Cell* 69, 205-216, 1992 y Wen *et al.*, *Cell* 69, 559-572, 1992), la Herregulina (HRG; Holmes *et al.*, *Science* 256: 1205-1210, 1992), la actividad de inductor del receptor de acetilcolina (ARIA; Falls *et al.*, *Cell* 72: 801-815, 1993), y los factores de crecimiento gliales GGF1, GGF2, y GGF3 (Marchionni *et al.*, *Nature* 362: 312-8, 1993).

El gen *NRG-2* se identificó mediante clonación por homología (Chang *et al.*, *Nature* 387:509-512, 1997; Carraway *et al.*, *Nature* 387:512-516, 1997; y Higashiyama *et al.*, *J. Biochem.* 122: 675-680, 1997) y por medio de aproximaciones genómicas (Busfield *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 17:4007-4014, 1997). Las isoformas de *NRG-2* incluyen el activador de erbB quinastas derivado de neuronas y timo (NTAK; N° de acceso de Genbank AB005060), Divergente de Neurregulina (Don-1), y del factor de crecimiento derivado de cerebelo (CDGF; solicitud PCT WO 97/09425). Las células que expresan los receptores erbB4 o erbB2/erbB4 pueden mostrar una respuesta especialmente intensa hacia *NRG-2* (Pinkas-Kramarski *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 18: 6090-6101, 1998). También se sabe que el producto del gen *NRG-3* (Zhang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 9562-9567, 1997) se une y activa los receptores erbB4 (Hijazi *et al.*, *Int. J. Oncol.* 13:1061-1067, 1998).

El dominio de EGFL, presente en el núcleo de las isoformas de NRG, es necesario para la unión y la activación de los receptores de NRG, que pertenecen a la familia de receptores de factores de crecimiento epidérmico (EGFR), e incluyen EGFR (o erbB1), erbB2, erbB3, y erbB4, también conocidos como HER1 a HER4, respectivamente, en seres humanos (Meyer *et al.*, *Development* 124: 3575-3586, 1997; Orr-Urtreger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1867-71, 1993; Marchionni *et al.*, *Nature* 362: 312-8, 1993; Chen *et al.*, *J. Comp. Neurol.* 349: 389-400, 1994; Corfas *et al.*, *Neuron* 14: 103-115, 1995; Meyer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:1064-1068, 1994; y Pinkas-Kramarski *et al.*, *Oncogene* 15: 2803-2815, 1997). La unión de afinidad elevada de las NRGs puede estar mediada principalmente por los receptores erbB3 o erbB4. La unión de los ligandos NRG conduce a la dimerización con otras subunidades de erbB y a la transactivación mediante la fosforilación de residuos de tirosina específicos.

Las proteínas NRG tienen diversas propiedades biológicas, lo que las hace potencialmente útiles en el desarrollo de terapias nuevas para una amplia diversidad de enfermedades y trastornos.

Sumario de la Invención

Según la presente invención, se proporcionan polipéptidos, ácidos nucleicos, vectores, células, animales transgénicos y métodos tal como se expone en las reivindicaciones.

Se describe un método para incrementar la mitogénesis, la supervivencia, el crecimiento, o la diferenciación de una célula administrando un polipéptido NRG-2 a la célula en una cantidad eficaz para incrementar la mitogénesis, la supervivencia, el crecimiento, o la diferenciación de la célula, en el que la célula expresa un receptor erbB que es selectivo para un polipéptido NRG-2. En este método, se prefiere que el receptor erbB sea un homodímero de erbB4, un heterodímero de erbB2/erbB4, o un heterodímero de erbB1/erbB3. Se prefiere además que la célula sea una célula neuronal, una célula progenitora neuronal, una célula asociada a neuronas, o una célula muscular. En otros métodos preferidos, la célula asociada a neuronas es una célula de Schwann, un astrocito, un oligodendrocito, una célula progenitora O-2A, una célula glial, una célula microglial, una célula glial del bulbo olfatorio, o una célula de un órgano sensorial, y la célula muscular es un mioblasto, una célula satélite, un miocito, una célula de músculo esquelético, una célula de músculo liso, o una célula de músculo cardíaco.

También se describe un método para estimular la mitogénesis de una célula glial poniendo en contacto la célula glial con un polipéptido NRG-2 recombinante. En este método se prefiere que la célula glial sea un oligodendrocito, una célula microglial, una célula glial mielinizante, una célula glial del bulbo olfatorio, o una célula glial en un adulto.

5 También se describe un método para inducir la mielinización de una célula neuronal por una célula glial poniendo en contacto la célula glial con un polipéptido NRG-2, de manera que el contacto es suficiente para inducir la mielinización de la célula neuronal por la célula glial.

10 También se describe un método para incrementar la supervivencia de los cardiomiocitos, la proliferación de los cardiomiocitos, el crecimiento de los cardiomiocitos, o la diferenciación de los cardiomiocitos, en un mamífero que lo necesita, administrando un polipéptido NRG-2 al mamífero en una cantidad eficaz para incrementar la supervivencia de los cardiomiocitos, la proliferación de los cardiomiocitos, el crecimiento de los cardiomiocitos, o la diferenciación de los cardiomiocitos. Se prefiere que el mamífero sea un ser humano. Se prefiere además que el mamífero tenga una afección fisiopatológica que afecte al músculo cardíaco, por ejemplo, cardiomiopatía (p.ej., una enfermedad congénita degenerativa), traumatismo cardíaco, insuficiencia cardíaca, o lesión isquémica, o que el mamífero tenga una afección fisiopatológica que afecte al músculo liso, por ejemplo, aterosclerosis, lesión vascular, hipertensión vascular, o enfermedad vascular congénita degenerativa. Se prefiere además que el mamífero sea un paciente con miastenia gravis.

20 También se describe un método para influir en la comunicación celular entre una célula asociada a neuronas y una célula neuronal en un mamífero administrando un polipéptido NRG-2 al mamífero, de manera que la neurregulina interacciona con la célula asociada a neuronas, lo que da como resultado la producción de al menos un agente neurotrófico por la célula asociada a neuronas, y el agente o agentes neurotróficos influyen en la mitogénesis, la supervivencia, el crecimiento, la diferenciación, o el crecimiento de neuritas de la célula neuronal. Se prefiere que el mamífero sea un ser humano. Se prefiere además que la célula asociada a neuronas sea una célula de Schwann, un astrocito, un oligodendrocito, una célula progenitora O-2A, una célula glial, una célula glial del bulbo olfatorio, una célula microglial, una célula de un órgano sensorial, o una célula muscular (p.ej., una célula de músculo esquelético, una célula de músculo liso, o una célula de músculo cardíaco). Se prefiere además influir en la comunicación celular en el sistema nervioso central o en el sistema nervioso periférico de un mamífero. Se prefiere además que la administración incluya administrar una célula que produce un polipéptido NRG-2 purificado.

30 También se describe un método para el tratamiento o la profilaxis de una afección fisiopatológica del sistema nervioso en un mamífero, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido NRG-2 recombinante al mamífero. Se prefiere que la afección fisiopatológica sea una afección del sistema nervioso periférico o del sistema nervioso central; la afección fisiopatológica es la desmielinización de las células nerviosas, la lesión de las células de Schwann, la pérdida de las células de Schwann, o un trastorno neurodegenerativo; la afección fisiopatológica es una neuropatía periférica (p.ej., una neuropatía de las fibras nerviosas sensoriales, una neuropatía de las fibras motoras, o ambas); o la afección fisiopatológica es esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, atrofia muscular espinal, lesión de un nervio, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, ataxia cerebelar, o lesión de la médula espinal. Se prefiere que el tratamiento o la profilaxis requieran la regeneración neuronal o la reparación neuronal. Se prefiere que el polipéptido NRG-2 interaccione con las células asociadas a neuronas, lo que da como resultado la producción de al menos un agente neurotrófico por las células asociadas a neuronas, y el agente o agentes neurotróficos influyen en la actividad mitótica, la supervivencia, la diferenciación o el crecimiento de neuritas de las células neuronales. Se prefiere que la administración sea suficiente para inducir la mielinización de una célula neuronal por una célula glial (p.ej., una célula de Schwann o un oligodendrocito). Se prefiere que la administración incluya administrar una célula que produce un polipéptido NRG-2 purificado al mamífero. La célula que produce el polipéptido NRG-2 de la invención puede contener una secuencia de ADN recombinante, en la que la secuencia de ADN incluye una secuencia que codifica un polipéptido NRG-2, y en la que la secuencia de ADN que codifica el polipéptido NRG-2 está unida de forma operable a un promotor.

45 También se describe un método para el tratamiento de un tumor (p.ej., un tumor glial) inhibiendo la proliferación de una célula tumoral mediante la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo, que inhibe la unión de un polipéptido NRG-2 a un receptor presente en la superficie de la célula tumoral, a un sujeto que necesita tal tratamiento. Se prefiere que la célula tumoral exprese un receptor erbB que es selectivo para un polipéptido NRG-2.

50 También se describe un método para el tratamiento de la neurofibromatosis mediante la inhibición de la mitogénesis de las células gliales administrando una cantidad eficaz de un anticuerpo, que inhibe la unión de un polipéptido NRG-2 a un receptor presente en la superficie de la célula tumoral glial en un individuo con neurofibromatosis, a un sujeto que necesita tal tratamiento.

55 También se describe un método para inhibir la proliferación de una célula poniendo en contacto la célula con una cantidad eficaz de un anticuerpo que inhibe la unión de un polipéptido NRG-2 a un receptor presente en la superficie de la célula.

También se describe un método para estimular la proliferación de una célula mediante la administración de un polipéptido NRG-2 a la célula.

Se prefiere que la célula sea una célula neuronal, una célula asociada a neuronas, o una célula muscular.

El polipéptido NRG-2 de cualquiera de las descripciones anteriores puede incluir, o consistir en, las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID N°s: 2 ó 4, o puede estar codificado por las secuencias de ácidos nucleicos expuestas en SEQ ID N°s: 1 ó 3.

- 5 La invención proporciona un polipéptido NRG-2 sustancialmente puro que consiste en las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID N°s: 2 ó 4. La invención proporciona además una molécula de ácido nucleico sustancialmente pura que incluye una secuencia que codifica un polipéptido con las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID N°s: 2 ó 4. En las realizaciones preferidas, la invención proporciona un vector (p.ej., un vector para terapia génica) que incluye la molécula de ácido nucleico de la invención unida de forma operable a un promotor; una célula
10 que contiene un vector para terapia génica que contiene la molécula de ácido nucleico de la invención; y un animal transgénico no humano que contiene la molécula de ácido nucleico de la invención.

- Además, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico sustancialmente pura que contiene, o que consiste en, una secuencia de ácido nucleico que es sustancialmente idéntica a las secuencias de ácidos nucleicos expuestas en SEQ ID N°s: 1 ó 3. Además, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico que incluye una
15 secuencia que es inversa respecto de la secuencia de la cadena codificante de la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID N°s: 1 ó 3, o un fragmento de la misma.

Además, la invención proporciona un animal no humano que tiene una mutación por inactivación génica en uno o ambos alelos que codifican el polipéptido NRG-2 que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID N°s: 2 ó 4. En una realización preferida, la invención proporciona una célula del animal no humano.

- 20 Además, se describe un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido NRG-2 que incluye las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID N°s: 2 ó 4. También se describe un método para detectar la presencia de un polipéptido NRG-2 en una muestra poniendo en contacto la muestra con el anticuerpo, y ensayando la unión del anticuerpo al polipéptido. Se prefiere proporcionar un equipo para el análisis de un polipéptido NRG-2 de un sujeto de ensayo, en el que el equipo incluye el anticuerpo.

- 25 También se describe un método para diagnosticar una probabilidad incrementada de desarrollar una enfermedad o afección relacionada con NRG-2 en un sujeto de ensayo (p.ej., un ser humano) analizando las moléculas de ácido nucleico del sujeto de ensayo, para determinar si el sujeto de ensayo contiene una mutación en el gen *NRG-2* que codifica un polipéptido NRG-2 que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID N°s: 2 ó 4, en la que la presencia de la mutación es una indicación de que el sujeto de ensayo tiene una probabilidad incrementada de
30 desarrollar una enfermedad relacionada con NRG-2.

- "Neuregulina" o "NRG" significa un polipéptido que está codificado por un gen o molécula de ácido nucleico de NRG-1, NRG-2, o NRG-3 (p.ej., un cADN), y se une y activa un receptor erbB o combinaciones de los mismos. En general, una neuregulina posee dominios reconocibles, tales como un dominio similar al factor de crecimiento epidérmico (EGFL), que se une y activa un receptor erbB o combinaciones de los mismos, y un dominio de inmunoglobulina (Ig). Un dominio de EGFL contiene una similitud estructural respecto del dominio de unión del receptor de EGF tal como se describe en Holmes *et al.* (*Science* 256:1205-1210, 1992), patente de EE.UU. n° 5.530.109, patente de EE.UU. n° 5.716.930, n° de serie de EE.UU. 08/461.097, Hijazi *et al.* (*Int. J. Oncol.* 13:1061-1067, 1998), Chang *et al.* (*Nature* 387:509-512, 1997), Carraway *et al.* (*Nature* 87:512-516, 1997), Higashiyama *et al.* (*J. Biochem.* 122: 675-680, 1997), y la publicación PCT WO 97/09425.

- 40 "Neuregulina 2" o "NRG-2" significa un polipéptido codificado por un gen *NRG-2*, o una molécula de ácido nucleico de NRG-2, y se describe en la presente memoria descriptiva, y, por ejemplo, en Carraway *et al.*, *Nature* 387: 512-516, 1997; Chang *et al.*, *Nature* 387: 509-511, 1997; Higashiyama *et al.*, *J. Biochem.* 122: 675-680, 1997; y Busfield *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 17:4007-4014, 1997. Las isoformas de NRG-2 incluyen el activador derivado de neuronas y de timo de las ErbB quinasas (NTAK; n° de acceso de Genbank AB005060; Higashiyama *et al.*, *J. Biochem.* 122: 675-680, 1997), Divergente de Neuregulina (don-1; publicación PCT WO 98/07736), y factor de crecimiento derivado de cerebelo (CDGF; publicación PCT WO 97/09425; pat. de EE.UU. n° 5.912.326), incorporados como referencia en la presente memoria, y las moléculas de NRG-2 descritas en la presente memoria. En general, el receptor erbB 1 (EGFR) es una molécula de dimerización preferida para un polipéptido NRG-2. Las combinaciones de receptores preferidas para los polipéptidos NRG-2 son los homodímeros de erbB4, los heterodímeros de erbB2/erbB4, o los heterodímeros de erbB1/erbB3. Un polipéptido o molécula de ácido nucleico de CDGF, don-1, o NTAK, tal como se exponen en las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos descritas en Higashiyama *et al.*, *J. Biochem.* 122: 675-680, 1997, los documentos WO 98/07736, WO 97/09425, y la pat. de EE.UU. n° 5.912.326, se pueden excluir específicamente de ciertos aspectos de la invención. Por ejemplo, se puede excluir uno o más de un polipéptido o molécula de ácido nucleico de CDGF, don-1, o NTAK, de los métodos para incrementar la mitogénesis, la supervivencia, el crecimiento, o la diferenciación de una célula; para incrementar la supervivencia de los cardiomiocitos, la proliferación de los cardiomiocitos, la hipertrofia de los cardiomiocitos, o la diferenciación de los cardiomiocitos en un mamífero; para influir en la comunicación celular entre una célula asociada a neuronas y una célula neuronal; para estimular la mitogénesis de una célula glial; para inducir la mielinización de una célula neuronal por una célula glial; para el tratamiento o la profilaxis de una afección fisiopatológica del sistema nervioso en un mamífero; para el trata-
55

miento de un tumor; para el tratamiento de la neurofibromatosis; para inhibir la proliferación de una célula; o para estimular la proliferación de una célula.

"Receptor erbB" significa erbB1 (EGFR), erbB2, erbB3, y erbB4 (también HER-1, HER-2, HER-3, y HER-4 de seres humanos) que existen en forma de receptores con actividad de tirosina quinasa de la superficie celular monoméricos o multiméricos (p.ej., homodiméricos o heterodiméricos) que se unen a, y/o que son activados por, una o más neurorregulinas (Meyer *et al.*, *Development* 124: 3575-3586, 1997; Orr-Urtreger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1867-71, 1993; Marchionni *et al.*, *Nature* 362: 312-8, 1993; Chen *et al.*, *J. Comp. Neurol.* 349: 389-400, 1994; Corfas *et al.*, *Neuron* 14: 103-115, 1995; Meyer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:1064-1068, 1994; y Pinkas-Kramarski *et al.*, *Oncogene* 15: 2803-2815, 1997). Preferiblemente, los receptores de erbB son homodímeros de erbB4, heterodímeros de erbB2/erbB4, heterodímeros de erbB1/erbB3, o cualquier combinación de receptores que sea selectiva para un polipéptido NRG-2 sobre un polipéptido NRG-1 o un polipéptido NRG-3.

"Selectivo" significa la unión preferente de un receptor erbB o combinación del mismo a un polipéptido NRG-2 sobre un polipéptido NRG-1 o NRG-3. Más específicamente, la unión preferente se define como un incremento de la afinidad de un receptor erbB hacia un polipéptido NRG-2 de al menos 1,5 veces, más preferiblemente al menos 2 veces, respecto de la afinidad de un receptor erbB hacia un polipéptido NRG-1 o NRG-3.

"Célula neuronal" significa una neurona, célula nerviosa, neurocito, o célula progenitora neuronal. Una célula neuronal es la unidad morfológica y funcional del sistema nervioso central y del sistema nervioso periférico, e incluye las neuronas colinérgicas y no colinérgicas.

"Célula asociada a neuronas" significa cualquier célula no neuronal que es capaz de influir en la función de una neurona, o cuya función se puede ver influida por una neurona. Una célula asociada a neuronas incluye, pero sin limitación, una célula muscular o una célula de soporte del sistema nervioso, que incluye una célula de Schwann, un astrocito, un oligodendrocito, una célula progenitora O-2A, una célula glial (p.ej., una célula glial radial o una célula glial de Bergmann), una célula microglial, una célula glial del bulbo olfatorio, o una célula de un órgano sensorial (p.ej., una célula retiniana).

"Célula muscular" significa cualquier célula que contribuye al tejido muscular. El tejido muscular es un tejido primario, que consiste principalmente en células contráctiles especializadas, y se clasifica generalmente como músculo esquelético, músculo cardíaco, o músculo liso. Los mioblastos, las células satélite, los miotubos, los miocitos (p.ej., cardiomiocitos), y los tejidos de miofibrillas están todos incluidos en la expresión "células musculares", y se pueden tratar todos según los métodos de la invención. Se pueden inducir efectos sobre las células musculares dentro del músculo esquelético, cardíaco, y liso.

"Agente neurotrófico" o "factor neurotrófico" significa una sustancia que provoca un efecto trófico en una o más células neuronales. Estos efectos incluyen, pero sin limitación, la supervivencia, la mitosis, y la diferenciación. Los agentes neurotróficos incluyen, pero sin limitación, las neurotrofinas, el factor de crecimiento nervioso, el factor neurotrófico ciliar, y el factor neurotrófico derivado de cerebro.

"Influir" significa la inducción de un cambio cuantitativo en la respuesta de una célula seleccionada como objetivo, como resultado de una interacción con un polipéptido o molécula de ácido nucleico de NRG-2.

"Comunicación celular" significa la síntesis de una sustancia (p.ej., un agente neurotrófico) en un primer tipo de células (p.ej., una célula asociada a neuronas) y la interacción de esa sustancia con un segundo tipo de células (p.ej., una célula neuronal), de manera que la sustancia provoca un cambio en el primer o el segundo tipo de células. La comunicación celular incluye, pero sin limitación, la secreción de la sustancia a partir de una célula. La comunicación celular se puede dar de manera recíproca o no recíproca con uno o más tipos de células.

"Mitogénesis" significa cualquier división celular que da como resultado la producción de células nuevas en el paciente. De manera más específica, la mitogénesis *in vitro* se define como un incremento del índice mitótico, respecto de las células sin tratar, del 50%, más preferiblemente del 100%, y lo más preferiblemente del 300%, cuando las células se exponen a un agente marcador durante un tiempo equivalente a dos tiempos de duplicación. El índice mitótico es la fracción de células en cultivo que tienen núcleos marcados cuando se cultivan en presencia de un marcador que se incorpora solamente durante la fase S (p.ej., BrdU), y el tiempo de duplicación se define como el tiempo medio necesario para que el número de células en cultivo se incremente en un factor de dos. "Inhibir la mitogénesis" significa una disminución del índice mitótico, respecto de las células sin tratar, del 50%, más preferiblemente del 100%, y lo más preferiblemente del 300%, cuando las células se exponen al agente marcador durante un tiempo equivalente a dos tiempos de duplicación. Inhibir la mitogénesis significa también el cese de cualquier incremento del índice mitótico, respecto de las células de control.

Un efecto sobre la mitogénesis *in vivo* se define como un incremento de la activación celular medido mediante la aparición de células marcadas en el tejido de un mamífero expuesto a un marcador que se incorpora solamente durante la fase S (p.ej., BrdU). Un agente terapéutico útil se define *in vivo* como un compuesto que incrementa la activación celular respecto de un mamífero de control en al menos un 10%, más preferiblemente al menos un 50%, y lo más preferiblemente más de un 200% cuando el mamífero se expone al agente marcador durante un periodo de más de 15 minutos, y los tejidos se ensayan entre 10 horas y 24 horas después de la administración del mitógeno a

la dosis terapéutica. Por ejemplo, en las células musculares, la activación de las células satélite *in vivo* se puede detectar monitorizando la incorporación de BrdU. De manera alternativa, la activación de las células satélite *in vivo* se puede detectar mediante la aparición del filamento intermedio vimentina mediante métodos de análisis inmunológicos o de ARN. Cuando se ensaya la vimentina, el mitógeno útil se define como uno que provoca la expresión de niveles detectables de vimentina en el tejido muscular cuando se proporciona la dosis terapéuticamente útil. La mitogénesis se puede inducir, por ejemplo, en las células musculares del músculo esquelético, cardíaco, y liso, y en las células gliales.

"Supervivencia" significa cualquier proceso mediante el cual una célula evita la muerte. El término supervivencia, tal como se usa en la presente memoria, también se refiere a la prevención de la pérdida de células evidenciada por la necrosis, la apoptosis, o la prevención de otros mecanismos de pérdida de células. Incrementar la supervivencia, tal como se usa en la presente memoria, indica una disminución de la tasa de muerte celular de al menos un 10%, más preferiblemente al menos un 50%, y lo más preferiblemente al menos un 100% respecto de un control sin tratar. La tasa de supervivencia se puede medir contando las células capaces de teñirse con un colorante específico para células muertas (p.ej., yoduro de propidio) en cultivo. La tasa de supervivencia se puede medir contando las células teñibles con un colorante específico para células muertas (tal como yoduro de propidio) en cultivo 8 días tras la diferenciación de las células (es decir, 8 días después de haber cambiado el medio del 20% al 0,5% de suero).

"Crecer" significa un incremento del tamaño o del número de un tipo de células respecto de una célula de control. La utilidad terapéutica del crecimiento incrementa el tamaño o el número de una célula en el tejido enfermo en al menos un 10% o más, más preferiblemente un 50% o más, y lo más preferiblemente más de un 100% respecto del tejido equivalente en un animal de control tratado de manera similar. El crecimiento se puede medir, por ejemplo, mediante un incremento del peso neto, el contenido de proteínas, o el diámetro celular. El crecimiento del músculo se puede dar por el incremento del tamaño de las fibras y/o incrementando el número de fibras.

"Diferenciación" significa un cambio morfológico y/o químico que da como resultado la generación de un tipo de célula o estado de especialización diferente. La diferenciación de las células, tal como se usa en la presente memoria, se refiere a un programa de desarrollo celular que especifica uno o más componentes de un tipo de célula. La utilidad terapéutica de la diferenciación incrementa la cantidad de cualquier componente de una célula en el tejido enfermo en al menos un 10% o más, más preferiblemente un 50% o más, y lo más preferiblemente más de un 100% respecto del tejido equivalente en un animal de control tratado de manera similar.

"Proliferación" significa el crecimiento o la reproducción de células similares. "Inhibir la proliferación" significa la disminución del número de células similares en al menos un 10%, más preferiblemente al menos un 20%, y lo más preferiblemente al menos un 50%. "Estimular la proliferación" significa el aumento del número de células similares en al menos un 10%, más preferiblemente al menos un 20%, y lo más preferiblemente al menos un 50%.

"Inducir la mielinización" significa la adquisición, el desarrollo o la formación de una vaina de mielina alrededor de una fibra nerviosa. El agente terapéutico útil para inducir la mielinización confiere un incremento de la densidad de la vaina de mielina de al menos un 10%, más preferiblemente al menos un 20%, y lo más preferiblemente al menos un 50%, respecto de una fibra nerviosa de control. "Desmielinización" significa la pérdida de la vaina de mielina alrededor de una fibra nerviosa.

"Interacciona" significa el contacto de un polipéptido NRG-2 con un receptor u otra molécula de una célula seleccionada como objetivo.

"Afección fisiopatológica" significa una alteración de la función y/o la estructura de un organismo vivo, que resulta de una fuente externa, una predisposición genética, un traumatismo físico o químico, o una combinación de los anteriores, que incluye, pero sin limitación, cualquier enfermedad de un mamífero.

"Neuropatía" significa cualquier trastorno que afecta al sistema nervioso. Una neuropatía puede ser, por ejemplo, una neuropatía periférica, tal como una neuropatía de las fibras nerviosas sensoriales o una neuropatía de las fibras motoras.

"Cardiomiopatía" significa una enfermedad que afecta al músculo cardíaco. La cardiomiopatía puede ser primaria, es decir, que afecta principalmente al músculo cardíaco, o secundaria, es decir, que afecta al músculo cardíaco de manera secundaria respecto de una enfermedad sistémica, infección, o enfermedad metabólica.

"Lesión isquémica" significa la lesión que resulta de una circulación sanguínea disminuida en el músculo cardíaco.

"Enfermedad congénita degenerativa" significa una enfermedad que existe en el nacimiento, que puede ser hereditaria o debida a una influencia que se da durante la gestación, que da como resultado un cambio patológico en las células o los tejidos.

"Tratamiento" significa el manejo médico de un paciente con la intención de curar, mejorar, estabilizar, o prevenir una enfermedad, afección patológica o trastorno. Este término incluye el tratamiento activo, es decir, el tratamiento dirigido específicamente hacia la mejora o asociado a la cura de una enfermedad, afección patológica o trastorno, y también incluye el tratamiento causal, es decir, el tratamiento dirigido hacia la eliminación de la causa de la enferme-

dad asociada, afección patológica o trastorno. Además, este término incluye el tratamiento paliativo, es decir, el tratamiento diseñado para el alivio de los síntomas en vez de la curación de la enfermedad, afección patológica, o trastorno; el tratamiento preventivo, es decir, el tratamiento dirigido a minimizar o inhibir parcialmente o completamente el desarrollo de la enfermedad asociada, afección patológica, o trastorno; y el tratamiento de apoyo, es decir, el tratamiento empleado para complementar otra terapia específica dirigida hacia la mejora de la enfermedad asociada, afección patológica, o trastorno. El término "tratamiento" también incluye el tratamiento sintomático, es decir, el tratamiento dirigido hacia los síntomas constitutivos de la enfermedad asociada, afección patológica, o trastorno.

"Cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de un polipéptido o molécula de ácido nucleico de NRG-2 suficiente para producir un efecto curativo, estabilizante, o de mejora en el tratamiento de un trastorno.

"Trastorno neurodegenerativo" significa cualquier afección fisiopatológica que se caracteriza por la degeneración de las células neuronales o de las células asociadas a las neuronas. La degeneración puede incluir, por ejemplo, una disminución del número de células o del tamaño, un incremento de la apoptosis o muerte celular, o una disminución del crecimiento, la supervivencia o la diferenciación celular.

"Regeneración neural o reparación neural" significa el tratamiento de una afección fisiopatológica, por ejemplo, mediante un incremento del número o del tamaño de las células neuronales o de las células asociadas a neuronas, una disminución de la apoptosis o muerte de las células neuronales o de las células asociadas a neuronas, o un incremento del crecimiento, la supervivencia o la diferenciación de las células neuronales o de las células asociadas a neuronas.

"Inhibe la unión" significa impedir o reducir la unión de un polipéptido NRG-2 a un receptor. La unión se reduce preferiblemente al menos un 10%, más preferiblemente al menos un 50%, y lo más preferiblemente al menos un 100% respecto de una muestra de control.

"Polipéptido" o "fragmento de polipéptido" significa una cadena de dos o más aminoácidos, independientemente de cualquier modificación postraduccional (p.ej., glicosilación o fosforilación), que constituye todo o parte de un polipéptido que se da de manera natural o no natural. "Modificación postraduccional" significa cualquier cambio en un polipéptido o fragmento de polipéptido durante o después de la síntesis. Las modificaciones postraduccionales se pueden producir de manera natural (tal como durante la síntesis dentro de una célula), o se pueden generar de manera artificial (tal como por medios recombinantes o químicos). Una "proteína" puede estar constituida de uno o más polipéptidos.

El término "identidad" se usa en la presente memoria para describir la relación de la secuencia de una molécula de ácido nucleico o polipéptido particular respecto de la secuencia de una molécula de referencia del mismo tipo. Por ejemplo, si un polipéptido o molécula de ácido nucleico tiene el mismo residuo de aminoácido o nucleótido en una posición dada, en comparación con una molécula de referencia con la que está alineado, entonces se dice que tiene "identidad" en esa posición. El nivel de identidad de secuencias de una molécula de ácido nucleico o de un polipéptido respecto de una molécula de referencia se mide generalmente mediante el uso de un programa informático de análisis de secuencias con los parámetros por defecto especificados en él, tal como la introducción de huecos para conseguir una alineación óptima (p.ej., el paquete informático de análisis de secuencias del Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705, BLAST, o los programas PILEUP/PRETTYBOX). Estos programas informáticos hacen coincidir secuencias idénticas o similares asignando grados de identidad a diversas sustituciones, delecciones u otras modificaciones. Las sustituciones conservativas incluyen generalmente sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicocola, alanina, valina, isoleucina y leucina; ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina y glutamina; serina y treonina; lisina y arginina; y fenilalanina y tirosina.

Se dice que una molécula de ácido nucleico o polipéptido es "sustancialmente idéntica" a una molécula de referencia si exhibe, a lo largo de toda su longitud, al menos un 90%, preferiblemente al menos un 95%, más preferiblemente al menos un 97%, y lo más preferiblemente un 99% de identidad respecto de la secuencia de la molécula de referencia. Para los polipéptidos, la longitud de las secuencias de comparación es de al menos 16 aminoácidos, preferiblemente al menos 20 aminoácidos, más preferiblemente al menos 25 aminoácidos, y lo más preferiblemente al menos 35 aminoácidos. Para las moléculas de ácidos nucleicos, la longitud de las secuencias de comparación es de al menos 50 nucleótidos, preferiblemente al menos 60 nucleótidos, más preferiblemente al menos 75 nucleótidos, y lo más preferiblemente al menos 110 nucleótidos.

Una molécula de ácido nucleico o polipéptido se "analiza" o se somete a "análisis" si se lleva a cabo un procedimiento de ensayo sobre él que permite la determinación de su actividad biológica o si es de tipo natural o mutado. Por ejemplo, se pueden analizar los genes de un animal (p.ej., un ser humano) amplificando el ADN genómico del animal mediante el uso de la reacción en cadena de la polimerasa, y después determinando si el ADN amplificado contiene una mutación, p.ej., mediante análisis de la secuencia de nucleótidos o de los fragmentos de restricción.

Un "polipéptido sustancialmente puro" significa un polipéptido (o un fragmento del mismo) que se ha separado de las proteínas y de las moléculas orgánicas que lo acompañan de manera natural. En general, un polipéptido está sustancialmente puro cuando está al menos un 60%, en peso, exento de las proteínas y de las moléculas orgánicas

naturales a las que está asociado de manera natural. Preferiblemente, el polipéptido es un polipéptido NRG-2 que tiene una pureza de al menos un 75%, más preferiblemente al menos un 90%, y lo más preferiblemente al menos un 99% en peso. Se puede obtener un polipéptido NRG-2 sustancialmente puro, por ejemplo, mediante extracción a partir de una fuente natural (p.ej., cerebelo), mediante la expresión de una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido NRG-2, o mediante síntesis química. La pureza se puede medir mediante cualquier método adecuado, p.ej., mediante cromatografía en columna, electroforesis en gel de poliacrilamida, o análisis de HPLC.

Un polipéptido está sustancialmente exento de componentes asociados de manera natural cuando está separado de esas proteínas y moléculas orgánicas que lo acompañan en su estado natural. Así, una proteína que se sintetiza químicamente o que se produce en un sistema celular diferente de la célula en la que se produce de manera natural está sustancialmente exenta de sus componentes asociados de manera natural. Por lo tanto, los polipéptidos sustancialmente puros incluyen no solamente los derivados de organismos eucarióticos, sino también los sintetizados en *E. coli* o en otros procariotas.

Se dice que un anticuerpo "se une específicamente" a un polipéptido si reconoce y se une al polipéptido (p.ej., un polipéptido NRG-2), pero no reconoce ni se une sustancialmente a otras moléculas (p.ej., péptidos no relacionados con NRG-2) en una muestra, p.ej., una muestra biológica, que incluye de manera natural el polipéptido.

Un "transgén" significa una molécula de ADN que se inserta artificialmente en una célula (p.ej., el genoma nuclear de una célula), y se incorpora en el genoma de un organismo que se desarrolla a partir de la célula. Tal transgén puede ser parcialmente o completamente homólogo (es decir, exógeno) respecto del organismo transgénico, o puede ser un gen que es homólogo respecto de un gen endógeno del organismo. Un organismo o un animal (p.ej., un mamífero, tal como un ratón, rata, o cabra) se puede decir que es "transgénico" si se desarrolló a partir de una célula que tenía un transgén insertado en ella artificialmente.

Una "mutación por inactivación génica" significa una alteración inducida artificialmente en una molécula de ácido nucleico (creada mediante la técnica de ADN recombinante o una exposición deliberada a un mutágeno) que reduce la actividad biológica del polipéptido codificado normalmente a partir suyo en al menos un 80% respecto del gen sin mutar. La mutación puede ser, sin limitación, una inserción, delección, mutación del marco de lectura, o una mutación sin sentido. Un "animal con una inactivación génica" es preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente un ratón, que contiene una mutación por inactivación génica, como se definió anteriormente.

"Vector" significa un plásmido o virus modificado genéticamente, derivado de, por ejemplo, un bacteriófago, adenovirus, retrovirus, poxvirus, herpesvirus, o cromosoma artificial, que se usa para transferir una secuencia codificante de un polipéptido (p.ej., un polipéptido NRG-2), unida de forma operable a un promotor, en una célula hospedadora, de manera que el péptido o polipéptido codificado se expresa dentro de la célula hospedadora.

"Promotor" significa una secuencia mínima suficiente para dirigir o controlar la transcripción. También se incluyen los elementos promotores que son suficientes para hacer que la expresión génica dependiente del promotor sea controlable para el tipo de célula o el estado fisiológico (p.ej., condiciones hipóxicas frente a normóxicas), o inducible mediante señales o agentes externos; tales elementos pueden estar localizados en posiciones 5' o 3' o en regiones internas del gen nativo.

"Unido de manera operable" significa que un ácido nucleico que codifica un polipéptido (p.ej., un cADN) y una o más secuencias reguladoras están conectadas de tal manera que permiten la expresión génica cuando las moléculas adecuadas (p.ej., proteínas activadoras transcripcionales) están unidas a las secuencias reguladoras.

"Célula productora de polipéptidos NRG-2" significa una célula (o un descendiente de una célula) en la que se ha introducido una molécula de ADN que codifica un polipéptido NRG-2, por medio de técnicas de ADN recombinante o de técnicas de terapia génica conocidas.

La invención proporciona varias ventajas. Por ejemplo, proporciona métodos y reactivos que se pueden usar en el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades que son sensibles a las bioactividades de los polipéptidos NRG-2. Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada de la invención, los dibujos, y las reivindicaciones.

Breve Descripción de los Dibujos

La Fig. 1 muestra un diagrama esquemático de los productos del gen *NRG-2* y de clones de cADN humano.

La Fig. 2 muestra un diagrama esquemático del vector de expresión de mamíferos pRc/CMV2.

La Fig. 3A muestra un análisis mediante transferencia de western de medios acondicionados (ma) y lisados de células (cél.) de células CHO/S transfectadas con (vector) simulado o rhNRG-2 α .

La Fig. 3B muestra un análisis mediante transferencia de western de medios acondicionados de células CHO/S transfectadas con (vec) simulado, rhNRG-2 α (α), o rhNRG-2 β (β).

La Fig. 3C muestra un análisis mediante transferencia de western de medios acondicionados de células CHO que expresan NRG-2 β de rata.

Las Figs. 4A-B muestran análisis mediante transferencia de western de la fosforilación de los receptores en residuos de tirosina en células que responden al tratamiento con polipéptidos NRG-2.

- 5 La Fig. 5 muestra un análisis mediante transferencia de western de la expresión de NRG-2 α y NRG-2 β humanas recombinantes.

La Fig. 6 muestra la secuencia de ácido nucleico de NRG-2 α humana (SEQ ID N°: 1).

La Fig. 7 muestra la secuencia de aminoácidos de NRG-2 α humana (SEQ ID N°: 2).

La Fig. 8 muestra la secuencia de ácido nucleico de NRG-2 β humana (clon 2b7) (SEQ ID N°: 3).

- 10 La Fig. 9 muestra la secuencia de aminoácidos de NRG-2 β humana (clon 2b7) (SEQ ID N°: 4).

La Fig. 10 muestra un análisis mediante transferencia de western de transfectantes estables usados para la selección con metotrexato.

La Fig. 11A muestra un gel de poliacrilamida teñido con Coomassie de rhNRG-2 β purificada.

La Fig. 11B muestra un barrido del gel de la Fig. 11A.

- 15 La Fig. 12 muestra un gel de poliacrilamida teñido con oro de la proteína total y de rhNRG-2 β purificada.

La Fig. 13 muestra un análisis mediante transferencia de western de la fosforilación de los receptores de residuos de tirosina en las células que responden a rhNRG-2 β purificada mediante HPLC.

La Fig. 14A muestra una fotografía de células dopaminérgicas de mesencéfalo pretratadas con rhNRG-2 β y expuestas a 6-OHDA.

- 20 La Fig. 14B muestra una fotografía de neuronas dopaminérgicas de mesencéfalo de control sin tratar expuestas a 6-OHDA.

La Fig. 15A muestra una fotografía que indica la incorporación de BrdU en las células neurales, que incluyen las células progenitoras neurales, cultivadas con rhNRG-2 β .

La Fig. 15B muestra un gráfico de barras que indica el efecto de rhNRG-2 β sobre la incorporación de BrdU.

- 25 La Fig. 16A muestra una fotografía de neuronas granulares cerebelares que migran en una prolongación de células gliales.

La Fig. 16B muestra un gráfico de barras que indica el efecto de NRG-2 sobre la migración neuronal.

La Fig. 17 muestra un análisis mediante transferencia de western de la activación de p42/44 MAPk(Erk) y Akt mediante proteínas NRG-2.

- 30 La Fig. 18 muestra un gráfico lineal de la absorción de ³H-Leucina en miocitos ventriculares de rata neonatal tratados con proteínas NRG.

Descripción Detallada de la Invención

Se describen polipéptidos y moléculas de ácidos nucleicos de NRG-2, anticuerpos que se unen a estos polipéptidos NRG-2, y métodos terapéuticos y diagnósticos que emplean los polipéptidos y las moléculas de ácidos nucleicos de NRG-2.

35

Bioensayos

Los ligandos NRG-2 y los receptores erbB se expresan en el sistema nervioso central, en los precursores neuronales y en las neuronas del cerebro, la médula espinal y la retina; el músculo esquelético y cardíaco; el pulmón; el timo, el riñón; las glándulas suprarrenales; la piel; los epitelios de la mama; y en otros órganos durante el desarrollo embrio-
nario y en los tejidos adultos. Los sitios principales de la expresión de NRG-2 incluyen el cerebelo (células de Purkinje y granulares), bulbo olfatorio, circunvolución dentada, células piramidales de la corteza occipital, pulmón, y timo. Los patrones de expresión de los receptores de NRG-2 en células y tejidos específicos se usan para identificar los objetivos celulares de la acción de NRG-2, y para identificar las bioactividades que son relevantes para enfermedades específicas relacionadas con NRG-2, tales como los trastornos desmielinizantes de los sistemas nerviosos central y periférico; neuropatías; trastornos neurodegenerativos; cardiomiopatías; pérdida de audición, equilibrio o
visión; dolor; neurotraumatismo; cáncer; pérdida de audición neurosensorial o pérdida del equilibrio neurosensorial a causa de una infección viral, envejecimiento, o antibióticos (p.ej. aminoglicósidos); retinopatía (p.ej., hipertensiva,

40

45

diabética, oclusiva, degeneración macular, retinitis pigmentaria, neuropatía óptica, lesión); enfermedad de Guillain-Barre; ictus; o lesión del cerebro o de la médula espinal. Muchos de los tipos de células que responden a NRG-2 en los tejidos embrionarios, neonatales, y adultos expresan las combinaciones de receptores de erbB2/erbB3, erbB2/erbB4, o erbB4 solo. Por ejemplo, los tipos de células gliales del sistema nervioso periférico (SNP) y del sistema nervioso central (SNC) expresan erbB2; las células de Schwann expresan además erbB3. En el SNC, se han observado erbB4 y erbB3 en diversos tipos de células gliales, que incluyen los astrocitos, precursores de oligodendrocitos, glía radial en la corteza en desarrollo, y glía de Bergmann en el cerebelo. La combinación erbB2/erbB4 se halla en los cardiomiocitos ventriculares.

Las utilidades terapéuticas y diagnósticas para los polipéptidos NRG-2 se identifican, por ejemplo, llevando a cabo bioensayos *in vitro*. Se seleccionan los sistemas de cultivo que reflejan los patrones de expresión de NRG-2, junto con la distribución de los receptores particulares, tales como erbB2/erbB4 o erbB4 solo, que son ejemplos de combinaciones de receptores erbB que pueden mostrar una preferencia por NRG-2 frente a NRG-1. Por ejemplo, se estudian las bioactividades de NRG-2 mediante el uso de glía del SNC, tal como oligodendrocitos y células gliales del bulbo olfatorio, neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo, neuronas granulares cerebelares, y cardiomiocitos. Estas poblaciones celulares expresan receptores de NRG, y responden al tratamiento con una o más isoformas de NRG-1 en una diversidad de bioensayos cuantitativos. Las actividades de las isoformas de NRG-2 (p.ej. rhNRG-2 α , rhNRG-2 β) y NRG-1 (p.ej., rhGGF2) se comparan, mediante el uso de cultivos paralelos, en diversos ensayos de dosis-respuesta, que incluyen, pero sin limitación, la estimulación de la proliferación, supervivencia, diferenciación, migración, y cambios morfológicos. Las potencias relativas de las isoformas de NRG-2 y NRG-1 se determinan en base, por ejemplo, a la concentración de proteínas.

Métodos de Diagnóstico que Emplean Moléculas de Ácidos Nucleicos, Polipéptidos y Anticuerpos de NRG-2

Se usan moléculas de ácidos nucleicos, polipéptidos y anticuerpos de NRG-2 en los métodos para diagnosticar o monitorizar una diversidad de enfermedades y afecciones, que incluyen las que implican mutaciones en, o la expresión inadecuada de, los genes de NRG-2. Se ha documentado la expresión de NRG-2 en una diversidad de tejidos, tal como se discutió anteriormente. Así, la detección de anomalías en los genes de NRG-2 o su expresión se usa en los métodos para diagnosticar o monitorizar el tratamiento o el desarrollo de enfermedades de estos tejidos.

Los métodos de diagnóstico *ex vivo* de la invención se usan, por ejemplo, con pacientes que tienen una enfermedad cardiovascular o neurológica, en un esfuerzo por determinar su etiología, y, así, facilitar la selección de un tratamiento adecuado. Los métodos de diagnóstico se usan también con pacientes que todavía no han desarrollado una enfermedad cardiovascular o neurológica, pero que pueden estar en riesgo de desarrollar tal enfermedad, o con pacientes que están en una etapa temprana del desarrollo de tal enfermedad. Muchas enfermedades cardiovasculares y neurológicas se dan durante el desarrollo, y, así, los métodos de diagnóstico *ex vivo* de la invención se llevan a cabo también con un feto o un embrión durante el desarrollo. Además, los métodos de diagnóstico de la invención se usan en el cribado genético prenatal, por ejemplo, para identificar pacientes que pueden ser portadores de una mutación recesiva de NRG-2.

Las anomalías de NRG-2 que se detectan mediante el uso de los métodos de diagnóstico de la invención incluyen los caracterizados, por ejemplo, por (i) polipéptidos NRG-2 anormales, (ii) genes de NRG-2 que contienen mutaciones que dan como resultado la producción de tales polipéptidos, y (iii) mutaciones de NRG-2 que dan como resultado la producción de cantidades anormales de NRG-2.

Los niveles de expresión de NRG-2 en una muestra de un paciente se determinan mediante el uso de cualquiera de varios métodos habituales que son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, se monitoriza la expresión de NRG-2 en una muestra biológica (p.ej., una muestra de sangre o tejido, o de líquido amniótico) de un paciente mediante análisis de transferencia de northern o mediante PCR cuantitativa (véase, p.ej., Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, NY, 1998; *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*, H.A. Ehrlich, Ed., Stockton Press, NY; Yap *et al. Nucl. Acids. Res.* 19:4294, 1991).

Métodos Terapéuticos que Emplean Moléculas de Ácidos Nucleicos, Polipéptidos y Anticuerpos de NRG-2

También se describen métodos para tratar o prevenir las enfermedades relacionadas con NRG-2. Las terapias se diseñan para evitar o superar un defecto del gen *NRG-2*, o una expresión inadecuada o excesiva del gen *NRG-2*, y así modular y posiblemente aliviar las afecciones que implican defectos en las proteínas o los genes de NRG-2. Al considerar las diversas terapias, se entiende que tales terapias se dirigen, preferiblemente, a los órganos afectados o potencialmente afectados, por ejemplo, el corazón o el sistema nervioso. Los reactivos que se usan para modular la actividad biológica de NRG-2 pueden incluir, sin limitación, los polipéptidos NRG-2 de tamaño completo; cADN, mRNA, o ARN inverso de NRG-2; anticuerpos hacia NRG-2; y cualquier compuesto que module la actividad biológica, expresión o estabilidad de NRG-2.

El tratamiento o la prevención de las enfermedades que resultan de un gen mutado de NRG-2 se lleva a cabo, por ejemplo, sustituyendo un gen mutante de NRG-2 con un gen normal de NRG-2, administrando un gen normal de NRG-2, modulando la función de una proteína NRG-2 mutante, administrando una proteína NRG-2 normal a las células adecuadas, o alterando los niveles de una proteína NRG-2 normal o mutante. También es posible corregir un

defecto de NRG-2 para modificar la ruta fisiológica (p.ej., una ruta de transducción de señales) en la que participa la proteína NRG-2.

La transferencia génica se lleva a cabo mediante el uso de vectores virales, así como de medios no virales que implican la transfección *in vitro* por medio de cualquier técnica habitual, que incluye, pero sin limitación, el fosfato cálcico, del DEAE-dextrano, la electroporación, la fusión de protoplastos, y los liposomas. El trasplante de genes normales en tejidos afectados de un paciente se puede llevar a cabo también transfiriendo un gen normal de NRG-2 en un tipo de célula cultivable *ex vivo*, tras lo cual la célula (o sus descendientes) se inyectan en un tejido seleccionado como objetivo. Otra estrategia para inhibir la función de NRG-2 mediante el uso de la terapia génica implica la expresión intracelular de un anticuerpo anti-NRG-2 o una porción de un anticuerpo hacia NRG-2. Por ejemplo, el gen (o el fragmento génico) que codifica un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a NRG-2 e inhibe su actividad biológica se coloca bajo el control transcripcional de una secuencia reguladora génica específica de un tejido. Otra aproximación terapéutica implica la administración de un polipéptido NRG-2 recombinante, directamente en el sitio de un tejido potencialmente afectado o realmente afectado (por ejemplo, mediante inyección) o de manera sistémica (por ejemplo, mediante cualquier técnica convencional de administración de proteínas recombinantes). La dosis de una NRG-2 administrada de manera sistémica depende de varios factores, que incluyen el tamaño y la salud del paciente individual, pero, en general, se administran entre alrededor de 0,006 mg/kg a alrededor de 0,6 mg/kg, ambos incluidos, por día a un adulto en cualquier formulación farmacéuticamente aceptable. Las dosis de NRG-2 administradas mediante administración local pueden diferir de la administración sistémica, y se pueden determinar mediante el uso de técnicas habituales conocidas para las personas de experiencia habitual en la técnica.

En un paciente al que se le ha diagnosticado una mutación de NRG-2 o una enfermedad relacionada con NRG-2, o que es susceptible a las mutaciones de NRG-2, a la expresión anormal de NRG-2 (incluso si esas mutaciones o patrones de expresión todavía no han dado como resultado alteraciones de la expresión o de la actividad biológica de NRG-2), o a una enfermedad relacionada con NRG-2, se le administra cualquiera de las terapias anteriormente descritas antes de la aparición del fenotipo de la enfermedad. Además, los compuestos que se demuestra que modulan la expresión de NRG-2 o la actividad biológica de NRG-2 se administran a los pacientes a los que se les han diagnosticado enfermedades potenciales o reales mediante cualquier dosis y vía de administración habituales. De manera alternativa, se lleva a cabo la terapia génica mediante el uso de una construcción de expresión de mRNA inverso de NRG-2 para invertir o prevenir el defecto génico antes del desarrollo del curso completo de la enfermedad.

Los métodos terapéuticos, en algunos casos, se dirigen al tratamiento prenatal. Por ejemplo, se administra a un feto que se ha descubierto que tiene una mutación de NRG-2 un vector de terapia génica que incluye un gen *NRG-2* normal o una proteína NRG-2 normal. Tal tratamiento puede ser necesario solamente durante un corto periodo de tiempo, o puede ser necesario, de alguna manera, a lo largo de toda la vida de tal paciente. Cualquier necesidad continuada de tratamiento, sin embargo, se determina mediante el uso, por ejemplo, de los métodos de diagnóstico descritos anteriormente. Además, como se discutió anteriormente, las anomalías de NRG-2 pueden estar asociadas a enfermedades en adultos, y así, los adultos también se someten a los métodos terapéuticos.

Identificación de Moléculas que Modulan la Actividad Biológica de NRG-2 o Cuya Actividad Biológica Está Modulada por NRG-2

El aislamiento de cADNs de NRG-2 (como se describe en la presente memoria) también facilita la identificación de las moléculas que incrementan o disminuyen la actividad biológica de NRG-2. De manera similar, se pueden identificar las moléculas cuya actividad está modulada por la actividad biológica de NRG-2. Según una aproximación, las moléculas candidatas se añaden a concentraciones variables al medio de cultivo de células que expresan mRNA de NRG-2. La actividad biológica de NRG-2 se mide entonces mediante el uso de las técnicas habituales. La medida de la actividad biológica puede incluir, sin limitación, la medida de los niveles de moléculas de ácidos nucleicos y de proteínas NRG-2, y la fosforilación de NRG-2.

Si se desea, el efecto de los moduladores candidatos sobre la expresión se puede medir también a nivel de la producción de la proteína NRG-2 mediante el uso de la misma aproximación general y de las mismas técnicas de detección inmunológica habituales, tales como la transferencia de western o la inmunoprecipitación con un anticuerpo específico de NRG-2 (véase más adelante).

Un compuesto de ensayo que se criba en los métodos descritos anteriormente puede ser un producto químico, ya sea natural o artificial. Tales compuestos pueden incluir, por ejemplo, polipéptidos, moléculas orgánicas sintetizadas, moléculas orgánicas que se dan de manera natural, moléculas de ácidos nucleicos, y los componentes de los mismos. Los moduladores candidatos de NRG-2 incluyen moléculas peptídicas y moléculas no peptídicas (p.ej., moléculas peptídicas o no peptídicas halladas, p.ej., en un extracto celular, suero de mamífero, o medio de cultivo en el que se han cultivado células de mamífero).

Administración de Polipéptidos NRG-2, Moléculas de Ácidos Nucleicos de NRG-2, y Moduladores de la Síntesis o la Función de NRG-2

Se administra una proteína NRG-2, una molécula de ácido nucleico, un modulador, un anticuerpo neutralizante hacia NRG-2, un compuesto inhibidor de NRG-2 (p.ej., NRG-2 inverso o un mutante negativo dominante de NRG-2) en un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, en una forma farmacéutica unitaria a pacientes o a animales de experimentación. Además, se emplea la práctica farmacéutica convencional para proporcionar formula-
 5 ciones o composiciones adecuadas en las que administrar tales moléculas o compuestos a pacientes que padecen una enfermedad relacionada con NRG-2, tal como trastornos desmielinizantes de los sistemas nerviosos periférico y central; neuropatías; trastornos neurodegenerativos; cardiomiopatías; pérdida de audición, equilibrio o visión; dolor; neurotraumatismo; cáncer; pérdida de audición neurosensorial o pérdida del equilibrio neurosensorial a causa de una infección viral, envejecimiento, o antibióticos (p.ej. aminoglicósidos); retinopatía (p.ej., hipertensiva, diabética,
 10 oclusiva, degeneración macular, retinitis pigmentaria, neuropatía óptica, lesión); enfermedad de Guillain-Barre; ictus; o lesión del cerebro o de la médula espinal. La administración puede comenzar antes o después de que el paciente muestre síntomas.

Se puede emplear cualquier vía de administración adecuada, por ejemplo, la administración puede ser parenteral, intravenosa, intraarterial, subcutánea, intramuscular, intracraneal, intraorbital, oftálmica, intraventricular, intracapsu-
 15 lar, intraespinal, intracisternal, intraperitoneal, intranasal, inhalación hasta el pulmón profundo, en aerosol, mediante supositorios, oral o tópica (p.ej., aplicando un parche adhesivo que porta una formulación capaz de atravesar la dermis y entrar en el torrente sanguíneo). Preferiblemente, la administración es local en el tejido afectado, tal como el tejido cardíaco, pulmonar, o nervioso. Las formulaciones terapéuticas pueden estar en forma de disoluciones o suspensiones líquidas; para la administración oral, las formaciones pueden estar en forma de comprimidos o cápsu-
 20 las; y para las formulaciones intranasales, en forma de polvos, gotas nasales, o aerosoles. Cualquiera de las formu- laciones anteriores puede ser una formulación de liberación sostenida.

Los métodos que se conocen en la técnica para producir formulaciones se hallan, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, (18ª edición), ed. A. Gennaro, 1990, Mack Publishing Company, Easton, PA. Las formula-
 25 ciones para la administración parenteral pueden contener, por ejemplo, excipientes; agua estéril; o solución salina; polialquilen glicoles, tales como polietilen glicol; aceites de origen vegetal; o naftalenos hidrogenados. Se pueden usar polímeros de lactida, copolímeros de lactida/glicolida, o copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno, de liberación sostenida, biocompatibles, biodegradables, para controlar la liberación de los compuestos. Otros sistemas de administración parenteral potencialmente útiles para los compuestos moduladores de NRG-2 incluyen las partículas de copolímeros de etileno-acetato de vinilo, las bombas osmóticas, los sistemas de infusión implantables, y los lipo-
 30 somas. Las formulaciones para la inhalación pueden contener excipientes, por ejemplo, lactosa, o pueden ser diso- luciones acuosas que contienen, por ejemplo, polioxietileno-9-lauril éter, glicocolato, y desoxicolato, o pueden ser disoluciones oleosas para la administración en forma de gotas nasales, o en forma de un gel.

Síntesis de Proteínas NRG-2, Polipéptidos, y Fragmentos de Polipéptidos

Los expertos en la técnica de biología molecular entenderán que se puede usar una amplia diversidad de sistemas de expresión para producir las proteínas NRG-2 recombinantes. La célula hospedadora precisa utilizada no es crítica para la invención. Las proteínas NRG-2 se pueden producir en un hospedador procariótico (p.ej., *E. coli*) o en un hospedador eucariótico (p.ej., *S. cerevisiae*, células de insecto tales como células Sf9, o células mamíferas tales como células COS, NIH 3T3, CHO, o HeLa). Estas células están disponibles comercialmente, por ejemplo, de la American Type Culture Collection, Rockville, MD (véase también Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, NY, 1998). El método de transformación y la elección del vehículo de ex-
 40 presión (p.ej., vector de expresión) dependerán del sistema hospedador seleccionado. Los métodos de transforma- ción y de transfección se describen, p.ej., en Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, NY, 1998, y los vehículos de expresión se pueden elegir de los proporcionados, p.ej. en Pouwels *et al.*, *Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, 1985, Supl. 1987).

Las características de las moléculas de ácidos nucleicos de NRG-2 se analizan introduciendo tales genes en diver-
 45 sos tipos de células o mediante el uso de sistemas extracelulares *in vitro*. La función de las proteínas NRG-2 produ- cidas en tales células o sistemas se examina después en diferentes condiciones fisiológicas. Además, se pueden producir líneas celulares que sobreexpresan el producto del gen NRG-2, lo que permite la purificación de NRG-2 para la caracterización bioquímica, la producción a gran escala, la producción de anticuerpos, y la terapia con pa-
 50 cientes.

Uso de Anticuerpos hacia NRG-2

Los anticuerpos hacia las proteínas NRG-2 (por ejemplo, los descritos en la presente memoria), se usan para de-
 55 tectar las proteínas NRG-2 o para inhibir las actividades biológicas de las proteínas NRG-2. Por ejemplo, una molé- cula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o una porción de un anticuerpo se puede expresar dentro de una célula para inhibir la función de NRG-2. Además, los anticuerpos se pueden acoplar a compuestos, tales como ra- dionucleidos y liposomas, para el uso en el diagnóstico o la terapia. Los anticuerpos que inhiben la actividad de un

polipéptido NRG-2 pueden ser útiles también para prevenir o frenar el desarrollo de una enfermedad provocada por la expresión inadecuada de un gen *NRG-2* de tipo natural o mutante.

Construcción de Animales Transgénicos y Animales con Inactivación Génica

La caracterización de los genes de NRG-2 proporciona información que permite desarrollar modelos de animales con inactivación génica de NRG-2 mediante recombinación homóloga. Preferiblemente, un animal con inactivación génica de NRG-2 es un mamífero, lo más preferiblemente un ratón. De manera similar, se pueden generar modelos animales de sobreproducción de NRG-2 integrando una o más secuencias de NRG-2 en el genoma de un animal, según las técnicas transgénicas habituales. Además, se puede estudiar el efecto de las mutaciones del gen *NRG-2* (p.ej., mutaciones de genes dominantes) mediante el uso de un ratón transgénico que porta transgenes mutados de NRG-2 o introduciendo tales mutaciones en el gen endógeno de NRG-2, mediante el uso de técnicas de recombinación homóloga habituales.

Se puede construir un vector de selección del objetivo de sustitución, que se puede usar para crear un modelo de inactivación génica, mediante el uso de un clon genómico isogénico, por ejemplo, de una cepa de ratón tal como 129/Sv (Stratagene Inc., LaJolla, CA). El vector de selección del objetivo se puede introducir en una línea derivada adecuada de células precursoras embrionarias (ES) mediante electroporación para generar líneas de células ES que portan una forma totalmente trunca de un gen *NRG-2*. Para generar ratones fundadores quiméricos, las líneas celulares seleccionadas como objetivo se inyectan en un embrión de ratón en la fase de blástula. La descendencia heterocigota se puede cruzar hasta conseguir ejemplares homocigotos. Los ratones con la inactivación génica de NRG-2 proporcionan una herramienta para estudiar el papel de NRG-2 en el desarrollo embrionario y en la enfermedad. Además, tales ratones proporcionan medios, *in vivo*, para ensayar compuestos terapéuticos para la mejora de enfermedades o afecciones que implican una ruta dependiente de NRG-2 o una ruta afectada por NRG-2.

Los siguientes Ejemplos ayudarán a los expertos en la técnica a entender mejor la invención y sus principios y ventajas. Se pretende que estos Ejemplos sean ilustrativos de la invención, y no limitan el alcance de la misma.

EJEMPLO 1

Clonación de cADN de NRG-2 Humana

Se identificó un cADN de tamaño completo que codificaba NRG-2 α a partir de cerebelo. Se diseñaron múltiples sondas para diversas regiones de las secuencias codificantes de NRG-2 basándose en los datos de secuencias de roedores y de seres humanos para el análisis mediante clonación, cartografía y secuenciación. Antes de cribar las bibliotecas, se confirmó la especificidad de las sondas analizando el ARN cerebelar humano mediante el uso de una aproximación 3' RACE (amplificación rápida de los extremos del cADN). Se cribaron aproximadamente 400.000 cADNs de dos bibliotecas de cADN de γ t10 de cerebelo humano (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA; n° de catálogo HL1128a) con una sonda oligonucleotídica: 5' GCA TCA ACC AGC TCT CCT GC 3' (SEQ ID N°: 5) del dominio EGFL de NRG-2. Se detectaron veinticinco señales de hibridación; se clonaron veinte de los clones de fagos que correspondían a estas señales y se analizaron adicionalmente mediante estudios de hibridación, cartografía física, y secuenciación del ADN. Los resultados de estos análisis fueron coherentes con la existencia de múltiples variantes estructurales (isoformas) entre los clones de NRG-2 humana que se identificaron. La información estructural preliminar sobre los clones se obtuvo mediante hibridación en filtro a placas de fagos y análisis mediante endonucleasas de restricción de los insertos de cADN. Se usaron estudios de PCR, mediante el uso de cebadores internos, por parejas o en combinación con las secuencias flanqueantes para obtener datos de cartografía física (véase la Tabla 1).

Los cebadores usados fueron los siguientes:

Cebador 1471: 5' - GCA TCA ACC AGC TCT CCT GC - 3' (SEQ ID N°: 6)

Cebador 1494: 5' - TGC GAA CTG CTG ACA CCT GT - 3' (SEQ ID N°: 7)

Cebador 1527: 5' - CCA CCT TTT GAG CAA GTT CAG - 3' (SEQ ID N°: 8)

Cebador 1528: 5' - GAG GTG GCT TAT GAG TTC TTC - 3' (SEQ ID N°: 9)

Cebador 1531: 5' - GGC CAC CAC ACA GAC GAT G - 3' (SEQ ID N°: 10)

Primero, se analizaron los tamaños de los insertos, que oscilaron de 0,8 kb a 3,3 kb (el tamaño medio fue aproximadamente 1,7 kb). Los transcritos de NRG-2 contienen un dominio EGFL y secuencias citoplasmáticas que exhiben gran parte de la diversidad estructural de estos polipéptidos, y esta región interna específica se centró a continuación en cartografiar los clones mediante análisis de PCR. Este análisis produjo cuatro grupos de productos, y se identificaron múltiples clones en cada grupo. Por lo tanto, es probable que los cuatro grupos (A-D) representen el grado de diversidad estructural en esta región entre los productos génicos de NRG-2 en el cerebelo humano. Cuatro clones (grupo A) no dieron ningún producto en este experimento. Este resultado fue coherente con los datos de los experimentos de hibridación, que habían demostrado que estos clones carecían de la secuencia del cebador de 3' (en el dominio citoplasmático). En el tercer experimento, se determinó la orientación de los clones y la distancia desde el

dominio EGFL hasta los extremos de los clones mediante el uso de cebadores en el dominio EGFL en combinación con cebadores de las secuencias flanqueantes en los brazos del fago. Estos estudios, por lo tanto, permitieron la segregación de los cADNs de NRG-2 en grupos, y facilitaron la identificación de cADNs de tamaño completo potenciales que codificaban isoformas secretables de NRG-2 humana.

5

Tabla 1: Cartografía de los Clones de cADN Celebelar de NRG-2 Humana

<u>Grupo: clones</u>	<u>Producto interno¹</u>	<u>Clon mayor: tamaño²</u>	<u>Extremo 5' hasta EGFL³</u>	<u>EGFL hasta extremo 3'⁴</u>
A: 1,4,13,15	Ninguno	13: 3300	1400	2300
B: 3,6,7,9,11,18,20	170	11: 1050	600	450
C: 10,12,14,16	260	14: 1500	850	650
D: 5,8,17,19	650	8: 1600	800	800

Análisis mediante PCR de los clones de cADN: se determinó el tamaño de los productos en geles de poliácridamida del 6%; la tabla muestra los tamaños en pares de bases.

1. Cebador de 5' 1471 del dominio EGFL; cebador de 3' 1531 del dominio citoplasmático.

2. Cebadores 1527, 1528 de las secuencias flanqueantes en λ gt10.

10 3. Cebador de 5' 1527 de las secuencias flanqueantes en λ gt10; cebador de 3' 1494 del dominio EGFL.

4. Cebador de 5' 1471 del dominio EGFL; cebador de 3' 1528 de las secuencias flanqueantes de λ gt10.

EJEMPLO 2

Análisis de la Secuencia de ADN de NRG-2 Humana

15 Para obtener un panorama más completo de las diferentes estructuras, se llevó a cabo la secuenciación del ADN sobre los clones representativos de cada grupo mediante el uso de un protocolo de secuenciación cíclica, y se usaron los mismos cebadores que para el análisis de PCR descrito anteriormente. La comparación de los cóntigos de secuencia que rodean el dominio EGFL (de los grupos B-D) entre sí y con las secuencias de NRG-2 humana y de rata condujo a varias conclusiones. Primero, los clones del grupo B coincidieron con la estructura del cADN de NRG-2 β . Estas secuencias conectaban el dominio EGFL con los dominios transmembrana y citoplasmáticos, y así codificaban la proteína NRG-2 asociada a membranas. Segundo, todas las estructuras del grupo C contenían tanto la secuencia α como la secuencia β , y coincidían con la estructura del cADN de NRG-2 α . Por lo tanto, los clones del grupo C debían codificar una proteína NRG-2 secretada. El clon 14 pareció ser el mejor candidato para una versión de tamaño completo de esta estructura. En el grupo D, estaban presentes las secuencias α y β , pero no estaban adyacentes. Se descubrió una secuencia de 450 pb intermedia entre estas dos secuencias codificantes conocidas, e inmediatamente adyacentes a las regiones identificadas como las secuencias α y β estaban las secuencias canónicas donantes (GT) yceptoras (AG) de la unión de corte y empalme. Así, esta estructura representa probablemente un transcrito sometido parcialmente a corte y empalme del gen *NRG-2*.

30 Dada esta información, pareció que las formas secretables de NRG-2 se hallaban muy probablemente en los clones de los grupos A y C. El clon 14 sirvió como representante adecuado del grupo C. Dos clones del grupo A se seleccionaron en paralelo; el clon 13 se seleccionó debido al tamaño del inserto relativamente grande y el clon 15 se seleccionó debido a la presencia de la secuencia de 5' del dominio EGFL que se detectó en los experimentos de hibridación. Cuando se completaron las secuencias de los clones 13, 14 y 15 se hizo evidente que ninguno de ellos codificaba por sí solo una NRG-2 α humana de tamaño completo. Sin embargo, dado el solapamiento sustancial de la estructura de estos clones, fue evidente que las porciones de cada uno podrían cortarse y empalmarse entre sí para generar un clon de tamaño completo que codificase NRG-2 α . La Fig. 1 muestra una representación esquemática de la estructura de estas secuencias; los segmentos codificantes del gen *NRG-2* se muestran en los cuadros sombreados, y las secuencias codificantes (líneas continuas) que están presentes en las isoformas NRG-2 α y NRG-2 β descritas están dibujadas por encima; las isoformas de NRG-2 contienen dominios similares a GGF2, similares a inmunoglobulina (Ig), similares a EGF (EGFL), α , β , transmembrana (M), y citoplasmáticos (cito); los codones de parada se indican mediante (*); y las secuencias intrónicas supuestas se representan mediante líneas discontinuas. Se usó un único sitio BsrGI (B) presente en el segmento codificante α para construir un cADN de NRG-2 humana de tamaño completo conectando las secuencias de 5' del clon 15 a las secuencias 3' del clon 14, y se determinó la secuencia de la construcción final. El marco de lectura abierto principal del cADN de NRG-2 α (Fig. 6, SEQ ID N°: 1) codifica una proteína de 331 aminoácidos (Fig. 7, SEQ ID N°: 2).

EJEMPLO 3**Clonación y Construcción de cADN de NRG-2 Humana**

Se construye el cADN de NRG-2 β humana parcialmente a partir del cADN de NRG-2 α humana (el vector y los 869 pb de 5' de la secuencia que codifica el extremo N-terminal de NRG-2 humana, que está presente en ambas isoformas α y β) y parcialmente a partir de un clon de fago (p.ej., en los estudios de cartografía se demostró que el clon 11 de fago contenía la secuencia β , véase la Tabla 1, el Ejemplo 1, y el Ejemplo 2) que contiene un cADN humano parcial que codifica NRG-2 β humana (dos fragmentos de 3': uno contiene la secuencia β y el otro un codón de parada).

El cADN de NRG-2 α humana (Ejemplo 2) se puede digerir con las enzimas Not I y Xba I (New England Biolabs, Beverly, MA) para generar un vector de 5500 pb y un inserto de 1555 pb que contiene el cADN. Ambos fragmentos se recuperan de un gel de un 1% de agarosa en tampón TAE mediante el uso del equipo y el protocolo QIAEX II Agarose Gel Extraction (Qiagen, Inc., Valencia, CA). El fragmento de inserto (1555 pb) se digiere adicionalmente mediante el uso de Drd I (New England Biolabs, Beverly, MA) para generar un fragmento de 869 pb de 5' y un fragmento de 3' de aproximadamente 700 pb. El fragmento Not I-Drd I de 869 pb se recupera de un gel de un 2% de agarosa en tampón TAE mediante el uso del equipo y protocolo QIAEX II Agarose Gel Extraction (Qiagen, Inc., Valencia, CA). Este fragmento de 869 pb contiene la metionina iniciadora, y codifica la porción N-terminal de NRG-2 β humana. Se liga en el vector de 5550 pb junto con dos fragmentos adicionales, que proceden de cADNs que tienen secuencias de NRG-2 β humana como se describen más adelante.

La principal diferencia entre las secuencias de NRG-2 α humana y NRG-2 β humana reside entre los únicos sitios Drd I y Bsr DI. La isoforma α contiene un segmento codificante de 77 pb que se corta y se empalma en la secuencia de la isoforma β . Para obtener las secuencias que codifican NRG-2 β humana, se genera un fragmento Drd I-BsrDI de 113 pb, que es 77 pb más corto que la secuencia correspondiente de NRG-2 α humana, a partir del clon 11 de fago como sigue. Se usan cebadores (1551: 5'-GTG-AGC-ACC-ACC-CTG-TCA-TC-3', SEQ ID N°: 11; 1546: 5'-GAG-CTA-GTC-TAG-AGT-GGC-TTA-TGA-GTA-TTT-CTT-C-3', SEQ ID N°: 12) que flanquean los sitios Drd I y BsrDI para amplificar el molde de ADN del clon 11 de fago siguiendo los métodos recomendados por el proveedor de la Taq Polimerasa (Perkin Elmer/Roche, Branchburg, NJ). El producto de PCR se precipita con etanol, después se digiere secuencialmente mediante el uso de Drd I y BsrDI para producir un fragmento de 113 pb. De manera similar, el fragmento de 3' también deriva mediante amplificación de PCR del molde del clon 11 de fago mediante el uso de los cebadores 1550 y 1546. El cebador 1550 (5'-CAG-CAG-TTC-GCA-ATG-GTC-AAC-TTC-TCC-TAA-GCA-CC-3', SEQ ID N°: 13) se coloca para cruzar el sitio BsrDI y contiene una inserción de una única T que mutará la secuencia objetivo 5'-CAG-CAG-TTC-GCA-ATG-GTC-AAC-TTC-TCC-AAG-CAC-C-3', SEQ ID N°: 14, a 5'-CAG-CAG-TTC-GCA-ATG-GTC-AAC-TTC-TCC-TAA-GCA-CC-3', SEQ ID N°: 15, y así, convierte un codón de lisina en un codón de parada TAA. El cebador 1546 se dirige al sitio de clonación del brazo derecho del fago y contiene un sitio Xba I. La digestión del producto mediante el uso de BsrDI y Xba I genera un fragmento de 425 pb que se convierte en el extremo 3' del cADN de NRG-2 β humana. Ambos fragmentos de 113 pb y 425 pb se recuperan de geles de agarosa del 2%.

La recuperación de los fragmentos se cuantifica mediante electroforesis respecto de marcadores de ADN bicatenarios de tamaños y cantidades conocidos (p.ej., digestión mediante Hind III de fago lambda; New England Biolabs, Beverly, MA; marcadores pGEM, Promega, Madison, WI), y después cada fragmento purificado se convierte en equivalentes molares. El vector purificado (100 ng) y los tres fragmentos se ligan entre sí (ADN ligasa de T4; New England Biolabs, Beverly, MA) en proporciones equimolares según las instrucciones proporcionadas por el proveedor. Las ligaduras se usan para transformar células bacterianas competentes, tales como *E. coli* XL1 Blue (Stratagene, La Jolla, CA) según las instrucciones proporcionadas por el proveedor. Se seleccionan las colonias que contienen el vector basándose en la resistencia a 50 ug/ml de ampicilina, y se analiza la estructura del cADN de NRG-2 β humana mediante amplificación con PCR y secuenciación del ADN plasmídico. El marco de lectura abierto principal del cADN de NRG-2 β humana (Fig. 8, SEQ ID N°: 3) codifica una proteína de 298 aminoácidos (Fig. 9, SEQ ID N°: 4).

EJEMPLO 4**Expresión de NRG-2 Humana**

Se construyó un vector para la expresión transitoria y estable de NRG-2 humana en células de mamífero. Se usó el vector pRc/CMV2 (Invitrogen V750-20; véase la Fig. 2) para expresar NRG-2 humana. Este vector de 5,5 kb utiliza un promotor de CMV y un sitio de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina para controlar la expresión constitutiva a nivel elevado en transfecciones tanto transitorias como estables. Se puede usar la selección con neomicina (G418) para seleccionar los transformantes estables. Se clonó la secuencia de cADN de NRG2- α humana (SEQ ID N°: 1) de manera direccional en el poliligador mediante el uso de los sitios Hind III y Xba I. El inserto de cADN de la construcción final se secuenció en ambas cadenas. Los vectores de expresión de NRG-2 humana se expresaron después en células CHO para proporcionar una fuente fiable de proteína humana recombinante.

Se transfectaron de manera transitoria los cADNs de NRG-2 α y β en células CHO/S (Life Technologies, Inc., Rockville, MD). Se llevó a cabo la expresión heteróloga de los genes transfectados para asegurar el funcionamiento adecuado del sistema celular CHO/S. Se llevaron a cabo transfecciones simuladas en paralelo. Las transacciones se realizaron en placas de 100 mm (por triplicado) mediante el método de Lipofectamine™ 2000 según los protocolos suministrados por el fabricante (Life Technologies, Inc., Rockville, MD). Se recogieron muestras de lisados celulares y de medios acondicionados 3 ó 4 días tras la transfección. Para preparar los lisados, se lavaron monocapas celulares con PBS, se rasparon de las placas, y se lisaron mediante tres ciclos de congelación-descongelación en 150 μ l de Tris HCl 0,25 M de pH 8. Los restos celulares se sedimentaron y se recuperó el sobrenadante. Las muestras de los medios acondicionados se recogieron, y después se analizaron directamente o se concentraron y se intercambió el tampón con Tris HCl 10 mM, pH 7,4 mediante el uso de unidades Centricon-10 (Ambion). La secreción del producto biológicamente activo del gen NRG-2 humano recombinante se demostró mediante la estimulación de la proliferación de células de Schwann tras la transfección transitoria de células CHO/S y la detección de la bioactividad de NRG-2 en los medios acondicionados en comparación con el lisado celular (Marchionni *et al.*, *Nature* 362: 312-8, 1993).

Las proteínas NRG-2 humanas recombinantes (rhNRG-2) se expresaron de manera eficaz en los medios acondicionados de las células transfectadas (Figs. 3A y 3B), lo que indica que estas proteínas se pueden secretar de manera eficaz a partir de células de mamífero. En la Fig. 3A, los medios acondicionados, a diferencia del lisado celular de las células transfectadas con rhNRG-2 α (y a diferencia de las células transfectadas de manera simulada) expresaron una banda inmunorreactiva específica que aparecía a aprox. 56 kD. En la Fig. 3B, las isoformas α y β se secretaron en los medios acondicionados de las células CHO/S transfectadas (obsérvese que la proteína rhNRG-2 β más pequeña (298 aminoácidos) se desplazó más rápido (aprox. 47 kD) que la proteína rhNRG-2 α (331 aminoácidos), tal como se esperaba).

Después de confirmar la bioactividad de la construcción de expresión en las transfecciones transitorias, se generaron líneas de células CHO/S estables para expresar rhNRG-2 β . El vector pRc/CMV2 contiene un gen de resistencia a Neomicina, de manera que las células transformadas de manera estable se pueden seleccionar en medios que contienen una concentración eficaz de G418. Tras la transfección de las células CHO/S receptoras, las colonias aisladas que sobrevivieron 11 días en los medios selectivos se recogieron mediante el uso de cilindros de clonación. Las células que mostraban el nivel más alto de expresión de rhNRG-2 β y resistencia a G418 se sometieron a un estudio posterior. Tres propiedades útiles de las líneas celulares son la viabilidad sostenida, la adaptación a los medios exentos de suero (o con poco suero), y el nivel de expresión de la proteína recombinante. Así, se expandieron varias líneas en paralelo y se ensayó la adaptación a las condiciones de crecimiento sin suero y la expresión de rhNRG-2 β mediante transferencia de western. El análisis mediante transferencia de western mostró que el medio esencial modificado por Dulbecco complementado con un 2% de suero bovino fetal proporcionó la expresión óptima de rhNRG-2 β en estos experimentos. La bioactividad se ensayó en el material expresado a partir de las líneas candidatas principales. Se clonaron dos aislamientos mediante diluciones limitantes, y se usó una única línea celular aislada para los estudios posteriores.

Además de generar líneas de células CHO/S estables que expresaban proteínas NRG-2, se desarrolló una estrategia que se basaba en la co-amplificación de copias integradas de construcciones de expresión de rhNRG-2 β y un gen transfectado de dihidrofolato reductasa (dhfr). Se construyeron vectores de expresión de mamíferos en pcDNA3.1 (Invitrogen) y pMACSK^{II} (Miltenyi Biotec Ltd.) bajo el control de los promotores de CMV y SV40, respectivamente. Estos vectores se co-transfectaron junto con un vector de expresión de dhfr en células CHO-dhfr y se seleccionaron treinta colonias resistentes a G418, se cultivaron y se analizaron los niveles de expresión mediante transferencia de western (Fig. 10) y RT/PCR. En la Fig. 10 el carril 1 corresponde a la muestra de control de rhNRG-2 β , el carril 2 muestra el sobrenadante de 48 hr de rhNRG2 β de CHO SD (US), los carriles 3-5 muestran el Clon T3B2 de 24-72 hrs, los carriles 6-8 muestran el Clon T3B1 de 24-72 hrs, el carril 9 muestra los marcadores de peso molecular (Invitrogen n° LC5925), los carriles 10-12 muestran el Clon T3A6 de 24-72 hrs, y los carriles 13-15 muestran el Clon de T3A5 de 24-72 hrs. Se seleccionaron los clones T3B2, T3B1, T3A5 para la clonación por dilución y para la amplificación/selección. La co-amplificación se induce mediante un incremento por etapas de las concentraciones de metotrexato, y los clones se monitorizan en busca de incrementos en la producción de rhNRG2 β secretada.

EJEMPLO 5

Generación y Análisis de Antisueros para Detectar la Proteína NRG-2 Expresada

Se generó un antisuero policlonal que detecta de manera específica la proteína NRG-2 expresada como sigue. Se diseñaron péptidos a partir de las secuencias deducidas de NRG-2 humana y de rata para generar antisueros policlonales de conejo para usarlos en la monitorización de los niveles de NRG-2 en las muestras de expresión y de purificación.

Los péptidos usados fueron los siguientes:

K71983M: APLERNQRYIFFLEPTEQPLVFK (SEQ ID N°: 16)

K71984M: NSRLQFNKVKVEDAGEY (SEQ ID N°: 17)

K71985K: NGGVCYYIEGINQLS (SEQ ID N°: 18)

Uno de estos péptidos (K71984M), derivado de la secuencia del dominio de Ig, que es idéntica a las secuencias deducidas de NRG-2 humana y de rata, produjo sueros útiles para realizar la transferencia de western de NRG-2β recombinante de rata en medios acondicionados a partir de las células CHO transfectadas (véase la Fig. 3), y no mostró reactividad cruzada con rhGGF2. Estos antisueros de NRG-2 se purificaron con el péptido inmovilizado. La Fig. 3C muestra un análisis de transferencia de western de medios acondicionados de células CHO que expresan NRG-2β de rata. Los carriles contienen 20 µl de medio acondicionado concentrado 15 veces de células CHO que expresan rrNRG-2β (izquierda) o 10 ng de rhGGF2 (derecha). Se usó suero anti-NRG-2 a 1 µg/ml y se detectó específicamente rrNRG-2β, a 46 kD, pero no rhGGF2, que aparece a 80 kD.

Además, el análisis de los medios de cultivo de monocapas transfectadas transitoriamente de células CHO/S, mediante el uso de plásmidos de expresión de rhNRG-2α y rhNRG-2β y un anticuerpo policlonal de conejo generado hacia un péptido K71984M, indicó que se expresaba tanto rhNRG-2α como rhNRG-2β, y migraron a aproximadamente 55 kD y 47 kD, respectivamente (Fig. 5).

EJEMPLO 6

Bioensayo para la Determinación de la Actividad Biológica de rhNRG-2α y rhNRG-2β Expresadas

Se desarrolló un bioensayo para la detección de rhNRG-2α biológicamente activa. La señalización de neuregulina se da a través de receptores con actividad de tirosina quinasa erbB que pertenecen a la familia de receptores de EGF. La unión del ligando NRG y la activación del receptor se pueden detectar mediante transferencia de western de lisados celulares tratados mediante el uso de antisueros dirigidos hacia los residuos de tirosina fosforilados. Este ensayo se usa para estudiar las interacciones de las proteínas NRG-2 y los receptores erbB en una diversidad de tipos celulares que incluyen, pero sin limitación, las células de Schwann, los progenitores de oligodendrocitos, los miotubos esqueléticos, los cardiomiocitos, y las líneas celulares tumorales humanas de adenocarcinomas de mama y próstata. La NRG-2 biológicamente activa (p.ej., el medio acondicionado de células CHO que expresan NRG-2β recombinante de rata) se puede detectar mediante el uso de este ensayo en la línea celular MCF-7 de adenocarcinoma de mama humano. Los resultados de un experimento que ensaya NRG-2β de rata (rrNRG-2β) y rhGGF2 en células MCF-7 mediante una transferencia de western de un receptor con actividad de fosfotirosina se muestran en la Fig. 4A. Se cultivaron células MCF-7 en placas de 24 pocillos (2 x 10⁵ células/pocillo) y se trataron durante 15 minutos en DMEM-0,1% de FCS que contenía 10 ng/ml de rhGGF2, o diversas diluciones de medio acondicionado por células CHO que expresaban rhNRG-2β. Tras el tratamiento, se eliminaron los medios y las células se lavaron una vez, después se lisaron los cultivos, y se analizaron las muestras mediante transferencia de western (Canoll et al, *Neuron* 17, 229-243, 1996). Los receptores ErbB fosforilados se detectan con el anticuerpo de fosfotirosina RC20B (Transduction Laboratories, Lexington, KY). Una muestra de control positivo para este análisis es un lisado de células A431 tratadas con EGF (carril de la izquierda; Fig. 4A). Cuando no se añadió ni rhGGF2 ni rrNRG-2β a los medios de cultivo, no hubo proteínas detectables que tuvieran tirosinas fosforiladas. Sin embargo, la adición de diversas concentraciones de NRG-2β mostró un incremento dependiente de la dosis de la fosforilación a 185 kd. Esta banda coincidió con la posición esperada de los receptores ErbB2 y ErbB3, que se fosforilaron también en respuesta al tratamiento con rhGGF2 (10 ng/ml). Por lo tanto, este bioensayo proporciona un método fiable para verificar la bioactividad de rhNRG-2α y rhNRG-2β expresada y purificada. Este ensayo, cuando se aplica a una proteína recombinante purificada, permite la cuantificación de la bioactividad de NRG-2 en curvas dosis-respuesta que proporcionan datos comparables a los ensayos de síntesis de ADN. Los bioensayos con receptores con actividad de tirosina quinasa en células MCF-7 tratadas con medios acondicionados de transfecciones transitorias de células CHO/S o con proteínas NRG recombinantes purificadas se muestran también en la Fig. 4B.

EJEMPLO 7

Purificación de Cantidades de Miligramos de rhNRG-2α o β

El medio acondicionado recogido de una línea celular productora (que expresa rhNRG-2α) se ajusta a pH 6,0 con ácido acético y se carga directamente en una columna de S-sepharose equilibrada con acetato sódico (pH 6,0). El material unido se eluye con NaCl 1 M en tampón de acetato, se equilibra con tampón de sulfato amónico y se pasa a través de una columna de interacción hidrófoba (Butyl Sepharose FF) en el mismo tampón. El material unido se eluye con un tampón de salinidad baja (sulfato amónico 800 mM) y se recoge el pico de rhNRG-2α. Al material recogido se le intercambia el tampón y se concentra hasta 1 mg/ml en el tampón de formulación (arginina 100 mM, sulfato sódico 100 mM, NaAc 20 mM, 1% de manitol de pH 6-7) mediante el uso de un cartucho espiral Amicon. Una etapa de purificación opcional final es una columna Sephacryl 200 HR, y el pico eluido de rhNRG-2α se formula en un tampón de formulación. Una aproximación alternativa es seguir el esquema de purificación que se basa en las cromatografías de afinidad con heparina, quelato de Cu y C4 de fase inversa (Higashiyama et al., *J. Biochem.* 122: 675-680, 1997).

Las fracciones de las proteínas de las columnas cromatográficas se monitorizan mediante transferencia de western (p.ej., véanse las Figs. 3A-C) para identificar el pico de rhNRG-2α o β secretada. Las fracciones de los picos y las

preparaciones finales se analizan mediante fosforilación de los receptores en células MCF-7 (véanse las Figs. 4A-B). La pureza se determina mediante electroforesis en gel (tinción con azul de Coomassie) y mediante HPLC analítica (columna Vydac C8 utilizada con un gradiente de acetonitrilo en un 0,1% de ácido trifluoroacético). Las concentraciones de las proteínas se determinan mediante el ensayo de ácido bicinonínico (BCA) (Pierce) con albúmina en suero bovino usada como patrón.

Otro plan general de purificación implica la captura mediante cromatografía convencional con intercambio de cationes seguida por la resolución a partir de las proteínas contaminantes por medio de una o más etapas, por ejemplo, utilizando una cromatografía de carboximetil-Sepharose, seguida por HPLC de fase inversa.

Brevemente, se equilibraron columnas de carboximetil-Sepharose (Fast Flow) de diversos tamaños con NaCl 200 mM, Tris 10 mM de pH 7,4, y después se cargaron las muestras de medios acondicionados, y la columna se lavó aproximadamente con 3 volúmenes de NaCl 200 mM, Tris 10 mM de pH 7,4 (hasta que la absorbancia alcanzó la línea base). La proteína unida se eluyó con NaCl 500 mM, Tris 10 mM a pH 7,4. Esta elución fue seguida por un lavado de salinidad elevada (NaCl 1 M, Tris 10 mM de pH 7,4) para 3 volúmenes de columna. Las fracciones se recogieron y se analizaron mediante transferencia de western y se tiñeron las proteínas de los geles mediante oro o azul de Coomassie (4-20% de acrilamida Tris-glicina-SDS). Dependiendo de la escala de la columna y la cantidad de proteína cargada capturada, rhNRG-2 β representó un 10-70% de la proteína eluida en NaCl 0,5 M de la columna. No se detectó rhNRG-2 β en el caudal de salida, ni en las fracciones de NaCl 0,2 M o NaCl 1 M, con tal de no haber sobrecargado la columna. Se obtuvieron mejoras significativas en la recuperación (>90%) incluyendo inhibidores de proteasas y haciendo funcionar la columna en frío. La escala de la cromatografía de captura se incrementó, comenzando con columnas de 10 ml, hasta columnas de 40 ml, 100 ml, y 200 ml. Los resultados globales fueron coherentes en cuanto a la recuperación y la purificación, lo que indica que la escala de esta etapa se puede ajustar para adaptarse al volumen del material de partida disponible.

El método de purificación se desarrolló adicionalmente con una HPLC de fase inversa mediante el uso de una columna C4 (columna Vydac 214 TP 1010, 1 cm x 25 cm) utilizada en una Biocad Perfusion Chromatography Workstation. Se llevó a cabo una serie de análisis piloto con fracciones mezcladas de diversas columnas de carboximetil-Sepharose que contenían rhNRG-2 β en TrisHCl 10 mM de pH 7,4, NaCl 0,5 M. La columna se hizo funcionar a un caudal de 1 ml/min y se equilibró con un 0,2% de TFA. Después de inyectar la muestra, se realizó un lavado de la columna de 10 min. con un 0,2% de TFA seguido de una rampa lineal de 30 min. hasta un 90% de acetonitrilo, 0,2% de TFA, y se usó una etapa de lavado final de 10 min. con un 90% de acetonitrilo, 0,2% de TFA para completar el método. Las fracciones se analizaron mediante transferencia de western. Solamente se incluyeron las fracciones que contenían rhNRG-2 β muy pura en la mezcla final. Tal como se determinó mediante tinción con azul de Coomassie del gel mostrado en la Fig. 11, la preparación de rhNRG-2 β tuvo una pureza de aproximadamente un 92%. Sin embargo, aproximadamente un 60-70% de la inmunoreactividad detectada a lo largo del cromatograma de HPLC no estuvo incluida en la mezcla de rhNRG-2 β . Por lo tanto, aunque se ha alcanzado una purificación del 90% en 2 etapas, se puede llevar a cabo una tercera etapa para posibilitar una recuperación más completa de rhNRG-2 β . Esta tercera etapa puede incluir heparina-Sepharose y/o varias modificaciones de la etapa de HPLC de fase inversa (p.ej., variaciones de los disolventes).

La tinción de oro proporciona otro método sensible para detectar proteínas contaminantes en preparaciones de proteínas, y esta tinción detecta fácilmente cantidades de nanogramos de proteína. Para visualizar el proceso de purificación y para analizar adicionalmente la pureza de rhNRG-2 β , se compararon muestras de diferentes etapas de purificación (Fig. 12). Las muestras se analizaron en geles de un 4% - 20% de SDS-PAGE (Novex, n° de cat. EC 6025) en condiciones reductoras. Los geles se transfirieron a una membrana de PVDF, y se tiñó la proteína total con Gold Stain (Amersham, n° de cat. RPN490). Para prevenir la sobrecarga del carril, el material de partida (medios acondicionados exentos de suero) se cargó a un 1% de la cantidad relativa de las muestras de purificación. La observación principal de este análisis fue que se había alcanzado una purificación muy significativa en dos etapas.

Se usó el ensayo de fosforilación de tirosinas llevado a cabo con la línea celular MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano) para medir la bioactividad de las muestras de NRG-2 purificada. Brevemente, los cultivos se expusieron a las muestras de ensayo (diluciones de las muestras de purificación en un medio que contenía un 0,1% de FCS) durante 15 min a 37 °C, después se aspiraron los medios, y se añadieron 50 μ l de tampón de muestra 2x que contenía DTT y ortovanadato de sodio 1 mM. Las muestras se prepararon para la electroforesis y la transferencia de Western. La muestra de control, un lisado de células A431 tratadas con factor de crecimiento epidérmico, fue proporcionada por el proveedor (Transduction Laboratories, Lexington, KY). Además de monitorizar la producción de rhNRG-2 β , se examinó la actividad de las muestras de rhNRG-2 β purificadas mediante HPLC diluidas en vehículos compatibles con procedimientos de purificación, tales como un 50% de acetonitrilo (AN) o PBS (Fig. 13). A las concentraciones usadas en este experimento, AN no interfirió de manera drástica con la señal de NRG.

EJEMPLO 8

Actividad de NRG-2 sobre Progenitores de Oligodendrocitos

Se lleva a cabo el estudio del efecto de rhNRG-2 α y rhNRG-2 β sobre la proliferación y la supervivencia de progenitores de oligodendrocitos cultivados, mediante el uso de rhGGF2 para la comparación. Se generan progenitores de

oligodendrocitos de ratas de 2 días de edad según el método de McCarthy y DeVellis (*J. Cell Biol.* 85: 890-902, 1980), y las células se cultivan en medios definidos N2 que contienen un 0,5% de FBS (DM+) durante uno a tres días para enriquecer las células del linaje de oligodendrocitos. La pureza de los cultivos se establece mediante análisis de inmunofluorescencia con el uso de una serie de anticuerpos dirigidos hacia GFAP, un marcador de astrocitos; OX42 monoclonal, un marcador de microglía (Harlan Bioproducts for Science); anti-A2B5 monoclonal (Boehringer Mannheim), un marcador de progenitores O-2A; O4 y O1, que reconocen los oligodendrocitos tempranos y maduros, respectivamente (Sommer *et al.*, *Dev. Biol.* 83: 311-327, 1980); RPTP- β (obsequio de J. Schlessinger, NYU Med. Ctr.) y anticuerpos hacia nestina (Developmental Studies Hybridoma Bank), que reconocen preferentemente las células tempranas del linaje de oligodendrocitos (Canoll *et al.*, *Neuron* 17, 229-243, 1996; Gallo *et al.*, *J. Neurosci.* 15: 394-406, 1995).

Para determinar el porcentaje de células que sintetizan ADN en respuesta a rhNRG-2 α , rhNRG-2 β , o rhGGF2 se tratan los cultivos durante 16 h y durante las 4 h finales en presencia de bromodesoxiuridina 10 μ M (BrdU; Sigma). Las células marcadas con BrdU se detectan mediante el uso de un equipo de inmunodetección anti-BrdU conjugado a fluoresceína (Boehringer Mannheim). El índice de marcaje, que corresponde a la proporción de células BrdU+ respecto de las células totales, se determina a partir de microfotografías de campos individuales de núcleos marcados con BrdU y teñidos con tinción de Hoechst. Para determinar el índice de marcaje en etapas específicas de la diferenciación, la tinción con BrdU se combina con el análisis de inmunofluorescencia de O4, O1 y GFAP.

Para determinar el efecto de NRG-2 sobre la supervivencia celular, las células que crecen en medio acondicionado con B104 se cambian a medios DM+ durante tres días. Después se cambian a medios N2 o DMEM con o sin rhGGF2, rhNRG-2 α , o rhNRG-2 β durante 12 ó 24 horas y se tiñen con el equipo de tinción Live/Dead (Molecular Probes, Inc) durante 15 min siguiendo las instrucciones del fabricante. Se usan criterios morfológicos para cuantificar la muerte celular, es decir, monitorizar las células picnóticas, con microscopía de fases y el ensayo de MTT (Sigma) en experimentos diferentes.

EJEMPLO 9

Actividad de NRG-2 sobre las Células Gliales del Bulbo Olfatorio

El bulbo olfatorio de rata es un tejido excepcional del SNC. A diferencia de otras áreas del cerebro, los axones en crecimiento son capaces de entrar en el bulbo olfatorio y prolongarse dentro de este medio del SNC a lo largo de la vida adulta. Las células gliales del sistema olfatorio, conocidas como células gliales del bulbo olfatorio (OBECs), pueden tener un papel importante en la regeneración neural del SNC (Li *et al.*, *J. Neurosci.* 18: 10514-10524, 1998). Las OBECs son células gliales inusuales que poseen propiedades tanto de los astrocitos como de las células de Schwann, y pueden ser células útiles para ayudar en la regeneración de la médula espinal. Las OBECs expresan los receptores funcionales de NRG erbB2 y erbB4 (Pollock *et al.* *Eur. J. Neurosci.* 11: 769-780, 1999). Además, se expresan niveles elevados de polipéptidos NRG-2 en el bulbo olfatorio. Por lo tanto, estas OBECs son candidatos ideales para comparar las bioactividades de los productos de los genes de NRG-1 a NRG-2.

Las OBECs se purifican a partir de ratas en el día 7 posnatal mediante separación celular activada por fluorescencia mediante el uso del anticuerpo O4 (Barnett, In: *Culture of Animal Cells*, I.R. Freshney, 3ª Edición. págs. 337-341. Wiley-Liss, Nueva York, Nueva York, 1993; Barnett *et al.*, *Dev Biol.* 155: 337-350, 1993). Tras la separación, las suspensiones celulares se colocan sobre cubreobjetos y se incuban en DMEM-BS que contiene un 10% de medio acondicionado de astrocitos (ACM) durante la noche a 37° C (para favorecer la supervivencia celular) antes del tratamiento con factores de crecimiento o ACM. La actividad mitogénica se ensaya mediante la incorporación de BrdU en las células en división, y se llevan a cabo ensayos de supervivencia y apoptosis celular como se describió (Pollock *et al.* *Eur. J. Neurosci.* 11: 769-780, 1999).

EJEMPLO 10

Actividad de NRG-2 sobre las Neuronas Dopaminérgicas del Mesencéfalo

El receptor de NRG erbB4 se expresa en las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo en rata, ratón y mono. La administración de proteínas NRG humanas recombinantes en el cuerpo estriado es útil en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Se llevan a cabo estudios mediante el uso de las proteínas ejemplares, rhNRG-2 α , rhNRG-2 β , y rhGGF2, para investigar adicionalmente la respuesta del sistema nigroestriado dopaminérgico a las NRGs. Las dos proteínas NRG se comparan en función de su actividad promotora de la supervivencia (es decir, la protección de la muerte celular inducida por agentes que inducen estrés oxidativo) sobre las neuronas dopaminérgicas (por ejemplo, de líneas celulares de neuroblastoma fetal de roedores y humanos, p.ej., SKNNC) *in vitro*. Las células pre-tratadas con concentraciones variables de rhNRG-2 α , rhNRG-2 β , o rhGGF2 se exponen a un tratamiento de veinticuatro horas de metadiona 1 μ M o ditiocarbamato de dietilo 100 mM para inducir el estrés oxidativo, y la muerte celular se cuantifica mediante métodos habituales. También se puede usar un modelo *in vivo* de liberación de dopamina y estudios electroquímicos y de comportamiento de la función dopaminérgica en ratas.

Se ensayó la actividad promotora de la supervivencia de las proteínas NRG en neuronas dopaminérgicas de rata *in vitro*. Específicamente, se determinó si las proteínas NRG eran neuroprotectoras para las neuronas dopaminérgicas que se expusieron en cultivo con 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Las células pre-tratadas con rhNRG-2 β o rhGGF2 y

los cultivos de control sin tratar se expusieron a 6-OHDA 50 μ M durante 24 h, después se tiñeron los cultivos para tirosina hidroxilasa (TH) y se examinaron mediante microscopía óptica (Fig. 14). La Fig. 14 muestra los cultivos primarios del mesencéfalo inmunoteñidos para tirosina hidroxilasa (TH) en el día *in vitro* (DIV) 7. El panel superior muestra un cultivo tratado con 100 nanogramos de rhNRG-2 β diariamente comenzando en DIV 0 y finalizando en DIV 3. En el DIV 4, el cultivo se trató con 6-OHDA 50 μ M. El panel inferior muestra un cultivo que no recibió pretratamiento, pero se trató con 6-OHDA 50 μ M en el DIV 4. Se analizó la inmunorreactividad hacia TH en ambos cultivos en el DIV 7. La barra de calibración equivale a 50 micras y se aplica a los paneles superior e inferior. Se observaron patrones de tinción similares en todos los cultivos. La densidad, el número y la longitud de las neuritas de las neuronas TH-positivas se redujeron mediante el tratamiento con 6-OHDA en el cultivo que no recibió pretratamiento. En contraste, el cultivo pretratado con rhNRG-2 β muestra un desarrollo morfológico normal, que es comparable a los resultados observados con rhGGF2. Este resultado se ha replicado en varios experimentos con cultivos. Los resultados indican que rhNRG-2 β tiene efectos beneficiosos *in vivo*, que se pueden ensayar, por ejemplo, en un modelo animal de enfermedad de Parkinson.

EJEMPLO 11

Desarrollo y Migración Neuronal en el Cerebelo

Las isoformas de NRG-1, NRG-2, y el receptor erbB4 se expresan a niveles elevados en el cerebelo (Chen *et al.*, *J. Comp Neurol* 349: 389-400, 1994; Chang *et al.*, *Nature* 387: 509-512, 1997; Lai *et al.*, *Neuron* 6: 691-704, 1991). Se pueden estudiar RhNRG-2 α , rhNRG-2 β , y rhGGF2 en ensayos de cultivos celulares de migración y neurogénesis en el cerebelo. RhNRG-2 α , rhNRG-2 β , y rhGGF2 se comparan con respecto a su efecto sobre la proporción de migración de neuronas granulares cerebelares en un sustrato de células gliales. Se hacen cultivos grabados de cerebelo de rata del día 5 posnatal que contienen glía de Bergmann intacta con neuronas en migración unidas a ellas como se describió (Anton *et al.*, *J. Neurosci.* 16: 2283-2293, 1996). La migración neuronal se monitoriza mediante el uso de un microscopio Zeiss Axiovert 135 equipado con un objetivo Zeiss W63, y las imágenes se registran en un disco óptico. Los cambios en la proporción y el patrón de la migración neuronal, las interacciones neurona-glía, y la morfología se monitorizan en respuesta a rhNRG-2 α , rhNRG-2 β , y rhGGF2.

Los efectos sobre la neurogénesis granular cerebelar se estudian en cultivos disociados de neuronas granulares cerebelares de rata posnatal. Los precursores neurales en división se purifican a partir de cerebelo del 5 día posnatal mediante centrifugación en gradiente de densidad de Percoll y se colocan en un cultivo celular disociado. Los cultivos se tratan después con BrdUrd 10 μ M (para marcar las células en división) y con concentraciones variables de rhNRG-2 α , rhNRG-2 β , y rhGGF2. Después de dos a siete días adicionales en cultivo, se ensaya la diferenciación en líneas de células neuronales y gliales mediante inmunotinción con el uso de marcadores específicos del tipo celular, tales como GFAP (glial) y TUJ1 (neuronal). Para cada condición de cultivo, se enumera el número total de células, las células marcadas con BrdU, y las células identificadas con cada marcador. Las células que entraron en un linaje celular particular desde la exposición a estos factores de crecimiento se identifican como las marcadas con BrdU más uno de los marcadores. El porcentaje de células marcadas con BrdU teñidas con cada marcador proporciona así una medida de los efectos de cada factor de crecimiento sobre la génesis y la supervivencia de las neuronas y la glía. El análisis del número total de células en diversos momentos y del número de células apoptóticas en diferentes condiciones se usa para estudiar cualquier efecto potencial de rhNRG-2 α , rhNRG-2 β , y rhGGF2 sobre la supervivencia selectiva de los precursores neuronales o de sus derivados neuronales o gliales.

Las isoformas de NRG-1, NRG-2 y el receptor de erbB4 se expresan a niveles elevados en el cerebelo, lo cual hace que los estudios *in vitro* de las células neurales del cerebelo sea un componente importante de estos estudios. Tanto rhNRG-2 β como rhGGF2 se estudiaron en ensayos de cultivo celular de la migración y la neurogénesis en el cerebelo. Se realizaron cultivos grabados de cerebelo de rata del día 5 posnatal que contenían glía de Bergmann intacta con neuronas en migración unidas a ella y se analizaron. La migración neuronal se monitorizó mediante el uso de un microscopio Zeiss Axiovert 135 equipado con un objetivo Zeiss W63, y las imágenes se registraron en un disco óptico. Los cambios de la proporción y el patrón de migración neuronal, las interacciones neurona-glía, y la morfología se monitorizaron en respuesta a rhnrG-2 β y rhGGF2 (Figs. 16A-B). La proporción de la migración neuronal de las neuronas granulares cerebelares se midió antes y después de la exposición a rhNRG2 β (100 ng/ml), rhGGF2 (50 ng/ml), o medios de control sin suplementar. La Fig. 16A muestra neuronas que migran en una prolongación de células gliales monitorizadas antes (paneles a la izquierda de la flecha negra) y después (paneles a la derecha de la flecha negra) de la adición de factores de crecimiento (aquí se muestra rhGGF2). El tiempo transcurrido entre cada panel es de una hora. La Fig. 16B demuestra que la exposición a rhGGF2 favoreció la proporción de migración de neuronas en un 45 $\pm$ 2,1%. En contraste, ni el medio de control ni rhNRG-2 β alteraron la proporción de migración. El asterisco indica la significación, $P < 0,05$. Los datos mostrados son la media $\pm$ EEM ($n > 16$ para cada grupo). Por lo tanto, en contraste con el incremento observado en la proporción de migración neuronal estimulada mediante rhGGF2, rhNRG-2 β no tuvo un efecto aparente. Sin embargo, cuando se estudiaron los progenitores neurales cerebrales en un cultivo disociado, rhNRG-2 β estimuló la proliferación y/o la supervivencia de las neuronas granulares externas (EGL) (Figs. 15 A-B). Las células de la capa granular externa (EGL) se disociaron y se cultivaron en medio neurobasal (NB)/N2 o en medio NB/N2 complementado con 100 ng/ml de rhNRG-2 β durante 5 días. Se añadió BrdU 10 μ M a todos los cultivos desde el comienzo. Las células se fijaron después y se analizaron con un anticuerpo policlonal específico de neuronas (Tuj-1; Babco) y con anticuerpos monoclonales anti-BrdU. Se contaron las células que se marcaron con Tuj-1 solo (es decir, neuronas; asterisco [A]), BrdU+Tuj-1 (es decir, neuronas generadas a

partir de neuroblastos en división en cultivo; flecha [A]), y BrdU sólo (es decir, células no neuronales; punta de flecha [A]). En comparación con el control, se descubrió que más neuronas (flecha, [A]) habían incorporado BrdU (naranja) en sus núcleos cuando se cultivaron en un medio que contenía rhNRG-2 β . Se detectó la inmunorreactividad hacia BrdU con un anticuerpo anti-ratón conjugado a Cy3 (rojo). Se detectó la inmunorreactividad de Tuj-1 con un anticuerpo anti-conejo conjugado a FITC. Se contó el número de células positivas para Tuj-1 y BrdU. Los recuentos celulares del grupo de rhNRG-2 β se normalizaron respecto del grupo de control para obtener la proporción de cambio basal del número de neuronas positivas para BrdU. Este resultado sugiere que rhNRG-2 β estimula la proliferación celular de EGL o la supervivencia selectiva de neuronas granulares cerebelares recién generadas. Estos datos ejemplifican, por tanto, una bioactividad sobre las células neuronales que es aplicable más en general a las poblaciones neuronales que expresan erbB4.

EJEMPLO 12

Actividad de NRG-2 sobre Cardiomiocitos Ventriculares

Para examinar el papel de los ligandos NRG y de sus receptores en el miocardio en desarrollo y posnatal, se estudió la capacidad de las proteínas NRG-2 de estimular la proliferación, la supervivencia y el crecimiento de miocitos cardíacos aislados de rata neonatal y adulta. Los tres receptores conocidos de neurregulinas, erbB2, erbB3, y erbB4, se expresan en el corazón en desarrollo en E14, tras lo cual la expresión de erbB3 disminuye rápidamente, mientras la expresión de erbB2 y erbB4 persiste en los miocitos ventriculares hasta la edad adulta. Se estudian las actividades *in vitro* de rhNRG-2 α y rhNRG-2 β en los cardiomiocitos en comparación con rhGGF2. Específicamente, se comparan los efectos de los dos factores de crecimiento sobre la supervivencia, la hipertrofia, y la expresión de proteínas contráctiles en cardiomiocitos tal como se describe más adelante. Se preparan cultivos primarios de miocitos ventriculares de rata neonatal (NRVM) como se describió previamente (Springhorn *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267: 14360-14365, 1992). Para enriquecer selectivamente los miocitos, se centrifugan las células disociadas dos veces a 500 rpm durante 5 min, se colocan previamente en placas dos veces durante 75 min, y finalmente se colocan en placas a baja densidad (0,7 – 1 x 10⁴ células/cm²) en medio DME complementado con un 7% de FBS. Se añade arabinósido de citosina (AraC; 10 M; Sigma) durante las primeras 24-48 h para impedir la proliferación de células que no son miocitos. A menos que se indique de otra manera, todos los experimentos se llevan a cabo 36-48 h después de cambiar hasta un medio exento de suero, DME más ITS (Sigma). Mediante el uso de este método, se obtienen de manera rutinaria cultivos primarios con >95% de miocitos, tal como se determina mediante observación microscópica de la contracción espontánea y mediante tinción de inmunofluorescencia con un anticuerpo monoclonal anti-cadena pesada de miosina cardíaca (anti-MHC; Biogenesis, Sandown, NH).

El aislamiento y la preparación de cultivos primarios de miocitos ventriculares de rata adulta (ARVM) se lleva a cabo mediante el uso de las técnicas descritas previamente (Berger *et al.*, *Am. J. Physiol.* 266: H341-H349, 1994). Se colocan en placas miocitos cardíacos en forma de varilla en un medio de cultivo en placas prerrevestidas con laminina (10 μ g/ml) durante 60 min, seguido por un cambio de medio para eliminar las células unidas débilmente. La contaminación de los cultivos primarios de ARVM por células que no son miocitos se determina contando con un hemocitómetro, y en general es menor del 5%. Todos los cultivos primarios de ARVM se mantienen en un medio definido denominado "ACCITT" (Ellingsen *et al.*, *Am. J. Physiol.* 265: H747-H754, 1993) compuesto de DME, complementado con 2 mg/ml de BSA, L-carnitina 2 mM, creatina 5 mM, taurina 5 mM, insulina 0,1 μ M, y triyodotironina 10 nM con 100 UI/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomycin. En los protocolos experimentales diseñados para examinar la supervivencia y/o la apoptosis de los miocitos, se omite la insulina del medio definido, que por lo tanto se denomina "ACCTT".

Las medidas de las velocidades de la síntesis de proteínas (absorción de [³H]leucina) se usan para monitorizar los efectos de los factores de crecimiento sobre la hipertrofia de los cardiomiocitos. Para estos experimentos, se añade arabinósido de citosina 10 μ M al medio de cultivo. Las células se cultivan en un medio exento de suero durante 36 a 48 h y después se estimulan con dosis diferentes de rhNRG-2 α , rhNRG-2 β , o rhGGF2. Después de 40 h, se añade [³H]leucina (5 μ Ci/ml) durante 8 horas, y las células se lavan con PBS y se recogen con un 10% de TCA. Se determina la radiactividad precipitable con TCA mediante un recuento de centelleo.

Se usa la inmunocitoquímica para examinar los cambios en el fenotipo de los miocitos con rhNRG-2 α , rhNRG-2 β , o rhGGF2. Por ejemplo, tras el tratamiento con los factores de crecimiento, las células se fijan en un 4% (p/v) de paraformaldehído durante 30 min a temperatura ambiente, se lavan con PBS, se permeabilizan con un 0,1% de Triton X-100 durante 15 min, y después se incuban con un 1% de FBS durante otros 15 min, seguido por una incubación con un anticuerpo anti-cadena pesada de miosina (1:300) y se visualizan con un anticuerpo secundario conjugado a TRITC (NRVM) o FITC (ARVM). Los ARVM se examinan mediante el uso de un microscopio confocal MRC 600 con un láser de Kr/Ar.

Se estudiaron las actividades *in vitro* de rhNRG-2 α y rhNRG-2 β en los cardiomiocitos en comparación con rhGGF2. Se llevaron a cabo estudios sobre la hipertrofia celular (tal como se monitoriza midiendo la síntesis de proteínas) y la activación de las rutas de señalización que incluyen p42/44 MAPK y Akt (Fig. 17 y Fig. 18). Se colocaron en placas los miocitos ventriculares de rata neonatal aislados de ventrículo de rata neonatal de 1 día de edad en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos con ~80.000 células/pocillo durante 24 hrs en un 10% de FCS, y después se privaron de suero durante la noche. Las células se trataron con neurregulinas recombinantes en presencia de ³H-leucina

durante 24 hrs. La proteína celular se precipitó con un 5% de TCA y se lisó con NaOH 0,4 N. Se midió la incorporación de ^3H -leucina con un recuento de centelleo, y se presentó como la media de 4 pocillos tratados de manera idéntica dividida entre los recuentos medios de las células sin tratar. Se colocaron en placas miocitos ventriculares de rata neonatal en p100s ~ 2-3 millones de células/placa durante 24 hrs en un 10% de FCS, y después se privaron de suero durante 24 hrs. Las células se trataron con neurregulinas recombinantes durante 10 min, después se lisaron con tampón que contenía proteasa e inhibidores de fosfatasas (New England Biolabs). Las muestras que representaban 70 μg de proteína se analizaron en un gel al 10% (BioRad), y se transfirieron a una membrana de PVDF para la detección de Erk o Akt fosforiladas mediante el uso de anticuerpos fosfo-específicos de New England Biolabs. Tanto rhGGF2 como rhNRG-2 β incrementaron la síntesis de proteínas aproximadamente un 40% a todas las concentraciones examinadas. Sin embargo, rhNRG-2 α no tuvo efecto sobre la síntesis de proteínas a la concentración analizada. La transferencia mostrada (Fig. 17) es representativa de 2 experimentos diferentes.

Estos resultados indican que la señalización de NR2 puede actuar para estimular la proliferación, la supervivencia, y el crecimiento de los miocitos cardiacos, durante y después de la trabeculación miocárdica. Además, la persistencia de los receptores de NRG en el corazón post-natal y adulto sugiere un papel continuado de las neurregulinas en la adaptación miocárdica al estrés fisiológico o a las lesiones.

EJEMPLO 13

Ensayo de Supervivencia Celular y Detección de la Apoptosis

Se determina la viabilidad celular mediante el ensayo de respiración celular con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT, Sigma). Se estimulan cultivos primarios de NRVM después de 2 días en medio exento de suero con diferentes concentraciones de rhNRG-2 α , rhNRG-2 β , o rhGGF2 durante 4 ó 6 días. Se mantienen los ARVM en medio ACCTT o medio ACCTT más diferentes concentraciones de rhNRG-2 α , rhNRG-2 β , o rhGGF2 durante 6 días. MTT se incuba después con las células durante 3 h a 37° C. Las células vivas transforman el anillo de tetrazolio en cristales de formazano azul oscuro que se pueden cuantificar leyendo la densidad óptica a 570 nm tras la lisis celular con sulfóxido de dimetilo.

Se detecta la apoptosis en miocitos neonatales y adultos mediante el uso del ensayo de marcaje del extremo libre con dUTP mediado por la desoxinucleotidiltransferasa terminal (TdT) (TUNEL). El marcaje del extremo 3' del ADN con dUTP conjugada a fluoresceína se lleva a cabo mediante el uso de un equipo de detección *in situ* de muerte celular (Boehringer Mannheim) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realiza una tinción de contraste de las células con un anticuerpo anti-MHC como se describió anteriormente, y los núcleos también se tiñen con Hoescht 33258 (10 μM , Sigma) durante 5 min. Se cuentan más de 500 miocitos en cada cubreobjetos, y se calcula el porcentaje de miocitos positivos para TUNEL.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido NRG-2 que consiste de la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID N°: 4.
2. El polipéptido de la reivindicación 1 para el uso en la terapia.
3. Una molécula de ácido nucleico que:
 - 5 a) consiste en una secuencia que codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID N°: 4; o
 - b) consiste en la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID N°: 3.
4. Una molécula de ácido nucleico que consiste en una secuencia que es inversa respecto de la secuencia de la cadena codificante de una secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID N°: 3, en la que la secuencia que es inversa respecto de la secuencia de la cadena codificante de la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID N°: 3 es mayor de al menos 50 nucleótidos.
- 10 5. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 4, en la que la secuencia que es inversa respecto de la secuencia de la cadena codificante de la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID N°: 3 es mayor de al menos 60 nucleótidos, 75 nucleótidos o 110 nucleótidos.
- 15 6. Un vector, en el que el vector contiene una secuencia de ADN recombinante, en el que la secuencia de ADN comprende una secuencia que codifica un polipéptido NRG-2 unida de forma operable a un promotor, y en el que la secuencia que codifica NRG-2 consiste en SEQ ID N°: 3.
7. Una célula que comprende el vector de la reivindicación 6.
8. La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 3, la reivindicación 4 o la reivindicación 5, el vector de la reivindicación 6 o la célula de la reivindicación 7 para el uso en la terapia.
- 20 9. Un animal transgénico no humano que comprende el vector de la reivindicación 6.
10. Un animal transgénico no humano que comprende una mutación por inactivación génica en uno o ambos alelos que codifican el polipéptido de NRG-2 que consiste en la secuencia expuesta en SEQ ID N° 4.
11. Una célula del animal transgénico no humano de la reivindicación 9 ó 10.
- 25 12. Un método *ex vivo* para incrementar la mitogénesis, la supervivencia, o el crecimiento de una célula que expresa un receptor erbB que es selectivo para un polipéptido NRG-2 que consiste en la secuencia de SEQ ID N°: 4, en el que la célula es una célula neuronal, una célula de Schwann, un oligodendrocito, una célula progenitora O-2A, una célula glial, o una célula glial del bulbo olfatorio o una célula muscular.
13. El método de la reivindicación 12, en el que dicho receptor erbB se selecciona de un homodímero de erbB4, un heterodímero de erbB2/erbB4, y un heterodímero de erbB1/erbB3.
- 30 14. El método de la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en el que la célula es una célula neuronal o una célula muscular.
15. El método de la reivindicación 14, en el que
 - a) dicha célula neuronal es una neurona dopaminérgica o una neurona granular externa; o
 - 35 b) dicha célula muscular es un mioblasto, un miocito, o una célula muscular cardíaca.
16. El método de la reivindicación 12, en el que la célula es un oligodendrocito, una célula progenitora O-2A, o una célula glial del bulbo olfatorio.
17. Un método *ex vivo* para estimular la mitogénesis de una célula glial mediante la administración a la célula de un polipéptido NRG-2 que consiste en la secuencia de SEQ ID N°: 4.
- 40 18. El método de la reivindicación 17, en el que dicha célula glial se selecciona de oligodendrocitos, glía mielinizante, y células gliales del bulbo olfatorio.
19. Un método *ex vivo* para inducir la mielinización de una célula neuronal por una célula glial mediante la administración de un polipéptido NRG-2 que consiste en la secuencia de SEQ ID N°: 4 a las células.
- 45 20. Un método *ex vivo* para incrementar la supervivencia de los cardiomiocitos, la proliferación de los cardiomiocitos, o el crecimiento de los cardiomiocitos mediante la administración de un polipéptido NRG-2 que consiste en la secuencia de SEQ ID N°: 4 al cardiomiocito.

21. Un polipéptido NRG-2 recombinante para el uso en el tratamiento o la profilaxis de una afección fisiopatológica del sistema nervioso, en el que dicho polipéptido NRG-2 es una secuencia que consiste en SEQ ID N°: 4, en el que dicha afección fisiopatológica se selecciona del grupo que consiste en: esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson, y lesión de la médula espinal.
- 5 22. El polipéptido de la reivindicación 21, en el que la afección fisiopatológica es esclerosis múltiple.
23. El polipéptido de la reivindicación 21, en el que la afección fisiopatológica es esclerosis lateral amiotrófica.
24. El polipéptido de la reivindicación 21, en el que la afección fisiopatológica es la enfermedad de Parkinson.
25. El polipéptido de la reivindicación 21, en el que la afección fisiopatológica es una lesión de la médula espinal.
- 10 26. Una célula que produce un polipéptido NRG-2 recombinante purificado para el uso en el tratamiento o la profilaxis de una afección fisiopatológica del sistema nervioso, en la que la célula produce el polipéptido de la reivindicación 1.
- 15 27. La célula que produce un polipéptido NRG-2 recombinante purificado de la reivindicación 26, en la que dicha célula que produce un polipéptido NRG-2 contiene una secuencia de ADN recombinante, en la que dicha secuencia de ADN comprende una secuencia que codifica un polipéptido NRG-2 unida de forma operable a un promotor, y en la que la secuencia que codifica NRG-2 consiste en SEQ ID N°: 3.
- 20 28. Un polipéptido NRG-2 para el uso en el tratamiento o la profilaxis de una afección fisiopatológica incrementando la supervivencia de los cardiomiocitos, la proliferación de los cardiomiocitos, o el crecimiento de los cardiomiocitos en un ser humano, en el que el polipéptido de NRG-2 consiste en la secuencia de SEQ ID N°: 4 y además en el que la afección fisiopatológica se selecciona del grupo que consiste en: cardiomiopatía, lesión isquémica, traumatismo cardíaco, e insuficiencia cardíaca.
29. El polipéptido o la célula de cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 7 y 21 a 28, en el que dicho polipéptido de NRG-2 está codificado por la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID N°: 3.
- 25 30. Un método *ex vivo* para diagnosticar una probabilidad incrementada de desarrollar una enfermedad cardiovascular en un ser humano, y dicho método comprende analizar las moléculas de ácidos nucleicos de dicho ser humano para determinar si dicho ser humano contiene una mutación en un gen que codifica un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID N°: 4, en el que la presencia de dicha mutación es una indicación de que dicho sujeto de ensayo tiene o tiene una probabilidad incrementada de desarrollar la enfermedad cardiovascular.

FIG. 1

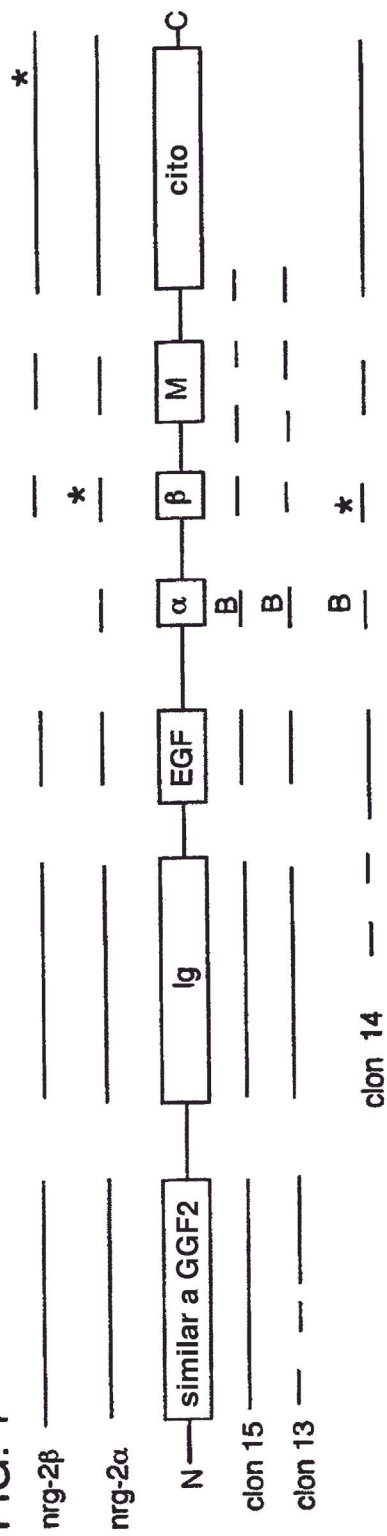


FIG. 2

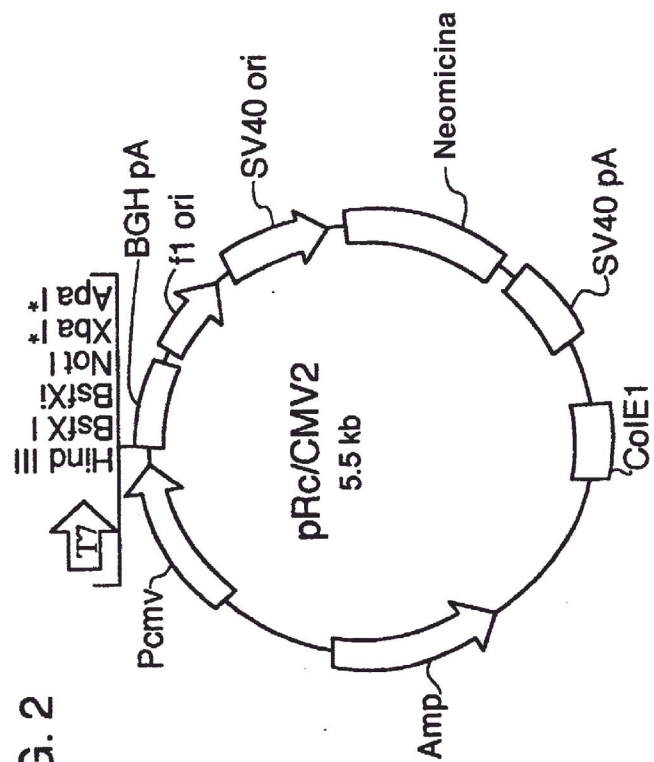


FIG. 3C

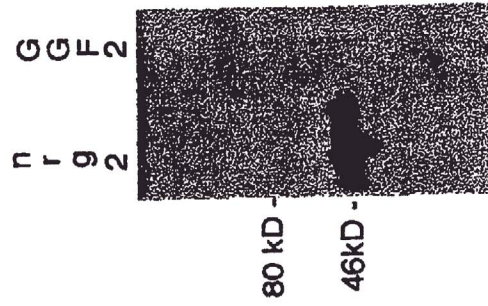


FIG. 3B

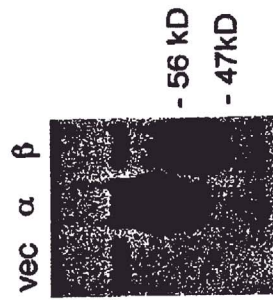


FIG. 3A

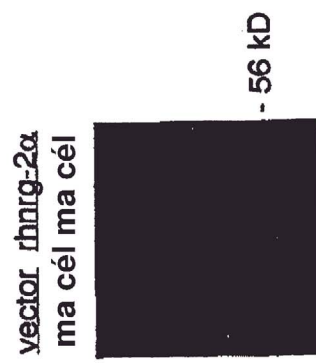


FIG. 4A

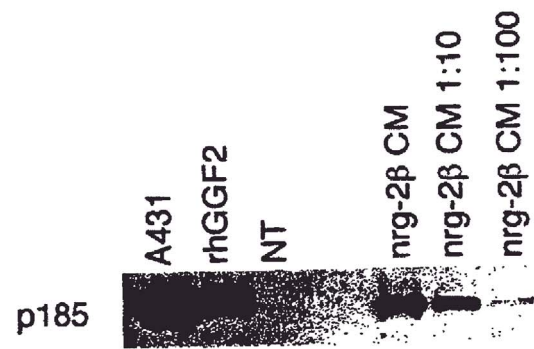


FIG. 4B



FIG. 5

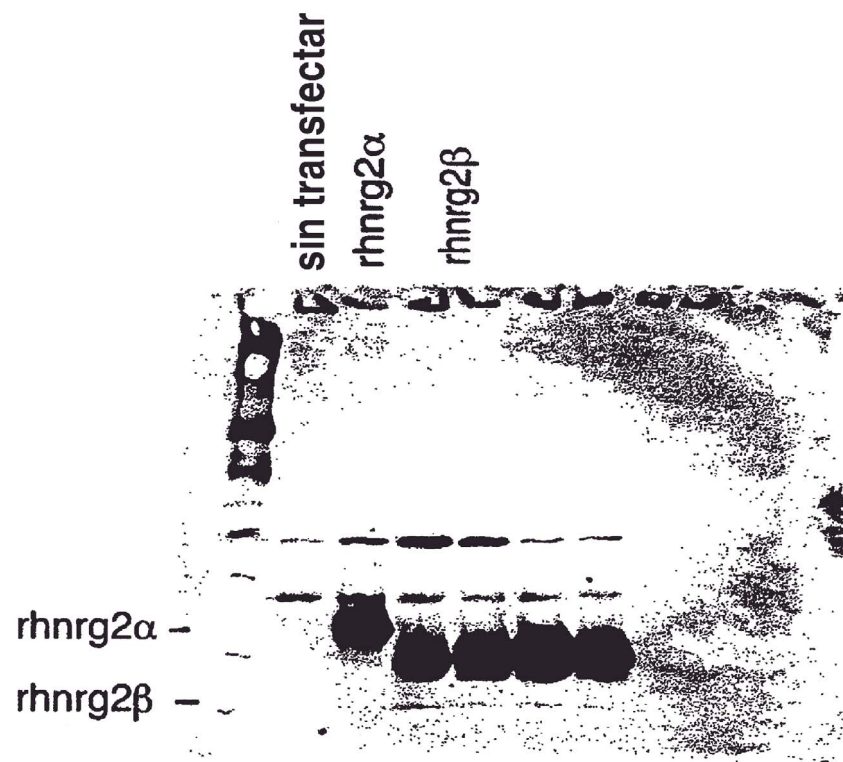


FIG. 6

ATGAGGCGCGACCCGGCCCCCGGCTTCTCCATGCTGCTCTTCGGTGTGTGCTCGCC
TGCTACTCGCCCAGCCTCAAGTCAAGTGCAGGACCAGGCGTACAAGGCACCCGTGGT
GGTGGAGGGCAAGGTACAGGGGCTGGTCCCAGCCGGCGGCTCCAGCTCCAACAGCA
CCCGAGAGCCGCCCGCTCGGGTCGGGTGGCGTTGGTAAAGGTGCTGGACAAGTGG
CCGCTCCGGAGCGGGGGGCTGCAGCGCGAGCAGGTGATCAGCGTGGGCTCCTGTGT
GCCGCTCGAAAGGAACCAGCGCTACATCTTTTTCCTGGAGCCCACGGAACAGCCCTT
AGTCTTTAAGACGGCCTTTGCCCCCTCGATACCAACGGCAAAAATCTCAAGAAAGA
GGTGGGCAAGATCCTGTGCACTGACTGCGCCACCCGGCCCAAGTTGAAGAAGATGA
AGAGCCAGACGGGACAGGTGGGTGAGAAGCAATCGCTGAAGTGTGAGGCAGCAGC
CGGTAATCCCCAGCCTTCCTACCGTTGGTTCAAGGATGGCAAGGAGCTCAACCGCAG
CCGAGACATTCGCATCAAATATGGCAACGGCAGAAAGAACTCACGACTACAGTTCA
ACAAGGTGAAGGTGGAGGACGCTGGGGAGTATGTCTGCGAGGCCGAGAACATCCTG
GGGAAGGACACCGTCCGGGGCCGGCTTTACGTCAACAGCGTGAGCACCAACCTGTC
ATCCTGGTCCGGGACGCCCCGGAAGTGCAACGAGACAGCCAAGTCCTATTGCGTCA
ATGGAGGCGTCTGCTACTACATCGAGGGCATCAACCAGCTCTCCTGCAAATGTCCAA
ATGGATTCTTCGGACAGAGATGTTTGGAGAACTGCCTTTGCGATTGTACATGCCAG
ATCCTAAGCAAAGTGTCTGTGGGATACACCGGGGACAGGTGTCAGCAGTTCGCAA
TGGTCAACTTCTCCAAGCACCTTGGATTGAATTAAA (SEQ ID NO: 1)

FIG. 7

MRRDPAPGFSMLLFGVSLACYSPSLKSVQDQAYKAPVVVEGKVQGLVPAGGSSSNSTR
EPPASGRVALVKVLDKWPLRSGGLQREQVISVGSCVPLERNQRYIFFLEPTEQPLVFKTA
FAPLDTNGKNLKKKEVGKILCTDCATRPKLKKMKSTGQVGEKQSLKCEAAAAGNPQPSY
RWFKDGKELNRSRDIRIKYGNRKNRLQFNKVKVEDAGEYVCEAENILGKDTVGRGL
YVNSVSTLSSWSGHARKCNETAKSYCVNGGVCYYIEGINQLSCKCPNGFFGQRCLEKL
PLRLYMPDPKQSVLWDTPGTGVSSSQWSTSPSTLDLN (SEQ ID NO: 2)

FIG. 8

ATGAGGCGCGACCCGGCCCCCGGCTTCTCCATGCTGCTCTTCGGTGTGTCGCTCGCC
TGCTACTCGCCCAGCCTCAAGTCAGTGCAGGACCAGGCGTACAAGGCACCCGTGGT
GGTGGAGGGCAAGGTACAGGGGCTGGTCCCAGCCGGCGGCTCCAGCTCCAACAGCA
CCCGAGAGCCGCCCCGCTCGGGTCCGGTGGCGTTGGTAAAGGTGCTGGACAAGTGG
CCGCTCCGGAGCGGGGGGCTGCAGCGCGAGCAGGTGATCAGCGTGGGCTCCTGTGT
GCCGCTCGAAAGGAACCAGCGCTACATCTTTTCTGGAGCCACGGAACAGCCCTT
AGTCTTTAAGACGGCCTTTGCCCCCTCGATACCAACGGCAAAAATCTCAAGAAAG
AGGTGGGCAAGATCCTGTGCACTGACTGCGCCACCCGGCCCAAGTTGAAGAAGATG
AAGAGCCAGACGGGACAGGTGGGTGAGAAGCAATCGCTGAAGTGTGAGGCAGCAG
CCGGTAATCCCCAGCCTTCCTACCGTTGGTTCAAGGATGGCAAGGAGCTCAACCGCA
GCCGAGACATTTCGCATCAAATATGGCAACGGCAGAAAGAACTCACGACTACAGTTC
AACAAGGTGAAGGTGGAGGACGCTGGGGAGTATGTCTGCGAGGCCGAGAACATCCT
GGGGAAGGACACCGTCCGGGGCCGGCTTTACGTCAACAGCGTGAGCACCACCCTGT
CATCCTGGTCGGGGCACGCCCCGGAAGTGCAACGAGACAGCCAAGTCCTATTGCGTC
AATGGAGGCGTCTGCTACTACATCGAGGGCATCAACCAGCTCTCCTGCAAGTGTCT
GTGGGATACACCGGGGACAGGTGTCAGCAGTTCGCAATGGTCAACTTCTCCTAA
(SEQ ID NO: 3)

FIG. 9

MRRDPAPGFSMLLFGVSLACYSPSLKSVQDQAYKAPVVVEGKVQGLVPAGGSSSNSTR
EPPASGRVALVKVLDKWPLRSGGLQREQVISVGSCVPLERNQRYIFFLEPTEQPLVFKTA
FAPLDTNGKNLKKEVGKILCTDCATRPKLKKMKSQTGQVGEKQSLKCEAAAGNPQPSY
RWFKDGGKELNRSRDIRIKYGNGRKNSRLQFNKVKVEDAGEYVCEAENILGKDTVGRGL
YVNSVSTTLSSWSGHARKCNETAKSYCVNGGVCYYIEGINQLSCKCPVGYTGDRCCQF
AMVNFS (SEQ ID NO: 4)

FIG. 10

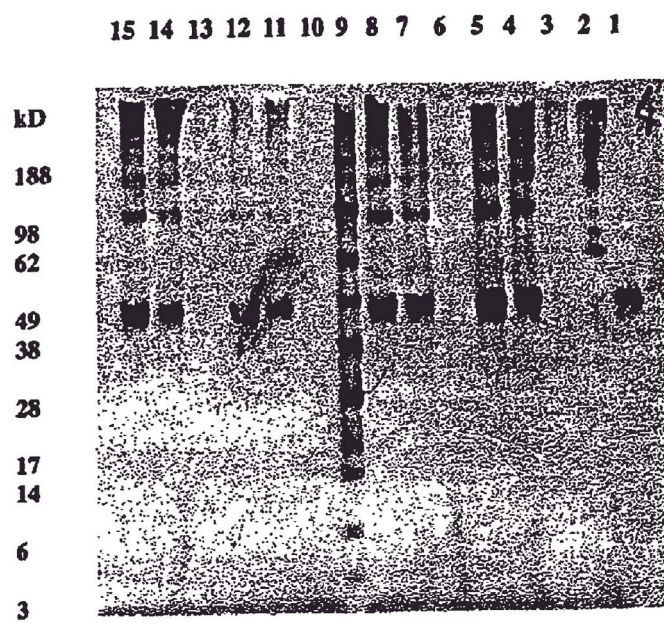


FIG. 11

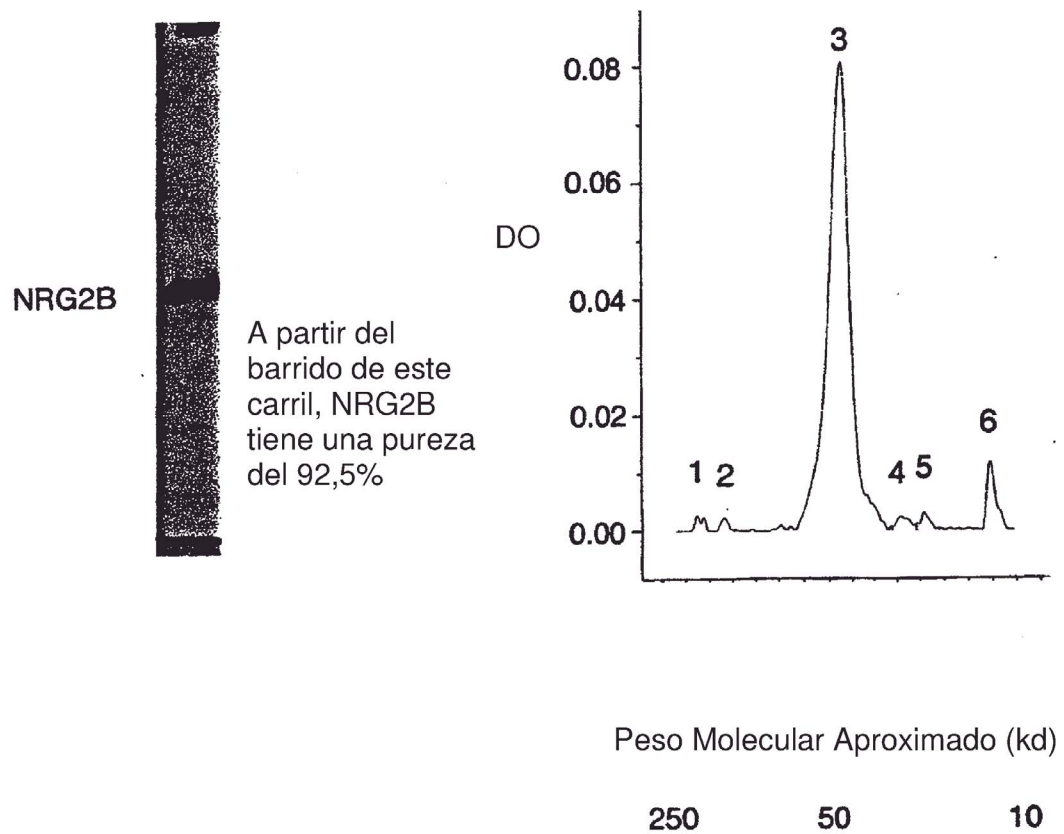


FIG. 12

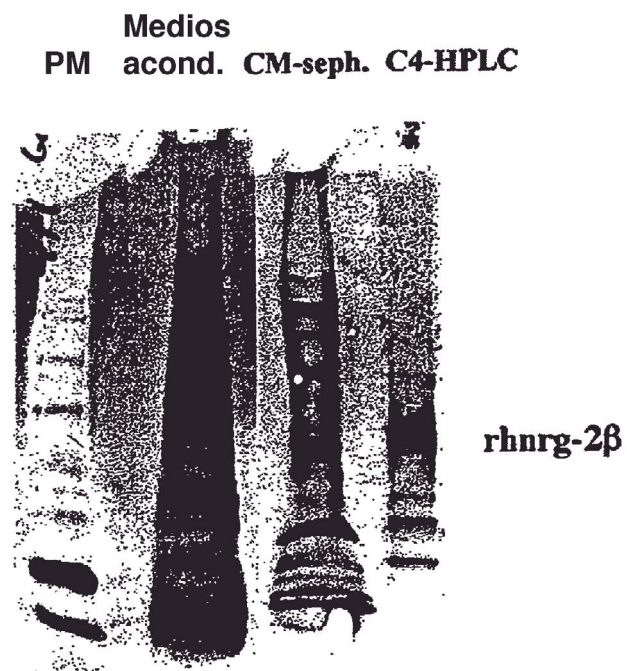


FIG. 13

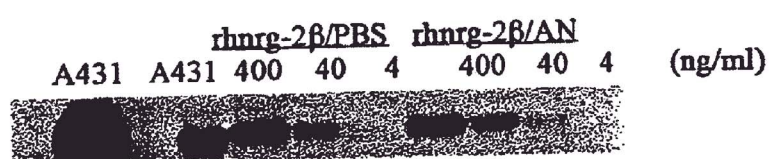


FIG. 14

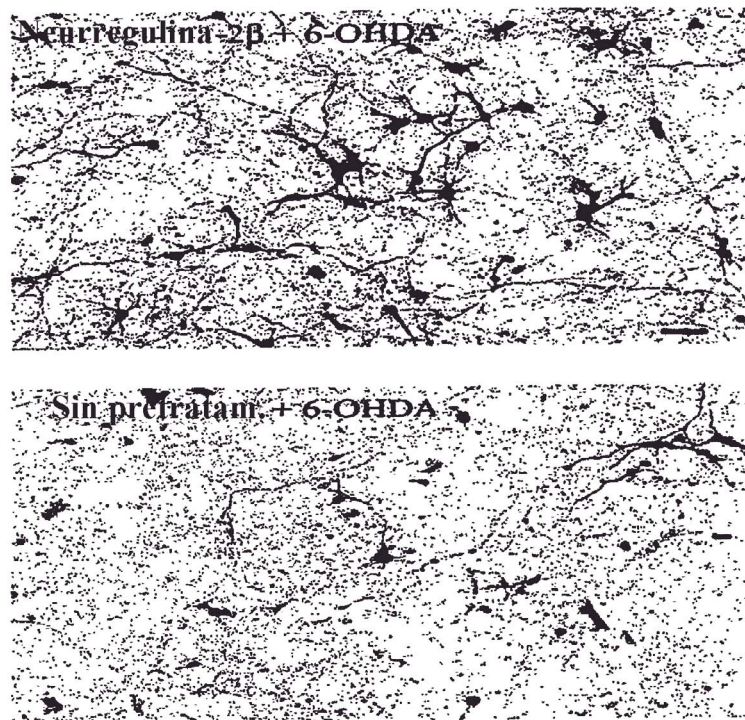


FIG. 15

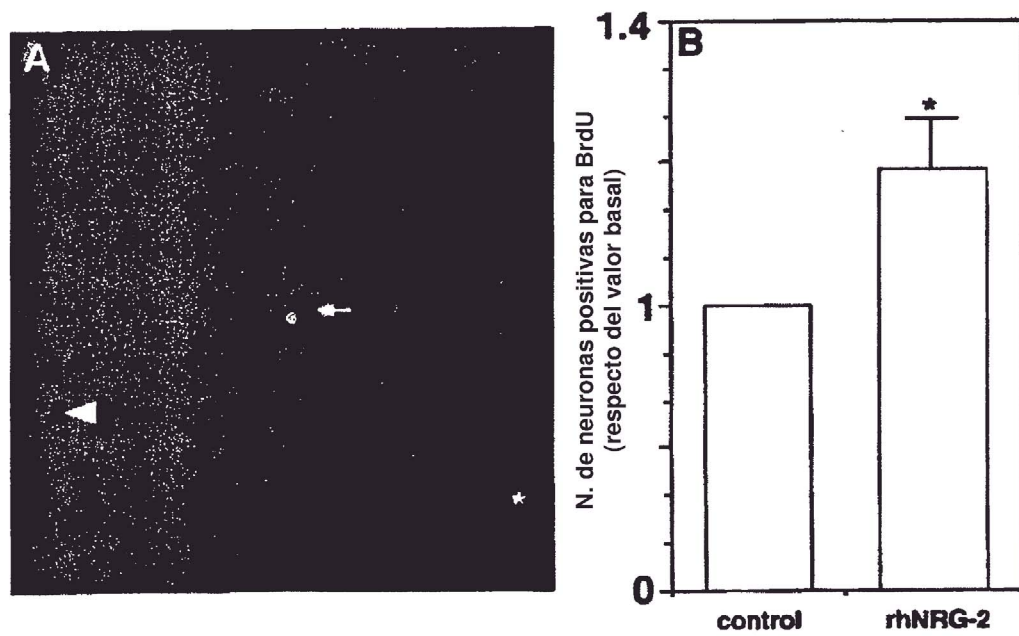


FIG. 16A

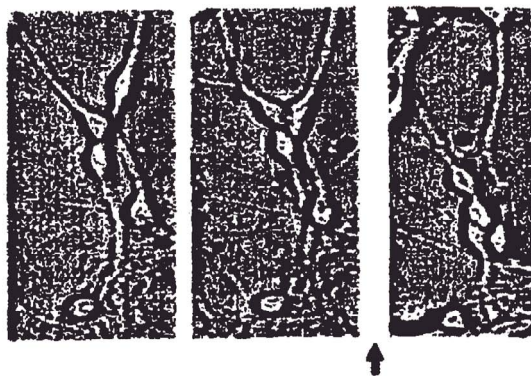


FIG. 16B

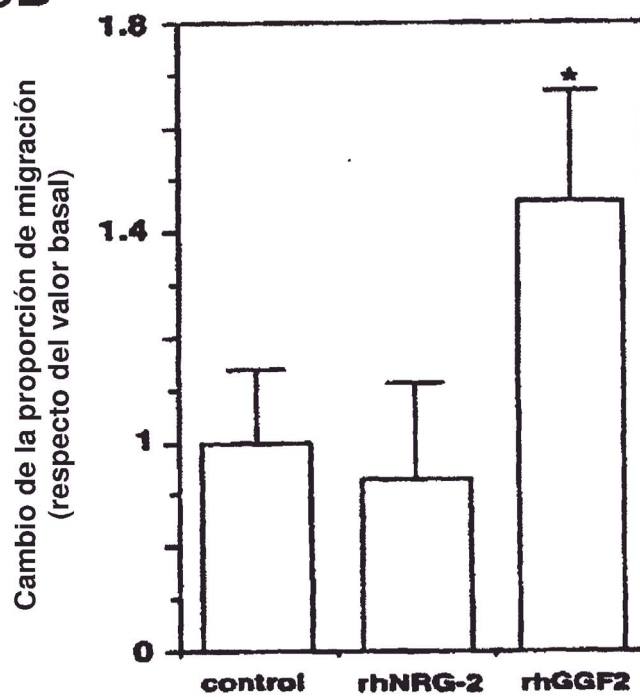


FIG. 17

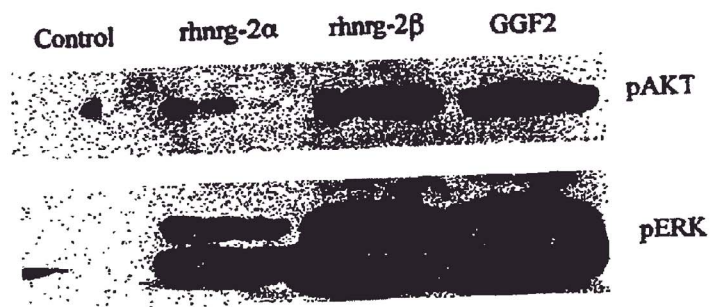


FIG. 18

