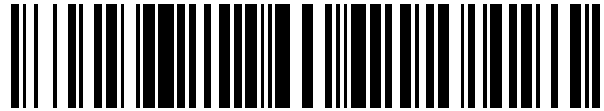


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 596**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/19** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**A61P 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08020020 .7**

96 Fecha de presentación: **21.12.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **2027869**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.02.2009**

54

Título: **Neurregulina en el tratamiento de enfermedades cardiacas**

30

Prioridad:

**21.12.1998 AU PP785098**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:

**12.12.2012**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:

**12.12.2012**

73

Titular/es:

**ZENSUN (SHANGHAI) SCIENCE AND  
TECHNOLOGY LIMITED (100.0%)  
NO.68 JU LI ROAD ZHANGJIANG HI-TECH PARK  
SHANGHAI 201203, CN**

72

Inventor/es:

**ZHOU, MINGDONG**

74

Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 392 596 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Neurregulina en el tratamiento de enfermedades cardíacas.

**Campo Técnico**

5 Esta invención se refiere a polipéptidos que afectan a la diferenciación de las células del miocardio y a la organización de las unidades contráctiles del músculo cardíaco, al análisis para identificar tales polipéptidos, y a los métodos para mejorar la función cardíaca por medio de la administración de tales polipéptidos a pacientes con enfermedades cardíacas.

**Antecedentes de la Invención**

10 La insuficiencia cardíaca afecta al 1,5% de la población, aproximadamente tres millones de Estadounidenses, desarrollándose a un ritmo de aproximadamente 400.000 nuevos casos por año en los Estados Unidos. La terapia actual para la insuficiencia cardíaca está dirigida principalmente al uso de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE en sus siglas en inglés) y de diuréticos. Los inhibidores de ACE parecen ralentizar el progreso hasta la insuficiencia cardíaca terminal; no obstante, no logran aliviar los síntomas en más de 60% de los pacientes con insuficiencia cardíaca y reducen la mortalidad de la insuficiencia cardíaca aproximadamente en 15-20%. El

15 transplante de corazón está limitado por la disponibilidad de donantes de corazón. Con la excepción de la digoxina, la administración crónica de agentes inotrópicos positivos no ha dado como resultado un fármaco útil sin efectos secundarios, que incluyen un aumento de las arritmias, o muerte súbita. Estas carencias en la terapia actual sugieren la necesidad de enfoques terapéuticos adicionales.

20 El crecimiento de las células del músculo cardíaco cambia de proliferación a hipertrofia durante el desarrollo del corazón. El primer proceso se caracteriza por un incremento en el número de células del músculo cardíaco, y el último por un incremento en el tamaño de las células sin síntesis de ADN ni división celular. Este cambio está asociado con una diferenciación terminal de las células del músculo cardíaco y se produce gradualmente durante el desarrollo del corazón, empezando durante las últimas fases embrionarias y terminando unas pocas semanas después del nacimiento. Durante este período, la expresión génica, concretamente la que afecta al ciclo y la

25 señalización celular es reprogramada. Por ejemplo, la expresión de numerosas proteínas tirosina quinasas receptoras y otros componentes del ciclo celular disminuye. El fenotipo celular también cambia ya que las adherencias célula a célula y las proteínas contráctiles están más organizadas en las células del miocardio diferenciadas terminales.

30 La hipertrofia cardíaca en adultos es una importante respuesta fisiológica adaptativa al incremento de las demandas de trabajo del corazón o después de una variedad de estímulos patológicos que conducen a lesión cardíaca. Las células hipertróficas normales tienen un gran tamaño con unidades contráctiles incrementadas y bien organizadas, así como fuertes adherencias célula a célula. Aunque las células hipertróficas patológicamente también tienen un gran tamaño y una acumulación de proteínas, a menudo presentan desorganización de las proteínas contráctiles (desorden de estructuras sarcoméricas) y adherencias célula a célula escasas (desorden de miofibras)). De este modo, la hipertrofia patológica, el incremento en el tamaño y la acumulación de proteínas contráctiles están asociadas con un ensamblaje desorganizado de estructuras sarcoméricas y una carencia de interacciones célula a célula robustas (Braunwald (1994) en Pathphysiology of Heart Failure, (Braunwald, ed.); Saunders, Philadelphia; Vol. 14, págs. 393-402).

40 El desorden de las miofibras y los sarcómeros son rasgos importantes de la cardiomiopatía. El primero es un trastorno de la asociación célula a célula, y el último es una desorganización de las proteínas contráctiles del músculo cardíaco. Éstos están influenciados por señales celulares específicas. De este modo, numerosas señales, como los factores de crecimiento y las hormonas, alteran la adherencia celular y la estructura sarcomérica. Sin estos estímulos, los cardiomiocitos presentan desorden de las estructuras del citoesqueleto y sarcoméricas, así como disociación de las interacciones célula a célula. Como la diferenciación de las células del músculo cardíaco está íntimamente asociada con la remodelación de las células cardíacas, la adherencia y las organizaciones de las proteínas contráctiles, los factores que estimulan la diferenciación de las células del miocardio pueden ser críticos para potenciar el ensamblaje de estructuras sarcoméricas de las células de la musculatura cardíaca adulta.

50 Los estudios en un sistema modelo in vitro de células de la musculatura cardíaca han conducido a la identificación de numerosos estímulos mecánicos, hormonales, de factores de crecimiento, y patológicos que pueden activar varios rasgos fenotípicos independientes de la hipertrofia cardíaca (Chien et al. (1991) FASEB J. 5:3037-3046; Zhou et al., (1995) PNAS. USA, 92:7391-7395). En la actualidad, existen al menos tres rutas de transducción de señales, que involucran a efectores aguas abajo dependientes de proteínas ras-, rho- y G<sub>q</sub> implicados en la activación de rasgos de la respuesta hipertrófica en estos sistemas modelo in vitro. Si bien se ha progresado mucho en la revelación de las rutas de señalización que activan la respuesta hipertrófica de las células del músculo ventricular, se sabe relativamente poco sobre los mecanismos que estimulan específicamente la diferenciación terminal de las células del músculo cardíaco y el ensamblaje asociado con la diferenciación terminal de las proteínas contráctiles. Los compuestos que podrían influir en estos procesos pueden formar una nueva clase principal de agentes terapéuticos para el tratamiento de una variedad de enfermedades cardíacas.

55

Las neurregulinas, una familia de factores de crecimiento de tipo EGF, activan las tirosina quinasas receptoras ErbB que pertenecen a la superfamilia de receptores de EGF, y están implicadas en un conjunto de respuestas biológicas: la estimulación de la diferenciación de las células de cáncer de mama y la secreción de proteínas de la leche; la inducción de la diferenciación de células de la cresta neural en células de Schwann; la estimulación de la síntesis de las células del músculo esquelético de los receptores de acetilcolina; y, la promoción de la supervivencia de las células del miocardio y la síntesis de ADN. Los estudios in vivo que tienen como objetivo el gen de la neurregulina en embriones de ratón homocigotos con graves defectos en la formación de trabéculas ventriculares y el desarrollo de ganglios de la raíz dorsal indican que la neurregulina es esencial para el desarrollo del corazón y neural. Sin embargo, la información sobre cómo controla la neurregulina la diferenciación celular y sus rutas de señalización aguas abajo es limitada.

Dentro del corazón, la neurregulina y los receptores ErbB son expresados respectivamente en el recubrimiento endocárdico y la capa de músculo cardíaco en las fases tempranas del desarrollo. Puesto que estas dos capas están ampliamente separadas, el ligando de neurregulina debe atravesar el espacio entre las dos capas celulares para activar sus receptores ErbB cognados. La activación de estos receptores en las células del miocardio es necesaria para promover el crecimiento de las células del músculo o la migración hacia el endocardio, que da como resultado la formación de estructuras de tipo dedo (trabéculas ventriculares) entre estas dos capas. No está claro si previamente la neurregulina estimula la diferenciación de las células del miocardio.

El autor de la presente invención ha descubierto ahora que la neurregulina y/o su acción celular pueden ser adecuadas para su uso en la detección, diagnóstico y tratamiento de enfermedades del corazón. Por otra parte, el autor de la presente invención cree que los efectos beneficiosos potenciales de la neurregulina y/o su acción celular pueden ser específicos para las células de la musculatura del corazón y no necesariamente aplicables a las células de la musculatura esquelética o lisa puesto que 1) la musculatura del corazón, esquelética y lisa son distintas tanto embriológicamente como funcionalmente; 2) los factores implicados en el crecimiento y la diferenciación de la musculatura esquelética, tales como MyoD, juegan un papel pequeño o nulo en el crecimiento y la diferenciación de la musculatura cardíaca; 3) la inactivación de los genes para los receptores ErbB2 o 4 la neurregulina produce defectos importantes en el desarrollo de la musculatura cardíaca pero no esquelética o lisa, 4) como se muestra aquí, el factor de crecimiento, el factor de crecimiento insulínico de tipo 1 (IGF-1) ocasiona la proliferación de miocitos embrionarios pero a diferencia de la neurregulina no estimula la diferenciación de estas células. En contraste, se ha demostrado que el IGF-1 pero no la neurregulina, induce la hipertrofia muscular.

### 30 **Compendio de la Invención**

La presente invención se refiere al uso de neurregulina como se define en las reivindicaciones para la preparación de un medicamento para tratar la insuficiencia cardíaca en un mamífero. Las realizaciones adicionales de la invención se definen en las reivindicaciones dependientes. La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que la neurregulina potencia la diferenciación de las células de la musculatura cardíaca y la organización de las estructuras sarcoméricas y del citoesqueleto, así como la adherencia célula a célula. La neurregulina, el polipéptido de neurregulina, los derivados de neurregulina, o los compuestos que imitan las actividades de las neurregulinas, entran en el ámbito de los métodos de la presente invención y se abrevian más adelante como NRG.

En un primer aspecto, la presente invención consiste en un método para ocasionar el crecimiento y/o la diferenciación de cardiomiocitos, comprendiendo el método exponer el cardiomiocito a NRG activando de ese modo la ruta de la MAP quinasa en el cardiomiocito y ocasionar el crecimiento y/o la diferenciación del cardiomiocito.

En un segundo aspecto, la presente invención consiste en un método para inducir la remodelación de las estructuras sarcoméricas de las células musculares y del citoesqueleto, o las adherencias célula a célula, comprendiendo el método el tratamiento de las células con neurregulina activando de ese modo la ruta de la MAP quinasa en las células y ocasionando la remodelación de las estructuras celulares o las adherencias célula a célula.

Se apreciará que la neurregulina puede ser suministrada directamente a la célula o suministrada indirectamente haciendo que la neurregulina sea producida en las células induciendo la expresión del gen o los genes implicados en la producción de la neurregulina. La producción puede ser en la misma célula a la cual está dirigido el método de una manera autocrina o por medio de alguna otra célula de una manera paracrina.

En un tercer aspecto, la presente descripción consiste en un método para identificar polipéptidos o compuestos que estimulan la diferenciación de las células de la musculatura cardíaca, comprendiendo el método poner en contacto el músculo cardíaco con un polipéptido o compuesto de ensayo en presencia de un inductor de la proliferación de las células de la musculatura cardíaca en forma de neurregulina, y medir el desarrollo de la diferenciación de las células de la musculatura cardíaca.

La diferenciación de las células de la musculatura cardíaca se mide preferiblemente en 30 células expuestas a neurregulina u otros polipéptidos de ensayo, o a una mezcla de neurregulina con un polipéptido de ensayo. La diferenciación de las células de la musculatura cardíaca se puede medir de varias maneras, incluyendo el cálculo de los incrementos o disminuciones en la síntesis de ADN, el análisis de la fosforilación de las MAP quinasas con el

transcurso del tiempo en las células de la musculatura cardíaca, la evaluación de la expresión del inhibidor del ciclo celular, p21<sup>CIP1</sup>, la organización fenotípica de las unidades contráctiles, la acumulación de las unidades contráctiles, la alteración fenotípica de las fibras de actina del citoesqueleto, y el fenotipo de las adherencias célula a célula.

5 En una realización preferida del método para identificar polipéptidos o compuestos que estimulan la diferenciación de las células de la musculatura cardíaca, las células se incuban con diferentes concentraciones de péptidos o compuestos distintos y se mide el efecto del péptido o el compuesto de ensayo a diferentes concentraciones sobre la diferenciación de las células de la musculatura cardíaca.

10 En otra realización preferida para la identificación de polipéptidos o compuestos que inducen la diferenciación de las células de la musculatura cardíaca que domina sobre la del inductor putativo de la proliferación de células de la musculatura cardíaca, factor de crecimiento insulínico de tipo 1 (IGF-1), las células se incuban con IGF-1, con y sin el polipéptido o compuesto de ensayo, y se miden la capacidad del polipéptido o compuesto de ensayo para inhibir la síntesis de ADN de las células de la musculatura cardíaca mediada por IGF-1, el ensamblaje de las estructuras sarcoméricas y las adherencias célula a célula.

15 En una realización adicional, las células se incuban con fenilefrina (PE) con y sin el polipéptido o compuesto de ensayo, y se determina la capacidad del polipéptido o compuesto de ensayo para aumentar la diferenciación de las células de la musculatura cardíaca mediada por PE. Un polipéptido de ensayo que estimula la diferenciación de las células de la musculatura cardíaca puede estimular el ensamblaje de los sarcómeros y de este modo intensificar la función del corazón de diferentes maneras, incluyendo por medio de la activación de los receptores específicos de neurregulina, p. ej., ErbB2, ErbB3 y ErbB4.

20 En un cuarto aspecto, la presente descripción consiste en un método de identificación de polipéptidos o compuestos que inhiben la estimulación por neurregulina de la diferenciación de las células de la musculatura ventricular, comprendiendo el método poner en contacto la célula de la musculatura ventricular con el polipéptido o compuesto de ensayo en presencia de neurregulina y medir cualquier inhibición de la estimulación por neurregulina de la célula de la musculatura ventricular.

25 Un compuesto puede inhibir la estimulación por neurregulina de la diferenciación de las células de la musculatura ventricular bloqueando, suprimiendo, invirtiendo, o suscitando antagonismo de la acción de la neurregulina. En un aspecto, la medición es por medio de la detección de la síntesis de ADN de las células de la musculatura ventricular.

30 En un quinto aspecto, la presente invención consiste en un método terapéutico para el tratamiento o la prevención de la disociación de la adherencia célula a célula de la musculatura cardíaca y/o el desorden de las estructuras sarcoméricas en un mamífero, comprendiendo el método administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una neurregulina como se define en las reivindicaciones.

En una realización preferida, el método terapéutico está dirigido al tratamiento de la insuficiencia cardíaca resultante de la disociación de la adherencia célula a célula de la musculatura cardíaca y/o el desorden de las estructuras sarcoméricas en el mamífero.

35 En un sexto aspecto, la presente invención consiste en un método para prevenir o disminuir la incidencia de enfermedades del corazón en un mamífero, comprendiendo el método prevenir o disminuir la interferencia o los efectos de los polipéptidos o compuestos sobre la acción de la neurregulina y sus receptores, ErbB, que produce la insuficiencia cardíaca.

40 En otro aspecto, se utiliza un agente terapéutico que imita los efectos de la neurregulina para tratar o prevenir la disfunción de las células de la musculatura cardíaca mediada por PE, o IGF-1.

45 En un séptimo aspecto, la presente invención consiste en un método para determinar la predisposición a una enfermedad del corazón o insuficiencia cardíaca en un sujeto, comprendiendo el método someter a ensayo las células cardíacas o células relacionadas del sujeto para determinar la capacidad para expresar y/o producir niveles normales o adecuados de neurregulina o sus receptores ErbB cognados. Siendo la incapacidad para expresar y/o producir niveles normales o adecuados de neurregulina indicativa de predisposición a enfermedad del corazón o insuficiencia cardíaca.

En un octavo aspecto, la presente invención consiste en el uso de neurregulina como se define en las reivindicaciones en el tratamiento o la gestión de la insuficiencia cardíaca.

50 En un noveno aspecto, la presente invención consiste en el uso de neurregulina como se define en las reivindicaciones en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la gestión de la insuficiencia cardíaca.

55 Utilizando células de miocardio cultivadas primarias como sistema modelo, el autor de la presente invención evaluó la señalización por neurregulina en la diferenciación, la maduración y el ensamblaje de miocitos cardíacos, o el mantenimiento de las estructuras sarcoméricas y del citoesqueleto. Para analizar el efecto de la neurregulina sobre la señalización celular, se incubaron células embrionarias de la musculatura cardíaca con ligando de neurregulina humana purificada recombinantemente (rhNRGβ2). La neurregulina a  $10^{-8}$  M dio como resultado una activación

sostenida de las MAP quinasas durante al menos 21 horas, mientras solamente se observó una activación transitoria con una concentración inferior ( $10^{-8}$  M) de rhNRG $\beta$ 2. La expresión del inhibidor de Cdk, p21<sup>CIP1</sup>, se intensificó por la concentración  $10^{-8}$  M de ligando, pero no por la concentración  $10^{-10}$  M. La concentración de ligando superior, concomitante con este incremento en la expresión de p21<sup>CIP1</sup>, dio como resultado un descenso en la síntesis de ADN, que estaba asociado con la diferenciación terminal, mientras se observó un incremento en la síntesis de ADN y una proliferación continua con la dosis inferior. Además, cuando se mezcló la neurregulina con IGF-1, rhNRG $\beta$ 2 a cualquiera de las concentraciones ( $10^{-8}$  M, o  $10^{-10}$  M) no mostró un efecto negativo sobre la síntesis de ADN y bloqueó significativamente la proliferación de cardiomiocitos estimulada por IGF-1. Para evaluar adicionalmente la diferenciación de las células de miocardio estimulada por NRG, se examinaron las estructuras sarcoméricas y del citoesqueleto de células cultivadas de la musculatura cardíaca de rata neonatal mediante tinción con Faloidina y tinción inmunofluorescente con un anticuerpo anti- $\alpha$ -actinina. El rhNRG $\beta$ 2 mejoró espectacularmente las estructuras sarcoméricas y del citoesqueleto, así como las adherencias célula a célula. Dicho efecto no se encontró en las células estimuladas con insulina, IGF-1 o PE. Cuando se mezcló rhNRG $\beta$ 2 con IGF-1 o PE, rhNRG $\beta$ 2 mejoró las estructuras celulares. La concentración  $10^{-8}$  M de rhNRG $\beta$ 2 mostró un efecto máximo sobre las mejoras de los sarcómeros y las adherencias célula a célula. Además, la neurregulina anuló la regulación negativa de la expresión de MHC- $\alpha$  mediada por la estimulación con PE. Estos descubrimientos indican que la función de NRG a través de dos rutas distintas: una activada a concentraciones de ligando inferiores da como resultado el crecimiento de los cardiomiocitos, mientras la otra, activada con concentraciones superiores, está mediada por la activación sostenida de la ruta de la MAP quinasa y da como resultado la diferenciación terminal y la maduración.

En toda esta memoria, a menos que el contexto lo requiera de otro modo, se entenderá que la palabra "comprenden", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", implica la inclusión de un elemento, un número entero o una etapa, o un grupo de elementos, números enteros o etapas establecidos, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

Con el fin de que la presente invención pueda ser comprendida más claramente, se describirán las formas preferidas con referencia a los siguientes ejemplos y dibujos.

### Breve Descripción de los Dibujos

Figura 1. Síntesis de ADN estimulada por el factor de crecimiento. Síntesis de ADN (incorporación de timidina [<sup>3</sup>H]) por cardiomiocitos embrionarios de ratón cultivados en respuesta a 20 hr de tratamiento con las concentraciones de vehículo indicadas (péptido Flag purificado) (cuadrado vacío), NRG $\beta$ 2 humano recombinante (rhNRG $\beta$ 2) (triángulo relleno) o factor de crecimiento insulínico de tipo 1 (IGF-1) (círculo vacío). Los datos mostrados son la media  $\pm$  D.T. de cinco determinaciones con cada tratamiento y a cada concentración. Todas las respuestas a rhNRG $\beta$ 2 son significativamente mayores que el control ( $P < 0,001$ ) excepto a  $10^{-7}$  M, y las respuestas a rhNRG $\beta$ 2 a la concentración  $3 \times 10^{-9}$  M son significativas que las respectivas respuestas a IGF-1 ( $P < 0,01$ ).

Figura 2. Fosforilación del receptor ErbB mediada por NRG. (a) Se estimularon cardiomiocitos privados de suero con vehículo (0) o rhNRG $\beta$ 2 a una concentración de  $10^{-10}$  M o  $10^{-8}$  M durante los tiempos indicados. Después se determinó la fosforilación de los receptores ErbB como se describe en Métodos utilizando un anticuerpo anti-fosfotirosina (RC20H). Se muestran las veces que se incrementan las intensidades de la inmunotransferencia, que se normalizaron para la carga de proteína basándose en las intensidades de las inmunotransferencias de ErbB2 determinadas simultáneamente mostradas debajo de las especies de fosfotirosina. (b) Fosforilación de ErbB2 inmunoprecipitado (panel superior) o ErbB4 (panel inferior) resultante de la estimulación de cardiomiocitos embrionarios durante 5 min con rhNRG $\beta$ 2  $10^{-10}$  M o  $10^{-8}$  M. Los estudios se realizaron como se detalla en Métodos y los productos inmunoprecipitados se evaluaron mediante inmunotransferencia con anticuerpos anti-fosfotirosina, anti-ErbB2 o anti-ErbB4. Se muestran las veces que cambian las intensidades de la inmunotransferencia, que se normalizaron para la carga de proteína basándose en las intensidades de las inmunotransferencias de ErbB2 o ErbB4 determinadas simultáneamente mostradas debajo de las especies de fosfotirosina.

Figura 3. Activación de MAP quinasa estimulada por NRG o IGF-1. (a) Fosforilación de MAP quinasa resultante de la estimulación de cardiomiocitos embrionarios con rhNRG $\beta$ 2 ( $10^{-10}$  M o  $10^{-8}$  M) durante los tiempos mostrados. Después del tratamiento con rhNRG $\beta$ 2, se prepararon extractos celulares y se evaluaron para determinar la fosforilación de MAP quinasa utilizando un anticuerpo anti-fosfo MAP quinasa, como se describe en Métodos. Las veces que cambian las intensidades de la inmunotransferencia se muestran debajo de las especies de fosfotirosina. Para controlar la carga de proteína, se evaluaron simultáneamente extractos celulares para determinar la expresión de ErbB2 mediante análisis de inmunotransferencia utilizando un anticuerpo anti-ErbB2. (b) La actividad catalítica de las MAP quinasas se determinó como se describe en Métodos utilizando extractos preparados a partir de cardiomiocitos tratados con rhNRG $\beta$ 2 ( $10^{-10}$  M o  $10^{-8}$  M) durante los tiempos indicados, y mostrada como las veces que aumenta por encima de la actividad de las células del nivel basal que no fueron estimuladas con rhNRG $\beta$ 2. Los valores de multiplicidad mostrados son las medias  $\pm$  DT de cinco determinaciones con cada tratamiento y a cada concentración. (c) La fosforilación de MAP quinasa resultante de la estimulación con IGF-1 ( $10^{-9}$  M) de cardiomiocitos embrionarios durante los tiempos indicados, se determinó como en el apartado (a).

Figura 4. Efectos de la NRG sobre la síntesis de ADN y fosforilación de MAP quinasas estimulada por IGF-1. (a) La síntesis de ADN (incorporación de timidina [<sup>3</sup>H]) se examinó en células cultivadas estimuladas con una

concentración máxima de IGF-1 ( $10^{-9}$  M) en ausencia o presencia de rhNRG $\beta$ 2 a concentraciones de  $10^{-10}$  M o  $10^{-8}$  M durante 20 hrs. Las barras muestran los valores medios de los datos de cinco muestras  $\pm 1$  D.T. (barras de error). Se obtuvieron resultados similares a partir de tres experimentos independientes. Se indican las diferencias significativas (\*\*\*,  $P < 0,001$ ) del control. (b) Se determinó el transcurso de tiempo de la fosforilación de MAPK en células de la musculatura cardíaca embrionarias en respuesta a una mezcla de IGF-1  $10^{-9}$  M y rhNRG $\beta$ 2  $10^{-8}$  M mediante inmunotransferencia utilizando un anticuerpo anti-fosfo-MAPK específico. Se evaluó la expresión de ErbB2 simultáneamente para controlar la carga de proteína.

Figura 5. Inducción de la expresión de p21<sup>CIP1</sup> mediada por NRG. (a) Expresión de p21<sup>CIP1</sup> en células de la musculatura cardíaca cultivadas estimuladas con rhNRG $\beta$ 2  $10^{-10}$  M o  $10^{-8}$  M en ausencia o presencia de suero (5% de FBS) durante 24 hrs; o (b) con IGF-1  $10^{-10}$  M o  $10^{-8}$  M. Después de diferentes tratamientos, se evaluó la expresión de p21<sup>CIP1</sup> mediante análisis de inmunotransferencia utilizando un anticuerpo anti-p21<sup>CIP1</sup>. Se evaluó simultáneamente la expresión de ErbB2 para controlar la carga de proteína. Se muestran las veces que cambia la expresión de p21<sup>CIP1</sup>, normalizada para la carga de proteína. (c) Efecto del inhibidor de MEK (PD98059) (50  $\mu$ M) sobre la estimulación de la expresión de p21<sup>CIP1</sup> mediada por rhNRG $\beta$ 2 (ya sea  $10^{-10}$  M o  $10^{-8}$  M) en células de la musculatura cardíaca embrionarias cultivadas en ausencia de suero. Se detectó p21<sup>CIP1</sup> por medio de análisis de inmunotransferencia utilizando un anticuerpo anti-p21<sup>CIP1</sup>. Se muestran las veces que cambia la expresión de p21<sup>CIP1</sup>, normalizada para la carga de proteína. (d) Se controlaron los efectos de PD98059 sobre la inhibición de las actividades de las MAP quinasa activadas por NRG o IGF-1 mediante una medición de la fosforilación de p42/44 MAP quinasa después de que las células fueran estimuladas con NRG o IGF-1 durante 5 min. Se evaluó la fosforilación de la p42/44 MAP quinasa mediante análisis de inmunotransferencia utilizando anticuerpos anti-fosfo-p42/44 o anti-p42/44 MAP quinasa. Se cargó la misma cantidad de extracto celular total (20  $\mu$ g proteína), y se normalizó para la expresión de p42/44 MAP quinasa, utilizando un anticuerpo anti-p42/44 MAP quinasa.

Figura 6. Efectos de la NRG sobre el ensamblaje del sarcómero y la expresión de las cadenas pesadas de miosina. (a) Se cultivaron células de la musculatura cardíaca de ratón E12.5 en medio sin suero (control) o estimuladas con rhNRG $\beta$ 2 (NRG)  $10^{-10}$  o  $10^{-8}$  M durante 48 hrs. Las células se tiñeron con faloidina (paneles de la izquierda) o se evaluaron para determinar la inmunofluorescencia anti- $\alpha$ -actinina (paneles de la derecha). (b) Se evaluaron la expresión de la cadena pesada de miosina sarcomérica y de actina  $\alpha$  en células de la musculatura cardíaca de ratones embrionarios estimulados con rhNRG $\beta$ 2 mediante análisis de inmunotransferencia utilizando un anticuerpo anti-cadena pesada de miosina sarcomérica (MF20) o un anticuerpo anti-actina  $\alpha$ . Se cargó la misma cantidad de extractos celulares completos (20  $\mu$ g proteínas) en cada calle para el fraccionamiento mediante SDS-PAGE.

### Modos de Llevar a Cabo la Invención

Utilizando un sistema in vitro de diferenciación de las células de la musculatura cardíaca, se ha demostrado un papel para la neurregulina en la estimulación de la activación de la respuesta de diferenciación en comparación con dos estímulos hormonal y de factor de crecimiento bien definidos, agonistas adrenérgicos  $\alpha_1$  e IGF-1. El autor de la presente invención ha demostrado que existen rutas de diferenciación de neurregulina en el interior de las células de la musculatura cardíaca, y que los polipéptidos de neurregulina pueden activar estas rutas. Puesto que la diferenciación de las células de la musculatura cardíaca incluye los procesos de organización de estructuras sarcoméricas y adherencias célula a célula, la invención proporciona, de este modo, un método útil para el tratamiento y la prevención de células de la musculatura cardíaca con desorganización de las estructuras sarcoméricas y de adherencias célula a célula, y la potenciación de la función del corazón en la cardiomiopatía, y para identificar los polipéptidos o compuestos que activan las rutas de diferenciación de la musculatura cardíaca.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado comúnmente comprendido por un experto en la técnica a la cual pertenece la invención. Aunque se pueden utilizar cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o el ensayo de la presente invención, a continuación se describen los métodos y materiales preferidos. Todas las publicaciones mencionadas en la presente memoria tienen el objetivo de exponer y describir el material para el cual se ha citado la referencia a este respecto.

### Definiciones

"Neurregulina o análogos de neurregulina" son moléculas que pueden activar proteínas tirosina quinasa heterodiméricas ErbB2/ErbB4 o ErbB2/ErbB3, tales como todas las isoformas de neurregulina, el dominio EGF de neurregulina en solitario, mutantes de neurregulina, y cualquier clase de productos génicos de tipo neurregulina que también activen los receptores anteriores. La neurregulina utilizada en esta invención se define en las reivindicaciones. La "neurregulina" utilizada en esta memoria es el siguiente polipéptido que es un fragmento de la isoforma  $\beta$ 2 de la neurregulina humana que contiene el dominio de tipo EGF, el dominio de unión al receptor, donde la secuencia de aminoácidos es:

**SHLVKCAEKEKTFVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRQCNYVMASFYKAEELYQ**

**(SEQ ID NO: 2)**

- "Diferenciación de las células de la musculatura cardíaca" es un estado caracterizado por una disminución de la síntesis de ADN en más 10%, una inhibición de la síntesis de ADN estimulada por otros factores de más de 10%, unas estructuras sarcoméricas y adherencias célula a célula bien organizadas, una activación sostenida de MAP quinasa, y una intensificación de la expresión de p21<sup>CIP1</sup>.
- 5 "Organizado, o con una mejor organización de los sarcómeros o las estructuras sarcoméricas" es un estado caracterizado por la disposición alineada de las proteínas contráctiles revelada por medio de la tinción inmunofluorescente de  $\alpha$ -actinina en las células de la musculatura cardíaca. La disposición alineada de las proteínas de  $\alpha$ -actinina en las células se puede distinguir por medio de microscopía y de su fotografía relacionada como se ilustra en las Figuras de esta memoria.
- 10 "Desorganizado o desorden de sarcómeros o estructuras sarcoméricas" tiene el significado opuesto a las definiciones anteriores.
- "Organizado, o con una mejor organización de las estructuras del citoesqueleto" es un estado caracterizado por fibras de actina alineadas revelado por medio de tinción con faloidina de las células de la musculatura cardíaca. Las fibras de actina alineadas en las células pueden ser distinguidas por medio de microscopía y de su fotografía relacionada como se ilustra en las Figuras de esta memoria.
- 15 "Desorganizado o desorden de las estructuras del citoesqueleto" tiene el significado opuesto a las definiciones anteriores.
- "Activación sostenida de MAP quinasa" significa que el estado fosforilado de las MAP quinasa, p42/44, se mantiene durante al menos 21 hr en las células.
- 20 "Aumento de la expresión de p21<sup>CIP1</sup>" significa que la expresión de p21<sup>CIP1</sup> se incrementa al menos 50%, que se mantiene durante al menos 24 hr en las células.
- "Tratamiento de las enfermedades cardíacas" incluye todas las clases adecuadas de métodos, tales como inyección en la vena del polipéptido de neuregulina, y los métodos de terapia génica, en los cuales se fuerza a células cardíacas u otras células a contener un gen que codifica neuregulina o sus derivados para el tratamiento de enfermedades cardíacas. Por ejemplo, se pueden utilizar Adenovirus o Virus Adeno-Asociados como portadores para liberar el gen de la neuregulina en células cardíacas u otras células. La célula infectada puede expresar y secretar después el polipéptido de neuregulina para activar los ErbB sobre células de la musculatura cardíaca.
- 25 "Hipertrofia de las células de la musculatura ventricular" es un estado caracterizado por un incremento en el tamaño de células individuales de la musculatura ventricular, siendo suficiente el incremento de tamaño celular para dar como resultado un diagnóstico clínico del paciente o suficiente como para permitir determinar las células como más grandes (p. ej., 2 veces o más mayores que las células no hipertrofiadas). Puede estar acompañada de acumulación de proteínas contráctiles dentro de las células cardíacas individuales y de activación de la expresión de genes embrionarios.
- 30 Los métodos in vitro e in vivo para determinar la presencia de hipertrofia de las células de la musculatura ventricular son conocidos. Los análisis in vitro para la hipertrofia de las células de la musculatura ventricular incluyen aquellos métodos descritos en la presente memoria, p. ej., incremento del tamaño celular e incremento de la expresión del factor natrurético atrial (FNA). Los cambios en el tamaño celular se utilizan en un sistema de puntuación para determinar el grado de hipertrofia. Estos cambios se pueden visualizar en un microscopio de fase invertida, y el grado de hipertrofia puntuado con una escala arbitraria de 7 a 0, representando 7 células totalmente hipertrofiadas, y representando 3 células no estimuladas. Los estadíos 3 y 7 se pueden observar en Simpson et al. (1982) Circulation Res. 51: 787-801, Figura 2, A y B, respectivamente. Se ha determinado que la correlación entre la puntuación de hipertrofia y el área de la superficie celular ( $\mu\text{m}^2$ ) es lineal (coeficiente de correlación = 0,99). En la hipertrofia inducida por fenilefrina, las células no expuestas (normales) tienen una puntuación de hipertrofia de 3 y un área de superficie/célula de  $581 \mu\text{m}^2$  y las células totalmente hipertrofiadas tienen una puntuación de hipertrofia de 7 y un área de superficie/célula de  $1811 \mu\text{m}^2$ , o aproximadamente 200% del normal. Las células con una puntuación de hipertrofia de 4 tienen un área de superficie/célula de  $771 \mu\text{m}^2$ , o un tamaño aproximadamente 30% mayor que las células no expuestas; las células con una puntuación de hipertrofia de 5 tienen un área de superficie/célula de  $1109 \mu\text{m}^2$ , o un tamaño aproximadamente 90% mayor que las células no expuestas; y las células con una puntuación de hipertrofia de 6 tienen un área de superficie/célula de  $1366 \mu\text{m}^2$ , o un tamaño aproximadamente 135% mayor que las células no expuestas. La presencia de hipertrofia de las células de la musculatura ventricular incluye preferiblemente células que muestran un incremento de tamaño de alrededor de 15% (puntuación de hipertrofia 3,5) o más. Los inductores de hipertrofia varían en su capacidad para inducir una respuesta hipertrofica máxima puntuada mediante el análisis descrito más arriba. Por ejemplo, el incremento máximo en el tamaño celular inducido por la endotelina tiene aproximadamente una puntuación de hipertrofia de 5.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55 "Supresión" de la hipertrofia de las células de la musculatura ventricular significa una reducción en uno de los parámetros que indican hipertrofia con respecto al estado hipertrofico, o una prevención de un incremento en uno de los parámetros que indican hipertrofia con respecto al estado normal. Por ejemplo, la supresión de la hipertrofia de las células de la musculatura ventricular se puede medir como una reducción en el tamaño celular con respecto al

- 5 estado hipertrófico. La supresión de la hipertrofia de las células de la musculatura ventricular representa un descenso del tamaño celular de 10% o mayor con respecto al observado en el estado hipertrófico. Más preferiblemente, supresión de la hipertrofia representa una disminución del tamaño celular de 30% o mayor; muy preferiblemente, supresión de la hipertrofia representa una disminución del tamaño celular de 50% o más. Con respecto al análisis de puntuación de la hipertrofia, cuando se utiliza fenilefrina como agente inductor, estas disminuciones se corresponderían con puntuaciones de hipertrofia de alrededor de 6,5 o menos, 5,0-5,5, y 4,0-5,0, respectivamente. Cuando se utiliza un agente diferente como agente inductor, la supresión se mide con respecto al tamaño celular máximo (o puntuación hipertrófica) medido en presencia de ese inductor.
- 10 La prevención de la hipertrofia de las células de la musculatura ventricular se determina evitando un incremento en el tamaño celular con respecto a las células normales, en presencia de una concentración de inductor suficiente para inducir totalmente la hipertrofia. Por ejemplo, la prevención de la hipertrofia representa un incremento del tamaño celular menos de 200% mayor que las células no inducidas en presencia de una concentración máximamente estimuladora de inductor. Más preferiblemente, la prevención de la hipertrofia representa un incremento del tamaño celular menos de 135% mayor que en las células no inducidas; y muy preferiblemente, la prevención de la hipertrofia representa un incremento del tamaño celular menos de 90% mayor que en las células no inducidas. Con respecto al análisis de puntuación de la hipertrofia cuando se utiliza fenilefrina como agente inductor, la prevención de la hipertrofia en presencia de una concentración máximamente estimuladora de fenilefrina representa una puntuación hipertrófica de alrededor de 6,0-6,5, 5,0-5,5, y 4,0-4,5, respectivamente.
- 15 La determinación in vivo de la hipertrofia incluye la medición de parámetros cardiovasculares tales como la presión arterial, el ritmo cardíaco, la resistencia vascular sistémica, la contractilidad, la fuerza del latido del corazón, la hipertrofia concéntrica o dilatada, la presión sistólica del ventrículo izquierdo, la presión media del ventrículo izquierdo, la presión diastólica final del ventrículo izquierdo, el gasto cardíaco, el índice de volumen sistólico, los parámetros histológicos, y el tamaño y el grosor de las paredes del ventrículo. Los modelos animales disponibles para la determinación del desarrollo y la supresión de la hipertrofia de las células de la musculatura ventricular in vivo incluyen el modelo de ratón de sobrecarga de presión, el modelo disfuncional murino RV, el modelo de ratón transgénico, y el modelo de rata post-infarto de miocardio. Los métodos médicos para evaluar la presencia, el desarrollo, y la supresión de hipertrofia de las células de la musculatura ventricular en pacientes humanos son conocidos, e incluyen, por ejemplo, medidas de los parámetros diastólicos y sistólicos, estimaciones de la masa ventricular, y flujo de las venas pulmonares.
- 20 Los términos "tratamiento", "tratar" y similares se utilizan en la presente memoria para que representen en términos generales la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de la prevención completa o parcial de una enfermedad o un síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de la cura parcial o completa de una enfermedad y/o un efecto adverso atribuible a la enfermedad. "Tratamiento" según se utiliza en la presente memoria abarca cualquier tratamiento de una enfermedad
- 25 en un mamífero, concretamente un ser humano, e incluye:
- 30 prevención de que se presente la enfermedad en un sujeto que puede estar predispuesto a la enfermedad pero todavía no se ha diagnosticado que la tenga;
- 35 inhibición de la enfermedad, esto es, detención de su evolución; o
- alivio de la enfermedad, esto es, ocasionando la regresión de la enfermedad.
- 40 La invención está dirigida al tratamiento de pacientes con o en riesgo de desarrollar una enfermedad cardíaca y afecciones relacionadas, p. ej., insuficiencia cardíaca. Más específicamente, se pretende que "tratamiento" signifique proporcionar un efecto terapéuticamente detectable y beneficioso en un paciente que padece una enfermedad cardíaca.
- 45 Por el término "insuficiencia cardíaca" se quiere significar una anomalía de la función cardíaca donde el corazón no bombea sangre al ritmo necesario para los requerimientos de los tejidos metabolizadores. La insuficiencia cardíaca incluye una amplia gama de estados de enfermedad tales como la insuficiencia cardíaca congestiva, el infarto de miocardio, taquiarritmia, cardiomiopatía hipertrófica familiar, enfermedad cardíaca isquémica, cardiomiopatía dilatada idiopática, y miocarditis. La insuficiencia cardíaca puede estar causada por uno cualquiera de numerosos factores, incluyendo las formas isquémicas, congénitas, reumáticas, o idiopáticas. La hipertrofia cardíaca crónica es un estado
- 50 significativamente mórbido que es un precursor de la insuficiencia cardíaca congestiva y de la parada cardíaca.
- "Tratamiento" hace referencia tanto al tratamiento terapéutico como profiláctico o a medidas preventivas, donde el objeto es prevenir o ralentizar (disminuir) la hipertrofia. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen los que ya tienen el trastorno así como los que son propensos a tener el trastorno o aquellos en los que se va a prevenir el trastorno. La hipertrofia puede tener cualquier causa que sea sensible al ácido retinoico, incluyendo causas congénitas, virales,
- 55 idiopáticas, cardiotróficas, o miotróficas, o como resultado de isquemia o ataques isquémicos tales como infarto de miocardio. Típicamente, el tratamiento se realiza para detener o ralentizar el progreso de la hipertrofia, especialmente una vez que la lesión del corazón se ha producido, por ejemplo a partir de isquemia. Preferiblemente,



para el tratamiento de los infartos de miocardio, el agente o los agentes se administran inmediatamente después del infarto de miocardio, para evitar o disminuir la hipertrofia.

Los términos "sinérgico", "efecto sinérgico" y similares se utilizan en la presente memoria para describir la mejora de los efectos del tratamiento obtenida combinando uno o más agentes terapéuticos con uno o más compuestos de ácido retinoico. Si bien un efecto sinérgico en algunos campos quiere decir un efecto que es más que aditivo (p. ej.,  $1+1 = 3$ ), en el campo de la terapia médica un efecto aditivo ( $1+1 = 2$ ) o menor que aditivo ( $1+1 = 1,6$ ) pueden ser sinérgicos. Por ejemplo, si dos fármacos fueran a inhibir cada uno el desarrollo de la hipertrofia de las células de la musculatura ventricular 50% si se administraban individualmente, no cabría esperar que los dos fármacos combinados detuvieran completamente el desarrollo de la hipertrofia de las células de la musculatura ventricular. En muchos casos, debido a efectos secundarios inaceptables, los dos fármacos no se pueden administrar juntos. En otros casos, los fármacos se contrarrestan entre sí y ralentizan el desarrollo de la hipertrofia de las células de la musculatura ventricular menos de 50% cuando se administran juntos. De este modo, se dice que se obtiene un efecto sinérgico si los dos fármacos ralentizan el desarrollo de la hipertrofia de las células de la musculatura ventricular más de 50% sin ocasionar un incremento inaceptable de los efectos secundarios adversos.

## 15 Materiales y Métodos

### Reactivos y Anticuerpos

Se utilizaron los siguientes anticuerpos y reactivos: IGF (Boehringer); colagenasa (Worthington); pancreatina (Gibco BRL); inhibidor de MEK1 (MAPKK) (PD98059) (New England); [metil-<sup>3</sup>H]timidina (Amersham); anticuerpo monoclonal anti-erbB2 (Novocastra); IgG<sub>2b</sub>p21<sup>CIP1</sup> monoclonal (F-5) (Santa Cruz); anticuerpo monoclonal anti-fosfo-tirosina conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRPO), RC20 (Transduction Laboratories); anticuerpo monoclonal anti-actina  $\alpha$  sarcomérica (clon 5c5), anti-Ig de conejo conjugada con HRPO, y anti-Ig de ratón (Sigma); kit de anticuerpo PhosphoPlus<sup>®</sup> p44/42 MAP quinasa (Thr202/Tyr204) (Nueva Inglaterra); gel de afinidad anti-FLAG<sup>®</sup> M1 y anticuerpo monoclonal anti-FLAG M2 (Eastman Kodak) mAb MF20 contra la cadena pesada de miosina sarcomérica (proporcionado amablemente por R. P. Harvey, Victor Chang Cardiac Research Institute); anticuerpo anti-actina  $\alpha$  sarcomérica (Sigma).

### Expresión y Purificación de NRG $\beta$ 2 Humana Recombinante

Se insertó un ADNc que codificaba el dominio de tipo EGF de la isoforma NRG $\beta$ 2 humana (rhNRG $\beta$ 2), residuos 177-237, en el vector de expresión pFLAG1 (IBI) (una donación del Dr. Rodney J. Fiddes, Co-operative Research Centre for Biopharmaceutical Research, Australia). La rhNRG $\beta$ 2 con un péptido FLAG anclado a su extremo N, se expresó en el espacio periplásmico de *E. coli* DH5 $\alpha$ , y se purificó mediante cromatografía de afinidad utilizando un anticuerpo monoclonal anti-FLAG M1 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La pureza de rhNRG $\beta$ 2 fue de más de 90% como se puso en evidencia mediante separación SDS-PAGE y tinción con Azul de Coomassie de las muestras de proteína purificadas. La concentración de las proteínas purificadas se determinó utilizando un kit de análisis de proteína Bio-Rad. La actividad de las proteínas purificadas se sometió a ensayo por medio de estimulación de receptores ErbB de células de cáncer de mama MCF-7 con diversas dosis de ligando. Esto reveló un aumento de fosforilación del receptor ErbB con aumento de concentración de ligando ( $10^{-12}$  M a  $10^{-8}$  M).

### Cultivos Primarios de Miocitos Cardíacos de Ratón

Se utilizaron embriones de ratón (E11.5-12.5) para preparar miocitos cardíacos primarios. Se aisló asépticamente tejido cardíaco de los embriones. Las células miocárdicas se aislaron mediante digestión con colagenasa y se separaron de los no cardiomiocitos mediante uniones previas a placas de cultivo que se realizaron tres veces. Las células se cultivaron a continuación como se ha descrito previamente. Utilizando este método, fue posible obtener rutinariamente cultivos primarios con >90% de miocitos.

### Fosforilación de ErbB y MAP Quinasa, y Actividad MAP quinasa

Se cultivaron células miocárdicas embrionarias en medio libre de suero durante al menos 24 hrs y a continuación se estimularon con rhNRG $\beta$ 2 o IGF-1 durante diferentes tiempos. La estimulación se terminó lavando las células rápidamente con PBS frío. Para bloquear la activación de la MAP quinasa, se añadió el inhibidor de MEK, PD98059, al medio 30 min. antes de la administración de rhNRG $\beta$ 2 o IGF-1. Las células se cosecharon a continuación como se ha descrito previamente para el análisis de transferencia Western con anticuerpo monoclonal conjugado con HRPO RC20H (1:2.000) para la detección de receptores ErbB fosforilados, o de un anticuerpo fosfoespecífico para la MAP quinasa p42/p44 (razón de dilución 1:1.000) para la detección de MAP quinasas fosforiladas. Se cargó la misma cantidad de proteína de extracto celular en cada calle y se separaron mediante SDS-PAGE. La inmunotransferencia con anticuerpos anti-receptor ErbB o anti-p42/44 MAP quinasa también se utilizó para normalizar la carga de proteína. La actividad de la MAP quinasa (p42/p44) se midió utilizando un kit de análisis para la enzima p42/44 MAP quinasa (RPN84; Amersham, Bucks., U.K.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

### 55 Detección de la Proteína p21<sup>CIP1</sup>

Las células miocárdicas embrionarias cultivadas en medio libre de suero o FBS al 5% se estimularon con diversas concentraciones de rhNRGβ2 con o sin el inhibidor de MEK, PD98059, durante 24 o 48 hrs, se cosecharon como se ha descrito anteriormente y se sometieron a análisis de inmunotransferencia utilizando un anticuerpo anti-p21<sup>CIP1</sup> (1:100). La misma cantidad de proteína se cargó en cada pocillo de un gel de poliacrilamida SDS. Después de la inmunotransferencia, la membrana se desprendió y se sondeó adicionalmente con un anticuerpo contra el receptor ErbB2 para la normalización de la carga de proteína.

### Incorporación de Timidina

Se cultivaron células miocárdicas embrionarias con DMEM libre de suero que contenía rhNRGβ2 o IGF-1 durante 20 hrs. Se añadió Timidina [metil-<sup>3</sup>H] (0,5 μCi/pocillo) y las células se cultivaron a continuación durante 12 hrs adicionales. Después de enjuagar dos veces con PBS frío, una vez con ácido tricloroacético al 10% enfriado con hielo, y después cinco veces con PBS enfriado con hielo, las células se disolvieron en 100 μl de SDS al 1%, y se contaron en un contador de centelleo líquido.

### Tinción Inmunofluorescente y con Faloidina

Las células miocárdicas se cultivaron en placa en placas Novex de dos pocillos (Nunc), y se cultivaron con o sin rhNRGβ2 en medio DMEM libre de suero durante 24-48 horas. Después de enjuagar las células con PBS, éstas se fijaron con paraformaldehído al 4% y Triton X-100 al 0,1% a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las células fijadas se bloquearon a continuación con leche desnatada al 5% en PBS durante 1 hr, seguido de incubación con un anticuerpo monoclonal anti-α-actinina (Sigma), durante 45 minutos a temperatura ambiente. Después del lavado, se añadió anti-IgG de ratón conjugada con FITC (Sigma) y las células se incubaron durante otra media hora. Para la tinción con faloidina, las células se fijaron con formaldehído al 4% durante 1 hr, se lavaron, y se tificaron con tampón de faloidina (100 μl de PBS, 10 μl de faloidina rodaminada (6,6 μM en MeOH)) durante 1 hr. Después del Lavado con PBS, las células se montaron con *p*-fenilendiamina al 1% (1 mg/ml, Sigma) en glicerol, y a continuación se cubrieron y se sellaron. Las células se examinaron utilizando un microscopio fluorescente UV y se fotografiaron con un objetivo de potencia 40×.

Todos los análisis anteriores se repitieron al menos tres veces para cada uno de los experimentos. Los datos para la síntesis de ADN y la actividad de la MAP quinasa se presentan como la media ± D.T. de cinco muestras por duplicado. La significación estadística se determinó mediante ANOVA utilizando el paquete estadístico SAS considerándose significativo  $P < 0,05$ . Las inmunotransferencias se cuantificaron por medio de análisis de densitometría mostrándose la intensidad de las bandas de proteína evaluada por debajo de las aplicaciones como las veces que cambia sobre el control (véanse la Figuras).

## Resultados

### NRG Regula la Síntesis de ADN en Células Miocárdicas Embrionarias

Se evaluó la síntesis de ADN en cardiomiocitos embrionarios primarios de ratón (E11.5-12.5) para investigar su respuesta de crecimiento a NRG después de la estimulación con rhNRGβ2. Como se muestra en la Figura 1, rhNRGβ2 a una concentración de  $10^{-10}$  M produjo un incremento de aproximadamente 2 veces en la síntesis de ADN. Sin embargo, la síntesis de ADN disminuyó con concentraciones de ligando  $> 10^{-10}$  M. En contraste con la respuesta a rhNRGβ2, las células miocárdicas mostraron solo una respuesta proliferativa al factor de crecimiento de tipo insulínico 1 (IGF-1) humano, a concentraciones que oscilaban de  $10^{-11}$  M a  $10^{-7}$  M. La inhibición de la síntesis de ADN por las concentraciones más altas de NRG no fue debida a proteínas de *E. coli* que contaminaban rhNRGβ2 expresada bacterianamente, puesto que las proteínas purificadas a partir de bacterias transformadas con vector FLAG solo no inhibían la síntesis de ADN. Por otra parte, para evitar los posibles efectos de las proteínas de *E. coli*, se disolvieron o diluyeron tanto IGF-1 obtenido comercialmente como rhNRGβ2 purificada con preparaciones de proteína anti-FLAG ( $10^{-8}$  M de péptido FLAG). Estos reactivos mostraron actividades idénticas a las de los preparados con PBS en la estimulación de la síntesis de ADN en células miocárdicas.

### NRG Activa los Receptores ErbB en Células Miocárdicas Embrionarias

De los cuatro miembros de la familia de receptores ErbB (ErbB1-4), ErbB2 y ErbB4 son expresados muy abundantemente en miocitos cardíacos. La fosforilación de los receptores ErbB2 y ErbB4 fue evaluada por medio de análisis de transferencia Western de productos lisados celulares, después de la estimulación con rhNRGβ2  $10^{-8}$  M o  $10^{-10}$  M. Como se muestra en la Figura 2a, fue evidente un nivel más alto de proteínas de 180-185 kDa fosforiladas correspondientes a los receptores ErbB2/ErbB4, con la concentración más alta de NRG. Los niveles de fosforilación disminuyeron gradualmente con el tiempo. La dependencia de la concentración de la fosforilación de proteína p180-185 se correspondía con el descenso de la síntesis de ADN con el tratamiento con rhNRGβ2 (Figura 1). Los receptores ErbB2 y ErbB4 también se inmunoprecipitaron utilizando anticuerpos anti-ErbB2 o ErbB4, y se examinaron por medio de transferencia Western con anticuerpos anti-fosfotirosina. Como se muestra en la Figura 2b, la fosforilación de ambos receptores dependía de las concentraciones de rhNRGβ2. Si bien los niveles de fosforilación de ErbB2 y ErbB4 difirieron ligeramente entre experimentos, persistió la diferencia de fosforilación relativa entre altas y bajas concentraciones de rhNRGβ2.

### Activación Dependiente de la Concentración de NRG de MAP Quinasas

La activación de la familia de receptores ErbB inicia una cascada de interacciones moleculares, que da como resultado por último la estimulación de MAP quinasas. La duración de la activación de la MAP quinasa es crítica para las decisiones del destino celular. Por lo tanto, el autor de la presente invención investigó el curso del tiempo de la fosforilación de la MAP quinasa después del tratamiento con rhNRGβ2  $10^{-8}$  M o  $10^{-10}$  M, utilizando un anticuerpo específico de fosfo-MAP quinasa, que reconoce p42/p44 MAP quinasas fosforiladas. Como se muestra en la Figura 3a, la fosforilación de p42/p44 MAP quinasas se mantuvo durante al menos 21 horas con la dosis más alta de rhNRGβ2. La activación de la MAP quinasa fue transitoria a la concentración de ligando más baja, y cayó al nivel basal en menos de tres horas. Como se muestra en la Figura 3b, la actividad catalítica de la MAP quinasa va a la par con estos cambios en la fosforilación. De este modo, la actividad de la MAP quinasa se mantuvo durante al menos 21 horas en células estimuladas con rhNRGβ2  $10^{-8}$  M, pero únicamente fue transitoria en células tratadas con rhNRGβ2  $10^{-10}$  M. En contraste con estas respuestas a NRG, la fosforilación de la MAP quinasa fue transitoria con concentraciones tanto bajas ( $10^{-9}$  M) (Figura 3c) como altas ( $10^{-8}$  M o  $10^{-7}$  M) de IGF-1.

### Efecto de NRG sobre la Proliferación de Células Miocárdicas Estimuladas con IGF-1

Puesto que las células miocárdicas se expusieron a múltiples hormonas peptídicas y factores de crecimiento in vivo, el autor de la presente invención investigó si los efectos inhibidores del crecimiento de una alta concentración de NRG podrían oponerse a la respuesta proliferativa de otros factores de crecimiento. Esto se logró evaluando los efectos de rhNRGβ2 e IGF-1 sobre la síntesis de ADN de miocitos cardíacos. Como se muestra en la Figura 4a, una concentración  $10^{-10}$  M de NRG tuvo un pequeño efecto sobre la síntesis de ADN estimulada por IGF-1 ( $10^{-9}$  M). Sin embargo, la concentración  $10^{-8}$  M bloqueó significativamente la respuesta a IGF-1. Esto indicó que una ruta intracelular específica era activada por la concentración más alta de NRG. Es interesante notar que no se observó un efecto aditivo cuando se aplicaron a las células tanto IGF-1 como la concentración más baja de NRG, indicando que la concentración  $10^{-9}$  M de IGF-1 ya podía ser la máxima. Que la ruta o las rutas activadas por la concentración más alta de NRG pudieran ser dominantes sobre las activadas por IGF-1 estuvo apoyado adicionalmente por la observación de que la combinación de IGF-1 ( $10^{-9}$  M) y rhNRGβ2 ( $10^{-8}$  M) dio como resultado una fosforilación sostenida de la MAP quinasa (comparar la Figura 4b y la Figura 3c).

### Expresión de NRG y p21<sup>CIP1</sup>

Puesto que la activación sostenida de la MAP quinasa está directamente relacionada con la expresión de p21<sup>CIP1</sup> en otros tipos de células,<sup>31</sup> y la acumulación de p21<sup>CIP1</sup> conduce a la parada del ciclo celular en la fase G1,<sup>32,33</sup> se preguntó si la activación sostenida de MAP quinasas conduce a un nivel superior de expresión de p21<sup>CIP1</sup> en células embrionarias de músculo cardíaco. Como se muestra en la Figura 5a, se observó un aumento en la expresión de p21<sup>CIP1</sup> solo con la concentración más alta de rhNRGβ2. Este efecto sobre la expresión de p21<sup>CIP1</sup> era independiente de las condiciones de cultivo celular utilizadas, puesto que se observaron efectos similares en medio de cultivo tanto libre de suero como con suero. El aumento de expresión de p21<sup>CIP1</sup> con rhNRGβ2  $10^{-8}$  M se mantuvo durante al menos 24 horas (una incubación de 48 horas de células con rhNRGβ2 da como resultado una expresión idéntica de p21<sup>CIP1</sup>), y de este modo, puede ser crítico para la inhibición de la síntesis de ADN en células de músculo cardíaco tratadas con la alta concentración de NRG. Como se muestra en la Figura 5b, IGF-1 no estimuló la expresión de p21<sup>CIP1</sup>. Para evaluar si la respuesta de p21<sup>CIP1</sup> implica la activación de la MAP quinasa, los cardiomiocitos se trataron con el inhibidor (PD98059) específico de la MAP quinasa quinasa (MEK1). Tanto en presencia como en ausencia de suero, PD98059 bloqueó el aumento de expresión de p21<sup>CIP1</sup> inducido por rhNRGβ2  $10^{-8}$  M (Figura 5c), así como el aumento de la fosforilación de la p42/44 MAP quinasa (Figura 5d).

### Estructura sarcomérica y Expresión de MHC con NRG

Para examinar si NRG afecta también a la estructura y función de la célula miocárdica embrionaria, se evaluaron los efectos de NRG sobre las estructuras citoesqueléticas y sarcoméricas de los cardiomiocitos. Como se muestra en la Figura 6a, rhNRGβ2 ( $10^{-8}$  M) estimuló tanto la reorganización de la actina sarcomérica (tinción con faloidina) como el ensamblaje de la unidad contráctil cardíaca (tinción de  $\alpha$ -actinina en bandas Z). En contraste, los efectos de rhNRGβ2  $10^{-10}$  M fueron mucho menos evidentes (Figura 6a). También resultó evidente el papel de NRG en la regulación de la función de la célula miocárdica por medio de la observación de que rhNRGβ2 aumentaba la expresión de las cadenas pesadas de miosina sarcomérica, mientras que la expresión de la actina sarcomérica permanecía inalterada (Figura 6b). Por otra parte, los efectos de rhNRGβ2 sobre los cardiomiocitos también fueron sensibles a la inhibición de MEK1 por PD98059.

### Discusión

La evidencia proporcionada indica que la concentración de ligando (NRG) es un factor importante para determinar los estados de activación transitorios o sostenidos de las MAP quinasas. Los últimos dan como resultado un aumento del nivel de expresión del inhibidor de Cdk, p21<sup>CIP1</sup>, y están asociados con una disminución de la síntesis de ADN en células miocárdicas embrionarias. Este descubrimiento proporciona un claro apoyo a que el gradiente de ligando puede decidir el destino de la célula en la diferenciación celular y el desarrollo embrionario, y proporciona

adicionalmente perspectivas moleculares sobre cómo las rutas de señalización intracelular distinguen la fuerza de la señal basada en las concentraciones de ligando.

Se ha sospechado de la importancia de la concentración de ligando en la diferenciación celular durante algún tiempo basándose en las siguientes observaciones:

- 5 i) el patrón de desarrollo del embrión está asociado con un gradiente de ligando;
- ii) la concentración de ligando es crítica para la diferenciación celular in vitro, y
- iii) la expresión en exceso de los receptores en las células cambia su destino en respuesta a la estimulación con ligando.

10 Teniendo en cuenta estas observaciones, la activación de la MAP quinasa dependiente de la concentración de NRG en células miocárdicas embrionarias establece un modelo para delinear adicionalmente los mecanismos de la señalización celular acoplada a los receptores ErbB en reacción a los cambios en la concentración de ligando.

15 La noción de que NRG es un factor de diferenciación de las células miocárdicas está apoyada por el descubrimiento de que NRG induce la expresión de p21<sup>CIP1</sup> en células miocárdicas embrionarias. Puesto que está bien documentado que p21<sup>CIP1</sup> es un inhibidor de Cdk, que promueve la entrada de G1 a la fase S del ciclo celular, el aumento de expresión de esta proteína en células miocárdicas podría ser crítico para la iniciación de la diferenciación terminal. Esto está apoyado también por los descubrimientos previos de que la expresión de p21<sup>CIP1</sup> aumenta in vivo con el comienzo de la diferenciación terminal de la célula miocárdica (Parker et al. (1995) Science 267:1024-1027), así como con la diferenciación de la célula de la musculatura esquelética (Dias et al. (1994) Semin. Diagn Pathol. 11:3-14). En el último procedimiento, el aumento de expresión de p21<sup>CIP1</sup> da como resultado finalmente una salida del ciclo y la diferenciación celular. Puesto que el aumento en la expresión de p21<sup>CIP1</sup> se produce antes del de otros reguladores del ciclo celular, éste se utiliza como un marcador temprano para la diferenciación de músculo esquelético. Como se ha demostrado aquí, la expresión de p21<sup>CIP1</sup> es concomitante con el descenso de la síntesis de ADN en células miocárdicas estimuladas con NRG, sugiriendo el papel fisiológico de la expresión de p21<sup>CIP1</sup> estimulada por NRG en estas células. Además, la inhibición tanto de las MAP quinasas como de p21<sup>CIP1</sup> por el inhibidor de quinasas ERK determinó que la expresión de p21<sup>CIP1</sup> estimulada por NRG es un resultado directo de la activación de las MAP quinasas.

25 La activación sostenida de las MAP quinasas se requiere para la inducción de la expresión constitutiva de p21<sup>CIP1</sup> en células miocárdicas cultivadas, mientras que la activación transitoria de la MAP quinasa da como resultado la expresión temporal de p21<sup>CIP1</sup>. La última es presumiblemente insuficiente para regular la actividad de Cdk, puesto que p21<sup>CIP1</sup> será degradada rápidamente y la expresión constitutiva es esencial para el bloqueo del complejo ciclina/Cdk. En células PC12, la activación sostenida de la ruta de la MAP quinasa está confinada a una respuesta a señales específicas de los receptores de NGF. La activación sostenida de las MAP quinasas causa la diferenciación de las células PC12 que se convierten en células neuronales. Esta ruta en miocitos cardíacos, no obstante, es capaz de responder de manera diferenciada a la fuerza de la señal basada en la concentración de NRG.

35 La evidencia adicional que apoya que NRG es un factor de diferenciación es que NRG estimula el ensamblaje de las estructuras sarcoméricas y citoesqueléticas, que se producen a medida que las células progenitoras miocárdicas se diferencian a células musculares cardíacas. La observación previa también indicó que las células más diferenciadas tienen más sarcómeros organizados (Rumynatsev, P. P. (1977) en International Review Cytology 51, págs. 187-273). En una comparación de células estimuladas con PE o IGF-1, las células estimuladas con NRG tienen los sarcómeros mejor organizados. Lo que es más importante es que, cuando NRG se mezcla con PE o IGF-1, NRG mejora enormemente los sarcómeros, indicando que NRG es dominante en la estimulación del ensamblaje de sarcómeros en presencia de otras señales celulares. La NRG invalida la regulación negativa mediada por PE de la expresión de MHC- $\alpha$ , indicando que NRG está implicada en el mantenimiento del tipo adulto de proteínas contráctiles. Puesto que estudios previos indicaron que NRG, ErbB2 y ErbB4 son expresados en corazón adulto, NRG debe jugar un papel en el mantenimiento del estado de diferenciación de las células miocárdicas.

45 Dos características muy importantes de la insuficiencia cardíaca asociada con la cardiomiopatía en pacientes son los desórdenes de las miofibras y los sarcómeros. La primera es la pérdida de la adherencia célula a célula y la última es la pérdida de organización del sarcómero. Estos estados patológicos existen generalizadamente de la insuficiencia cardíaca congestiva a la cardiomiopatía dilatada y afectan gravemente a la función cardíaca. En la actualidad no hay tratamiento dirigido al ensamblaje de la adherencia célula a célula y a las estructuras de sarcómeros. La NRG juega claramente un papel en el proceso de ensamblaje y mantenimiento de la adherencia célula a célula y de las estructuras sarcoméricas. El que la NRG estimule la diferenciación de las células miocárdicas y el ensamblaje de las estructuras sarcoméricas indica que la diferenciación de las células musculares cardíacas está asociada con su remodelación de la estructura celular. Tal conclusión concuerda con la observación general de la diferenciación de las células musculares cardíacas durante el desarrollo del corazón: las células musculares diferenciadas siempre contienen sarcómeros bien organizados.

55 En resumen, el que NRG sea un factor de diferenciación para células miocárdicas está apoyado por las siguientes evidencias:

- i) NRG estimula la activación sostenida de MAP quinasas;
  - ii) NRG aumenta la expresión de p21<sup>CIP1</sup>;
  - ii) NRG inhibe la síntesis de ADN estimulada por IGF-1; y
  - iv) NRG estimula el ensamblaje celular miocárdico de estructuras sarcoméricas y citoesqueléticas.
- 5 v) NRG estimula expresión del gen de MHC de tipo adulto.

**Uso Terapéutico**

10 La presente invención proporciona métodos para el tratamiento o la prevención de la insuficiencia cardíaca o la hipertrofia de las células musculares cardíacas en un mamífero proporcionando una cantidad eficaz de una neurregulina como se define en las reivindicaciones. Preferiblemente, el mamífero es un paciente humano que sufre o tiene el riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca.

15 La presente invención es útil para prevenir la insuficiencia cardíaca y la cardiomiopatía en pacientes que estén siendo tratados con un fármaco que ocasione hipertrofia cardíaca o insuficiencia cardíaca congestiva, p. ej., acetato de fludrocortisona o herceptina. En el método de la invención, se puede proporcionar una neurregulina como se define en las reivindicaciones antes de, simultáneamente, o después de un fármaco que ocasione enfermedades cardíacas.

20 En el método terapéutico de la invención, se administra una neurregulina como se define en las reivindicaciones a un paciente humano crónicamente o agudamente, por ejemplo por medio de inyección en la vena del paciente. Opcionalmente, la neurregulina definida en las reivindicaciones se administra crónicamente combinada con una cantidad eficaz de un compuesto que actúa suprimiendo una ruta de inducción de la hipertrofia diferente a la de la neurregulina. Los componentes opcionales adicionales incluyen un inhibidor cardiopéptico tal como un antagonista de Ct-1, un inhibidor de ACE, tal como captopril, y/u hormona del crecimiento humana y/o IGF-1 en el caso de la insuficiencia cardíaca congestiva, o con otro factor anti-hipertrofico, miocardiopéptico, anti-arritmico, o inotrópico en el caso de otros tipos de insuficiencia cardíaca o trastorno cardíaco.

25 La presente invención se puede combinar con enfoques terapéuticos actuales para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, p. ej., con un tratamiento inhibidor de la ACE. Los inhibidores de la ACE son fármacos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina que evitan la conversión de angiotensina I en angiotensina II. Los inhibidores de la ACE pueden ser beneficiosos en la insuficiencia cardíaca congestiva reduciendo la resistencia vascular generalizada y aliviando la congestión circulatoria. Los inhibidores de la ACE incluyen fármacos diseñados por las marcas registradas Accupril® (quinapril), Altace® (ramipril), Capoten® (captopril), Lotensin® (benazepril), Monopril® (fosinopril), Prinivil® (lisinopril), Vasotec® (enalapril), y Zestril® (lisinopril).

30 La presente invención se puede combinar con la administración de terapias con fármacos para el tratamiento de enfermedades cardíacas tales como la hipertensión. Por ejemplo, se puede administrar una neurregulina como se define en las reivindicaciones con antagonistas de receptores de endotelina, por ejemplo, y anticuerpo contra el receptor de endotelina, y péptido u otros de tales antagonistas de molécula pequeña; antagonistas de adrenerreceptores β tales como carvedilol; (antagonistas de adrenerreceptores α<sub>1</sub>; anti-oxidantes; compuestos que tienen actividades múltiples (p. ej., bloqueador β/bloqueador α/anti-oxidante); compuestos de tipo carvedilol o combinaciones de compuestos que proporcionan funciones múltiples encontradas en el carvedilol; hormona de crecimiento, etc.

35 Los agonistas de neurregulina solos o combinados con otros agonistas de la ruta supresora de la hipertrofia o con moléculas que suscitan antagonismo sobre las rutas de inducción de la hipertrofia conocidas, son útiles como fármacos para el tratamiento in vivo de mamíferos que experimentan insuficiencia cardíaca, de manera que previenen o disminuyen los efectos de la insuficiencia cardíaca.

40 Las formulaciones terapéuticas de uno o varios agonistas para el tratamiento de trastornos cardíacos se preparan para su almacenamiento mezclando el agonista o los agonistas que tienen el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes, o estabilizadores fisiológicamente aceptables opcionales, (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16<sup>a</sup> edición, Oslo, A., Ed., 1980), en forma de torta liofilizada o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes, o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de alrededor de 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales glicina, glutamina, asparragina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como Tween, Pluronic, o polietilenglicol (PEG). El antagonista o los antagonistas se pueden unir también adecuadamente a una

45 de una variedad de polímeros no proteináceos, p. ej., polietilenglicol, polipropilenglicol, o polialquilenos, de la manera mostrada en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o

50

55

4.179.337. La cantidad de vehículo utilizado en una formulación puede oscilar de alrededor de 1 a 99%, preferiblemente de alrededor de 80 a 99%, óptimamente entre 90 y 99% en peso.

La presente descripción también hace referencia a que el agonista o los agonistas que se van a utilizar para la administración in vivo deben ser estériles. Esto se logra fácilmente por medio de métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante filtración a través de membranas de filtración estériles, antes o después de la liofilización y la reconstitución. El agonista o los agonistas se almacenarán comúnmente en forma liofilizada o en solución.

Las composiciones terapéuticas de agonistas se colocan generalmente en un recipiente que tenga un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial con solución intravenosa que tenga un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica. La administración del agonista o de los agonistas es únicamente de una manera crónica, por ejemplo, una de las siguientes rutas: inyección o infusión mediante las rutas intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial, o intralesional, oralmente o utilizando sistemas de liberación sostenida como se observa más abajo. El agonista o los agonistas se administran continuamente mediante infusión o mediante inyección en embolada periódica si el ritmo de aclaramiento es suficientemente lento, o mediante administración a la corriente sanguínea o a la linfa. El modo de administración preferido es dirigido al corazón, para dirigir la molécula a la fuente y minimizar los efectos secundarios de los agonistas.

Los ejemplos adecuados de las preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen la proteína, cuyas matrices están en forma de artículos moldeados, p. ej., películas, o microcápsulas. Los ejemplos de las matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (p. ej., poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) como describen Langer et al. (1981) *J. Biomed. Mater. Res.* 15: 167-277 y Langer (1982) *Chem. Tech.* 12: 98-105, o poli(alcohol vinílico)), poliláctidas (Patente de los Estados Unidos Núm. 3.773.919, Documento EP 58.481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato (Sidman et al. (1983) *Biopolymers* 22: 547-556), copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradables (Langer et al. (1981) más arriba) de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como Lupron Depot™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poly-D(-)-3-hidroxibutírico (Documento EP 133.988).

El agonista o los agonistas también se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial (por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-[metacrilato de metilo], respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, más arriba.

Si bien polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico posibilitan la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan moléculas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando las moléculas encapsuladas permanecen en el organismo durante mucho tiempo, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a humedad a 37°C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios de inmunogenicidad. Se pueden diseñar estrategias racionales para su estabilización dependiendo del mecanismo implicado, p. ej., utilizando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matrices poliméricas específicas.

Las composiciones de agonista o agonistas de liberación sostenida también incluyen uno o varios agonistas atrapados liposómicamente. Los liposomas que contienen uno o varios agonistas se preparan mediante métodos conocidos per se: Documento DE 3.218,121; Epstein et al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3688-3692; Hwang et al. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4030-4034; Documentos EP 52.322; EP 36.676; EP 88.046; EP 143.949; EP 142.641; Solicitud de Patente Japonesa 83-118008; Patentes de los Estados Unidos Núms. 4.485.045 y 4.544.545; y Documento EP 102.324. Por lo común los liposomas son de tipo unilamelar pequeño (alrededor de 200-800 Å) en los que el contenido de lípido es mayor de alrededor de 30% en moles de colesterol, ajustándose la proporción seleccionada para la terapia óptima con agonista. Un ejemplo específico de una formulación de liberación sostenida adecuada está en el documento EP 647.449.

Una cantidad eficaz de NRG como se define en las reivindicaciones que se vaya a emplear terapéuticamente dependerá, por ejemplo, de los objetivos terapéuticos, la ruta de administración, y el estado del paciente. Por lo tanto, usualmente será necesario que el médico clínico titule la dosificación y modifique la ruta de administración según se requiera para obtener el efecto terapéutico óptimo.

La NRG se combina opcionalmente con o se administra de manera concertada con otros agentes para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva, incluyendo inhibidores de la ACE, inhibidores de CT-1, hormona del crecimiento humana, y/o IGF-1. Las cantidades eficaces de tales agentes, si se emplearan, se encontrarán a la discreción del médico clínico. La administración y el ajuste de la dosificación se determinan por medio de métodos conocidos por los expertos en la técnica para lograr la mejor gestión de la insuficiencia cardíaca congestiva e idealmente tienen en cuenta el uso de diuréticos o digital, y condiciones tales como la hipotensión y el deterioro renal. La dosis dependerá adicionalmente de factores tales como el tipo de fármaco utilizado y el paciente específico que esté siendo tratado. Típicamente la cantidad empleada será la misma dosis que se utilizaría si el fármaco se administrara sin agonista; sin embargo, se pueden emplear dosis más bajas dependiendo de factores tales como la

presencia de efectos secundarios, la afección que esté siendo tratada, el tipo de paciente, y el tipo de agonistas y el fármaco, siempre que la cantidad total de agentes proporcione una dosis eficaz para la afección que esté siendo tratada.

5 De este modo, por ejemplo, en el caso de los inhibidores de la ACE, una dosis de ensayo de enalapril es de 5 mg, que a continuación se incrementa a 10-20 mg por día, una vez al día, a medida que el paciente la tolere. En cuanto a otro ejemplo, el captopril se administra inicialmente oralmente a pacientes humanos a una dosis de ensayo de 6,25 mg y a continuación la dosis se aumenta a escala, a medida que el paciente la tolere a 25 mg dos veces por día (BID) o tres veces por día (TID) y se puede titular a 50 mg BID o TID. El nivel de tolerancia se estima determinando si el descenso de la presión arterial está acompañado de signos de hipotensión. Si se indicara, la dosis se puede incrementar a 100 mg BID o TID. El captopril se produce para su administración como ingrediente activo, combinado con hidroclorotiazida, y como un núcleo estabilizado al pH que tiene un revestimiento entérico o de liberación retardada que protege el captopril hasta que alcanza el colon. El captopril es asequible para su administración en forma de comprimido o de cápsula. Una discusión de la dosificación, la administración, las indicaciones y las contraindicaciones asociadas con el captopril y otros inhibidores de la ACE se puede encontrar en The Physicians Desk Reference, Medical Economics Data Production Co., Montvale, N.J. 2314-2320 (1994).

10 En un ejemplo de una composición terapéutica inyectable de neurregulina, la formulación contiene 1% de neurregulina y 99% de solución salina, donde la neurregulina es uno de sus polipéptidos. En otro ejemplo de una composición terapéutica inyectable de neurregulina, la formulación contiene 5% de polipéptido de neurregulina, 1% de inhibidor de la ACE captopril, y 94% solución salina.

20

LISTA DE SECUENCIAS

<110>Zensum (Shanghai) Science and Technology Limited  
 <120>Función y Manipulación del Músculo Cardíaco  
 <130>J101740PCEPT1  
 5 <150>EP99967856.8  
 <151>1999-12-21  
 <160>2  
 <170>PatentIn Versión 3.3  
 <210>1  
 10 <211>114  
 <212>ADN  
 <213>Homo sapiens  
 <400>1

**agccatcttg taaatgtgcg gagaaggaga aaactttctg tgtgaatgga ggggagtgct 60**  
**tcatggtgaa agacctttca aaccctcga gatacttggtg aggagctgta ccag 114**

15 <210>2  
 <211>158  
 <212>PRT  
 <213>Homo sapiens  
 <400>2

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

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

**Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met**  
**35 40 45**

20 **Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr**  
**50 55**



**REIVINDICACIONES**

1. El uso de un dominio EGF de neurregulina en solitario para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca en un mamífero, donde dicho dominio EGF de neurregulina en solitario activa las proteínas tirosina quinasas heterodiméricas ErbB2/ErbB4 o ErbB2/ErbB3.
- 5 2. El uso de la reivindicación 1, donde el dominio EGF de neurregulina es el dominio EGF de la isoforma  $\beta$ 2 de la neurregulina humana.
3. El uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde la insuficiencia cardíaca se caracteriza por la disociación de la adherencia célula a célula y/o el desorden de la estructura sarcomérica de la musculatura cardíaca en el mamífero.
- 10 4. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la insuficiencia cardíaca está causada por un factor isquémico, congénito, reumático, idiopático o viral, o por el tratamiento con un fármaco.
5. El uso de la reivindicación 4, donde el fármaco es acetato de fludrocortisona o herceptina.
6. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el medicamento comprende adicionalmente un vehículo, excipiente o estabilizante farmacéuticamente aceptable.
- 15 7. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el medicamento se preparara para su administración combinado con una cantidad eficaz de un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) o un agente para el tratamiento de la hipertensión.
8. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el medicamento es adecuado para la administración oral, el uso en un sistema de liberación sostenida, la inyección o la infusión, o la administración por medio de un adenovirus o un virus adenoasociado.
- 20 9. El uso de la reivindicación 8, donde la inyección o la infusión se selecciona del grupo que consiste en la inyección o infusión intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial e intralesional.
10. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el mamífero es un ser humano.

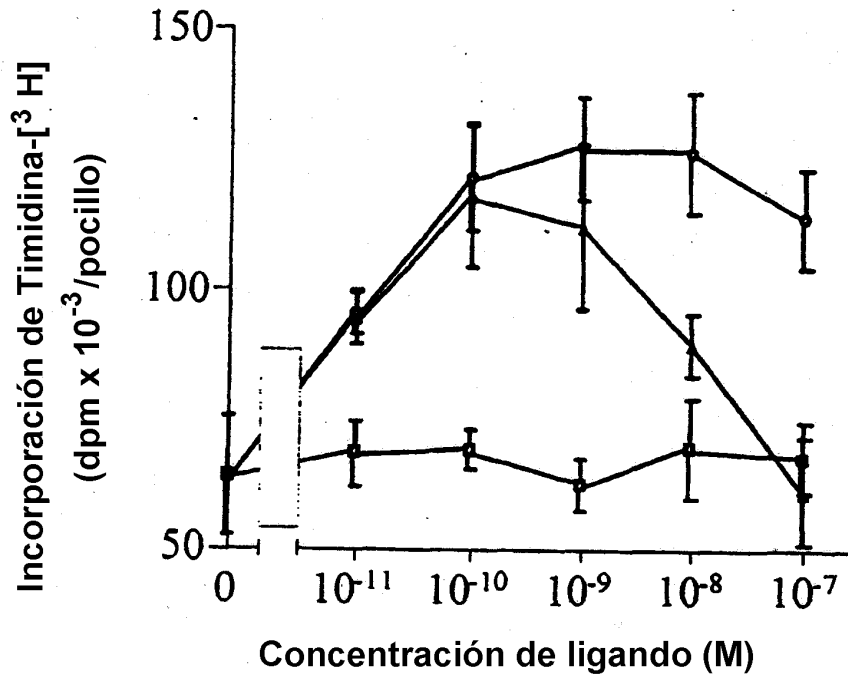


Figura 1

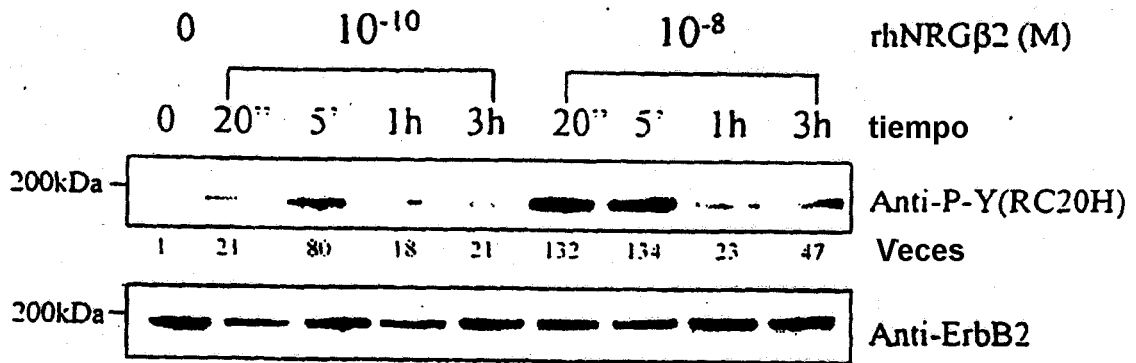


Figura 2a

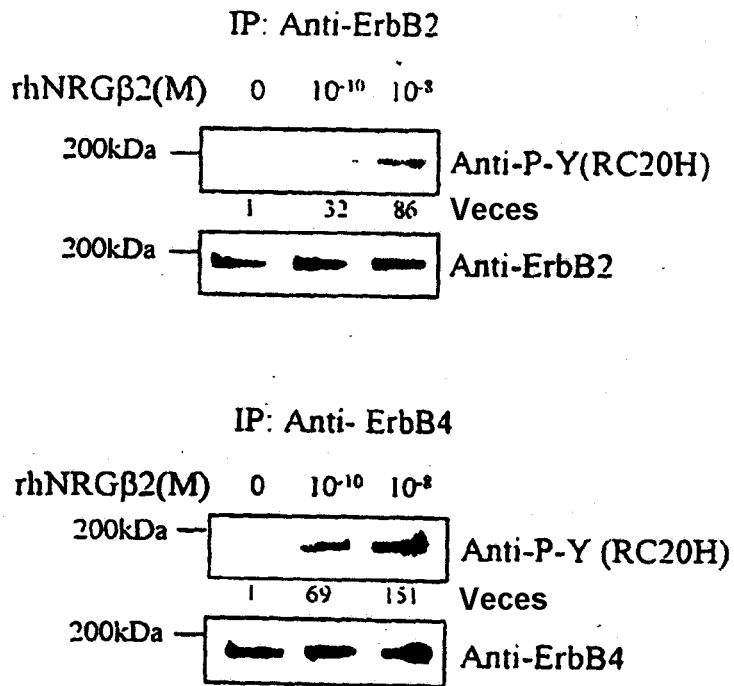


Figura 2b

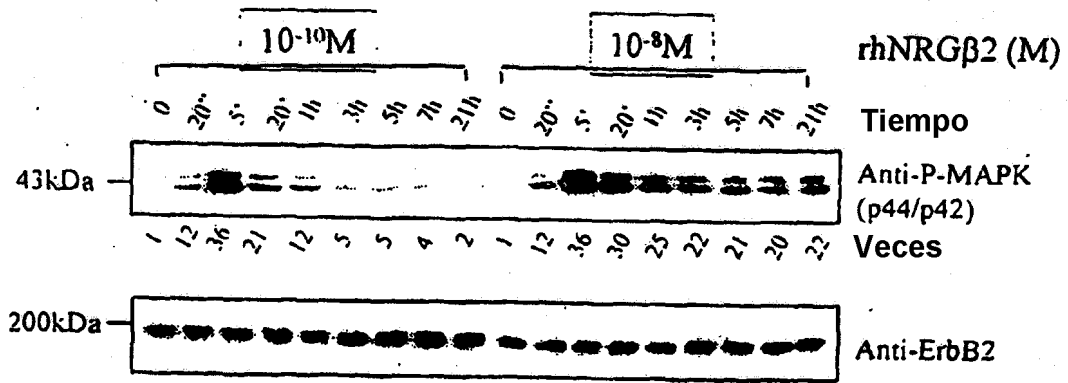


Figura 3a

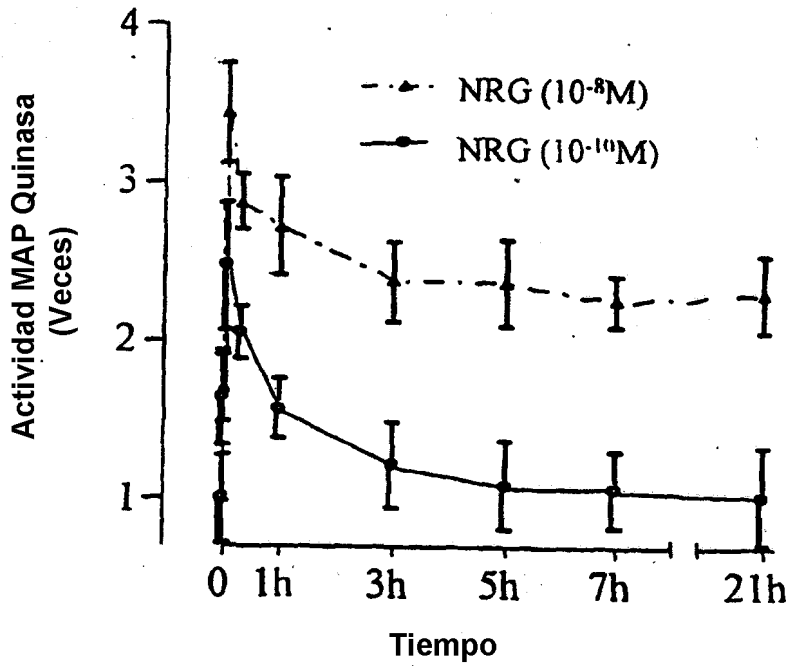


Figura 3b

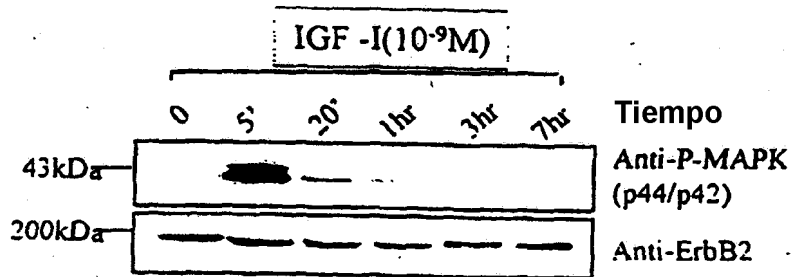


Figura 3c

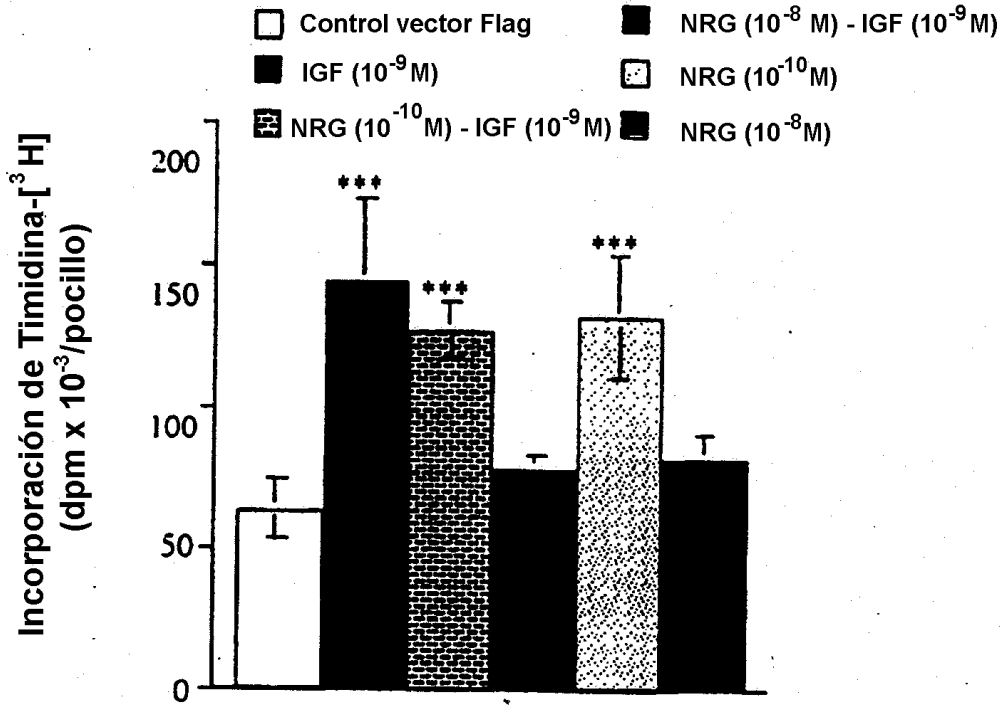


Figura 4a

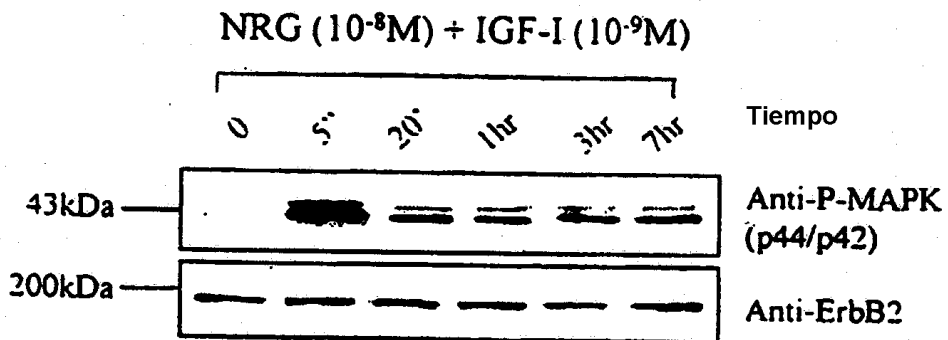


Figura 4b

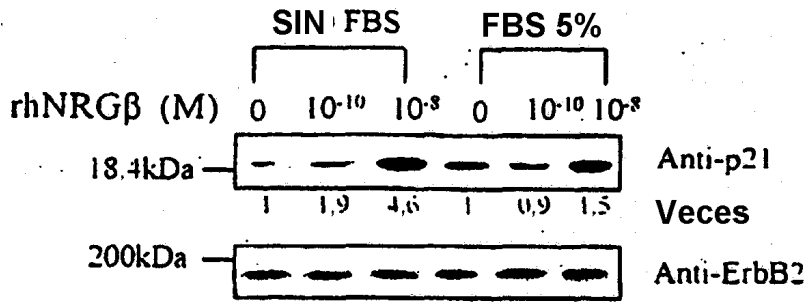


Figura 5a

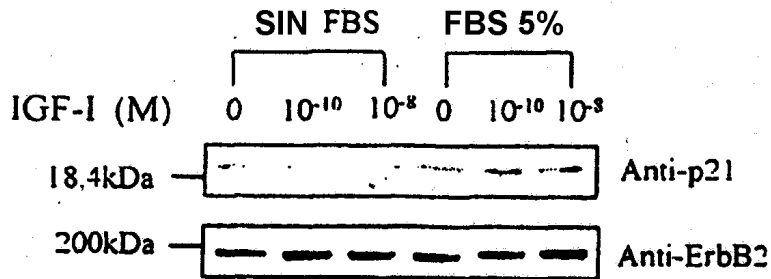


Figura 5b

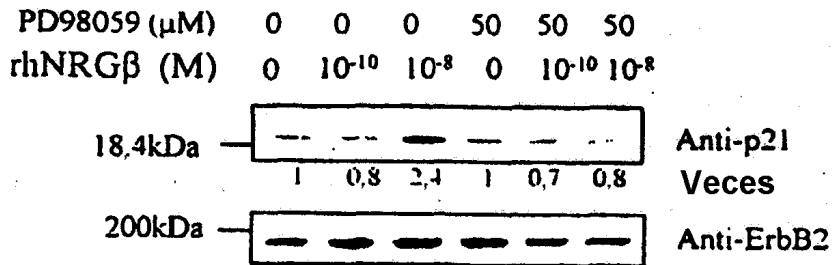


Figura 5c

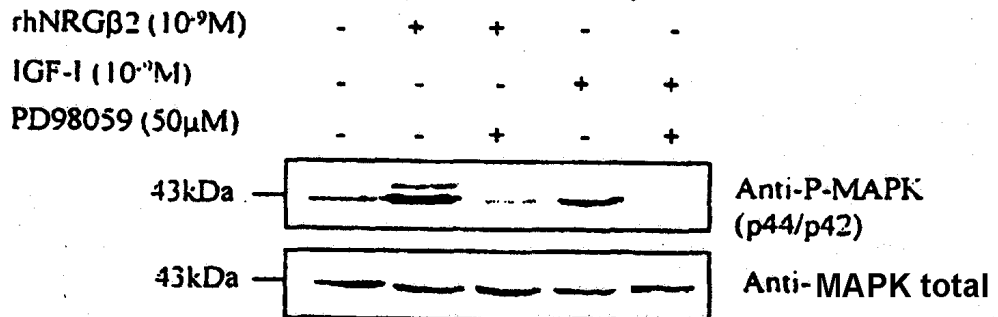


Figura 5d

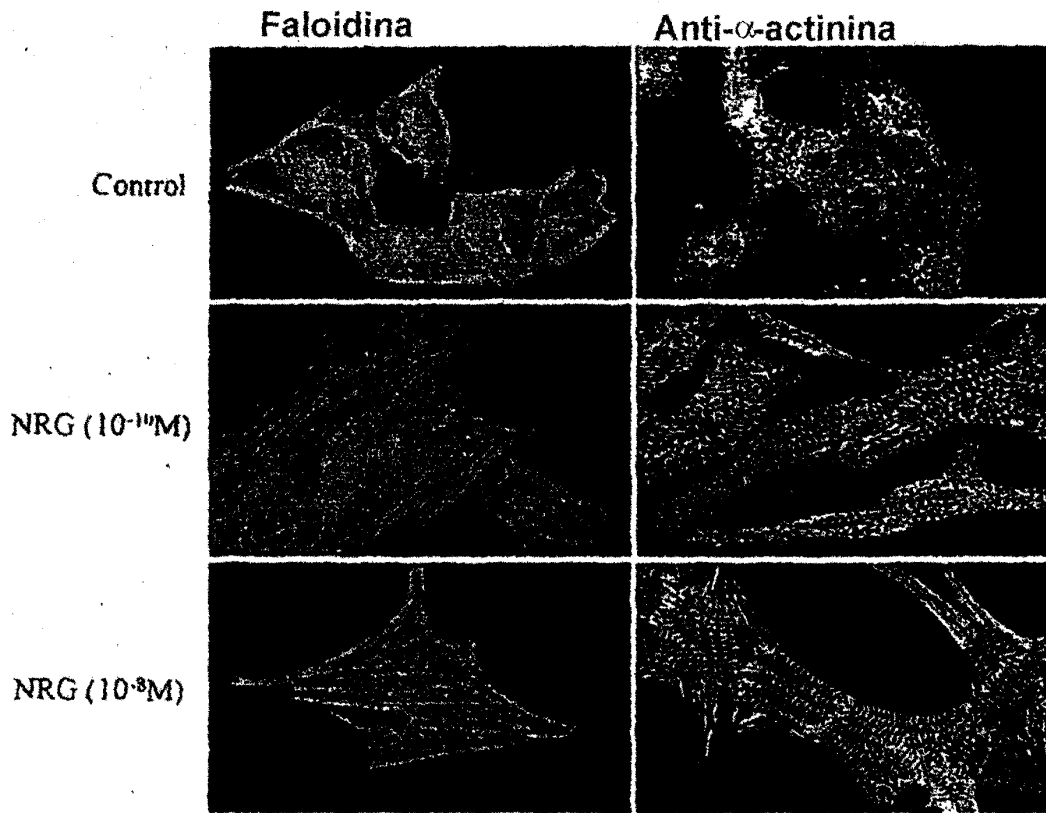


Figura 6a

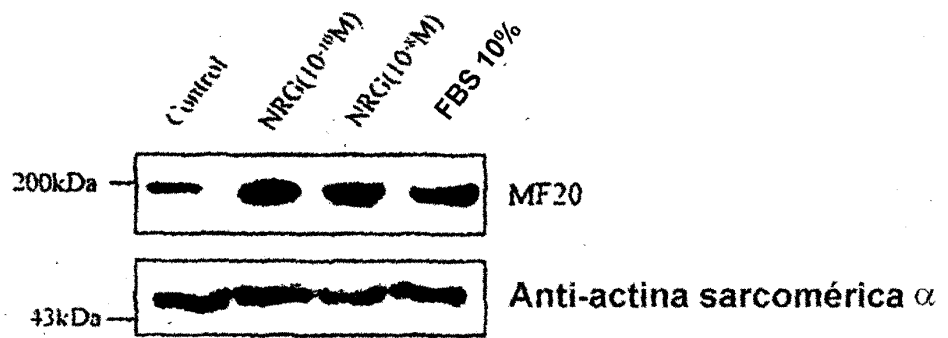


Figura 6b