

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 414 058**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2008 E 08851021 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2013 EP 2219662**

54 Título: **Isoformas activas solubles de Neurregulina modificadas después de la traducción**

30 Prioridad:

16.11.2007 US 988576 P

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

18.07.2013

73 Titular/es:

**MIND-NRG SA (100.0%)
2, rue de Jargonnant
1207 Genf , CH**

72 Inventor/es:

SCHRATTENHOLZ, ANDRÉ

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 414 058 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

Isoformas activas solubles de Neurregulina modificadas después de la traducción.

5 La presente invención se refiere a isoformas de Neurregulina-1 solubles en soluciones fisiológicas que representan modificaciones o variantes de remodelación de Neurregulina-1 posteriores a la traducción como medicación en trastornos neurológicos relacionados con la cognición, en particular esquizofrenia, enfermedades de Alzheimer y de Parkinson, en los cuales la isoforma de Neurregulina-1 es una isoforma de Neurregulina-1 humana recombinante soluble y en los cuales la isoforma de Neurregulina-1 tiene un peso molecular de aproximadamente 15 a aproximadamente 35 KD como se mide por SDS-PAGE.

10 **Antecedentes**

15 Las Neurregulinas (NRG) han surgido como reguladores fundamentales de la señalización sináptica. Estas proteínas transmembranales están codificadas por cuatro genes (NRG-1, -2, -3 y -4), y su diversidad se ve incrementada adicionalmente por la remodelación alternativa del RNA y el uso de promotores y en particular por modificaciones posteriores a la traducción como el procesamiento proteolítico que conduce a la liberación de isoformas solubles de holoproteínas fijadas a la membrana. Adicionalmente, existe evidencia de fosforilación y glicosilación (Buonanno y Fischbach 2001). Las mismas se caracterizan por dominios extracelulares diferentes y son ligandos de las tirosina-quinazas receptoras ErbB, que tienen connotaciones aguas abajo para neuroinflamación y transición génica (Holbro y Hynes 2004). En particular, las isoformas solubles de NRG-1 se producen a partir de la forma transmembranal de NRG por escisión proteolítica durante la estimulación eléctrica, y se secretan subsiguientemente como moduladores sinápticos dependientes de la actividad (Ozaki et al. 2004).

20 Una isoforma truncada de NRG-1, presumiblemente $\beta 1$, que comprende el dominio extracelular (ECD) N-terminal de la proteína de membrana entera, que se ha encontrado está correlacionada con el aprendizaje y la memoria (Schillo et al. 2005a; WO 03/014156). Estudios funcionales han demostrado que NRG-1 regula directamente la composición de la subunidad receptora de NMDA (Ozaki et al. 1997; Eilam et al. 1998). Además, se ha demostrado que fragmentos de NRG-1 de este tipo tienen propiedades neuroprotectoras in vivo por efectos antiapoptóticos (Xu et al. 2005A; Xu et al. 2005B; Xu et al. 2004).

25 Muy recientemente, ha llegado a establecerse con claridad que NRG-1 tiene un papel central en enfermedades neurológicas humanas debidas a la regulación dependiente de NRG de receptores de NMDA (Schrattenholz y Soskic 2006), y eventos subsiguientes aguas abajo como excitotoxicidad, neuroinflamación y apoptosis (véase Figura 1 como resumen). Existen resultados que muestran que NRG-1 juega un papel fundamental en afecciones que van desde esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer y de Parkinson, hasta ictus y esquizofrenia (Britsch 2007).

30 Esta importancia fundamental de NRG-1 implica que además de la neuroprotección y de un papel positivo en el aprendizaje y la memoria relacionados con la cognición, NRG-1 representa un factor neurotrófico crucial en la regeneración del tejido neuronal después de una diversidad de lesiones, en una diversidad de regiones cerebrales específicas y tipos de células. Obviamente, es el factor crucial para el mantenimiento y la reparación de la integridad de la cicutería neuronal: neuroprotectora y con papeles en la regeneración correcta después de la pérdida de función, así como en la formación de la plasticidad neuronal dependiente de la actividad.

35 El interés en la Neurregulina 1β se estimuló ulteriormente de modo considerable cuando Kastin et al. 2004, demostraron que la Neurregulina 1β es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica. Ello abrió la perspectiva de la utilización terapéutica de Neurregulina 1β .

40 Investigaciones posteriores demostraron la amplitud de aplicación en la neuroprotección. Independientemente, se demostró en dos publicaciones que Neurregulina-1 es también un sustrato de BACE (β -secretasa, enzima convertidora del β -amiloide), lo que indica la relevancia de Neurregulina-1 en la enfermedad de Alzheimer (Glabé 2006; Schubert, 2006).

45 Adicionalmente, se encontró que en las células de Schwann, la Neurregulina-1 aumenta la transcripción de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A-reductasa, la enzima limitante de la velocidad para la biosíntesis del colesterol en las células de Schwann (Pertusa et al. 2007). Esto tiene implicaciones de gran alcance para todas las afecciones en las cuales se ve afectada la vaina de mielina, v.g. esquizofrenia y esclerosis múltiple, o funciones relacionadas con la cognición, en las que están implicadas las denominadas "balsas ricas en colesterol" (Schrattenholz y Soskic 2006). Los axones que rodean las células de Schwann expresan los receptores de NRG1 ErbB2/ErbB3 y NRG1 soluble α y β en condiciones fisiológicas. Después de la desnervación, las células de Schwann adultas abandonan el contacto con el axón, cambian su morfología, dejan de expresar NRG1 β , y regulan en sentido creciente la expresión de NRG1 α y ErbB2/ErbB3 (Geuna et al. 2007; Karoutzou et al. 2007).

55 Adicionalmente, la investigación epidemiológica genética muestra la clara asociación de Neurregulina-1 con la esquizofrenia y la enfermedad de Alzheimer, y en particular con sus formas psicóticas (Farmer et al., 2007).

Algunos análisis recientes de poblaciones genéticas muestran que ciertas NRG-1-SNP's están asociadas con el Alzheimer y la esquizofrenia (Go et al. 2005; Scolnick et al. 2006; Ross et al. 2006; Meeks et al. 2006; Farmer et al. 2007). Las implicaciones de estos descubrimientos están relacionadas con otras proteínas del complejo funcional que contiene NRG representado en la Figura 1 (receptor ErbB: (Benzel et al. 2007; Thompson et al. 2007; Hahn et al. 2006). Existe también una implicación para NRG-1 en la esclerosis múltiple (Esper et al. 2006).

Hay resultados que sugieren que el mecanismo molecular de la asociación entre los alelos de riesgo de NRG1 y la esquizofrenia puede incluir la regulación decreciente de receptores nicotínicos de acetilcolina del subtipo alfa7 (Mathew et al. 2007).

De acuerdo con la presente invención, se encontró que las isoformas de Neurregulina-1 β recombinantes solubles exhiben eficacia farmacéutica en modelos animales para aprendizaje y memoria, esquizofrenia, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson. Después de la administración i.v., las isoformas de Neurregulina-1 β eran activas a concentraciones que son significativamente menores que las concentraciones de los medicamentos de control.

Así, un primer aspecto de la presente invención es el uso de una isoforma de Neurregulina-1 recombinante soluble para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la esquizofrenia, en particular aspectos de la esquizofrenia relacionados con cognición, trastorno bipolar y depresión, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, epilepsia, MS, ALS, ictus, lesión traumática cerebral y lesión de la médula espinal, en donde la isoforma de Neurregulina-1 es una isoforma de Neurregulina-1 humana recombinante soluble y en donde la isoforma de Neurregulina-1 tiene un peso molecular de aproximadamente 15 a aproximadamente 35 KD como se mide por SDS-PAGE.

Un aspecto adicional de la presente invención es una composición farmacéutica o kit que comprende (i) una isoforma de Neurregulina-1 recombinante soluble en donde la isoforma de Neurregulina-1 es una isoforma de Neurregulina-1 humana recombinante soluble y en donde la isoforma de Neurregulina-1 tiene un peso molecular de aproximadamente 15 a aproximadamente 35 KD como se mide por SDS-PAGE y (ii) un medicamento adicional particularmente para el tratamiento de afecciones neurológicas, particularmente de afecciones neurológicas relacionadas con la cognición.

Otro aspecto adicional de la presente invención es el uso de una isoforma de Neurregulina-1 recombinante soluble en donde la isoforma de Neurregulina-1 es una isoforma de Neurregulina-1 humana recombinante soluble y en donde la isoforma de Neurregulina-1 tiene un peso molecular de aproximadamente 15 a aproximadamente 35 KD como se mide por SDS-PAGE para la fabricación de un medicamento para mejora de la memoria y la cognición.

De acuerdo con la presente invención, se ha encontrado que las isoformas solubles de Neurregulina-1 son eficaces para el tratamiento de afecciones neurológicas, particularmente afecciones tales como trastornos psicóticos como la esquizofrenia, el trastorno bipolar y la depresión, trastornos neurodegenerativos, como enfermedad de Parkinson, enfermedad del Alzheimer, Esclerosis Múltiple (MS) o Esclerosis Amiotrófica Lateral (ALS), epilepsia o lesión neurológica como ictus, lesión traumática cerebral y lesión de la médula espinal. Se prefiere el tratamiento de la esquizofrenia, en particular aspectos de la esquizofrenia relacionados con cognición, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Alzheimer. Adicionalmente, la invención se refiere también al uso de isoformas de Neurregulina-1 recombinantes solubles en las que la isoforma de Neurregulina-1 es una isoforma de Neurregulina-1 humana recombinante soluble y en donde la isoforma de Neurregulina-1 tiene un peso molecular de aproximadamente 15 a aproximadamente 35 KD como se mide por SDS-PAGE para la fabricación de un medicamento para mejora de la memoria y la cognición, en particular para reducción o inhibición de la pérdida de memoria y cognición asociada con una afección neurológica tal como la enfermedad de Alzheimer y la esquizofrenia.

La isoforma de Neurregulina-1 recombinante soluble es preferiblemente una isoforma de Neurregulina-1 humana, es decir una isoforma recombinante que comprende la secuencia de aminoácidos primaria de una isoforma de Neurregulina-1 humana existente naturalmente o una secuencia que tiene una identidad de al menos 90%, preferiblemente al menos 95% y muy preferiblemente al menos 98% basada en la longitud total de la isoforma recombinante.

La isoforma de Neurregulina-1 recombinante soluble de la presente invención comprende preferiblemente al menos una porción del dominio extracelular de la Neurregulina-1 correspondiente, v.g. al menos una porción del dominio extracelular de una Neurregulina humana, v.g. Neurregulina-1 β humana.

La isoforma de Neurregulina recombinante soluble de la presente invención tiene preferiblemente una longitud de hasta 250 aminoácidos, v.g. 150 a 250 aminoácidos. El peso molecular de la isoforma de Neurregulina es con preferencia aproximadamente 25 a aproximadamente 32 KD, como se mide v.g. por electroforesis en SDS-poliacrilamida (PAGE). La isoforma de Neurregulina-1 recombinante soluble, particularmente la isoforma de Neurregulina-1 β recombinante, tiene un punto isoeléctrico (pI) de aproximadamente 4 a aproximadamente 9,5, con preferencia aproximadamente 4 a aproximadamente 6. La isoforma puede ser un polipéptido no modificado que está constituido por una secuencia de aminoácidos no modificada o un polipéptido modificado, en donde la modificación puede seleccionarse de fosforilación, glicosilación, metilación, miristilación, oxidación y cualquier combinación de los

misimos. En una realización especialmente preferida, la isoforma de Neurregulina-1 comprende al menos un residuo de aminoácido fosforilado. Adicionalmente, la presente invención abarca conjugación a restos heterólogos tales como restos poli(óxido de alquileo), particularmente restos polietilenglicol.

5 Las isoformas recombinantes solubles pueden administrarse de acuerdo con cualquier ruta por la cual se consigue el suministro eficaz al tejido diana, v.g. el sistema nervioso, en particular el sistema nervioso central, tal como el cerebro y/o la médula espinal. Se encontró que pueden conseguirse concentraciones farmacéuticamente eficaces de isoformas de Neurregulina por administración sistémica. Por ejemplo, las isoformas se pueden administrar por inyección o infusión, v.g. por inyección intravenosa. Las isoformas se administran preferiblemente en una cantidad de 0,1 a 5000 ng/kg de peso corporal, particularmente en una cantidad de 2 a 1000 ng/kg de peso corporal y más
10 particularmente en una cantidad de 3 a 600 mg/kg de peso corporal del individuo a tratar, dependiendo del tipo y la gravedad de la afección a tratar. En otras realizaciones de la presente invención, las isoformas solubles se pueden administrar también localmente, v.g., por administración directa al sistema nervioso central, v.g. a la médula espinal y/o al cerebro. Asimismo, puede considerarse la administración en dosis mayores de hasta 500 µg/kg por inyecciones i.p. o s.c., o dispositivos de inhalación. Preferiblemente el individuo a tratar es un mamífero, más
15 preferiblemente un paciente humano.

Las isoformas de Neurregulina-1 recombinantes solubles pueden administrarse como medicación única, es decir como monoterapia, o como co-medicación, es decir en combinación con un medicamento adicional, particularmente con un medicamento adicional que es adecuado para el tratamiento de una afección neurológica. Ejemplos de medicamentos adicionales son compuestos que afectan al metabolismo de las catecolaminas, inhibidores de la acetilcolin-esterasa, inhibidores de MAO-B- o inhibidores de COMT, bloqueadores de canales de tipo memantina, agonistas o antagonistas de los receptores de dopamina o serotonina, inhibidores de la reabsorción de catecolamina o serotonina o cualquier tipo de medicamentos antipsicóticos como clozapina u olanzapina o fármacos análogos a la gabapentina, particularmente en el tratamiento de las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, esquizofrenia, trastorno bipolar, depresión u otras afecciones neurológicas. Ejemplos adicionales de otros medicamentos son agentes neuroprotectores tales como inhibidores de PARP-1, v.g., como se dan a conocer en WO 2006/008118 y WO 2006/008119.

Así pues, una realización de la presente invención se refiere a la combinación de una isoforma de Neurregulina-1 recombinante soluble como se reivindica en esta memoria con un medicamento para el tratamiento de trastornos psicóticos tales como esquizofrenia, trastornos bipolares y depresión, v.g., olanzapina o clozapina. Una realización
30 adicional se refiere a la combinación de una isoforma de Neurregulina-1 recombinante soluble en donde la isoforma de Neurregulina-1 es una isoforma de Neurregulina-1 humana recombinante soluble y en donde la isoforma de Neurregulina-1 tiene un peso molecular de aproximadamente 15 a aproximadamente 35 KD como se mide por SDS-PAGE, y un medicamento para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa tal como enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, MS o ALS. Otra realización adicional se refiere a la combinación de una
35 isoforma de Neurregulina-1 recombinante soluble en donde la isoforma de Neurregulina-1 es una isoforma de Neurregulina-1 humana recombinante soluble y en donde la isoforma de Neurregulina-1 tiene un peso molecular de aproximadamente 15 a aproximadamente 35 KD como se mide por SDS-PAGE y un medicamento para el tratamiento de una lesión neurológica, tal como ictus, lesión traumática cerebral o lesión de la médula espinal.

La terapia de combinación puede efectuarse por co-administración de la isoforma de Neurregulina-1 recombinante soluble y el medicamento adicional en la forma de una composición farmacéutica o kit, en donde los medicamentos individuales se administran por administración separada o común.

La isoforma de Neurregulina-1 puede ser una isoforma de Neurregulina-1 Tipo I, Tipo II, Tipo III, Tipo IV, Tipo V o Tipo VI, preferiblemente una isoforma de Neurregulina-1 β , una isoforma de Neurregulina-1 α o una isoforma del factor derivado de neuronas sensoriales y motoras (SMDF), particularmente una isoforma de Neurregulina-1 β y más
45 particularmente una isoforma de Neurregulina-1 β humana.

Las isoformas de Neurregulina-1 β se transportan activamente a través de la barrera hematoencefálica. La excelente biodisponibilidad de Neurregulina-1 β en el cerebro después de inyección i.v./i.p., como se muestra en los ejemplos, prepara el terreno para una aplicación terapéutica de NRG1 β .

Su combinación de propiedades antiapoptóticas, estabilizadores de la mielina, y anti-inflamatorias, junto con la interacción directa con BACE abre oportunidades en el tratamiento de ictus, Alzheimer, MS y esquizofrenia y otras afecciones neurológicas.

Como se ha reseñado anteriormente, la presente solicitud abarca el uso de isoformas de Neurregulina-1 no modificadas y modificadas, particularmente isoformas de Neurregulina-1 β . Existe evidencia de que las modificaciones posteriores a la traducción tales como el procesamiento proteolítico, la fosforilación y la glicosilación
55 tienen lugar en ciertos residuos de aminoácidos de la Neurregulina-1, y en particular su dominio extracelular. En particular, se ha consignado la liberación de fragmentos solubles de Neurregulina-1 (Buonanno y Fischbach 2001; Fischbach 2007). Se ha comunicado también la oxidación potencial (Nadri et al. 2007).

Los autores de la presente invención han obtenido evidencia de que isoformas de Neurregulina-1 β fisiológicamente activas preferidas comprenden el dominio extracelular de Neurregulina-1 β o una parte del mismo que ha sido modificada con posterioridad a la traducción. Preferiblemente, las isoformas se han modificado por fosforilación, en donde se han fosforilado 1, 2, 3 o más residuos de cadenas laterales de aminoácidos, particularmente residuos de cadenas laterales que tienen un grupo OH tales como Tyr, Ser o Thr. Sitios de fosforilación preferidos están localizados en las posiciones de los aminoácidos 79-82, 133-136 y/o 158-161 (nomenclatura de acuerdo con Falquet et al., 2002). Sitios de fosforilación preferidos adicionales están localizados en los aminoácidos 12-14 30-32 y/o 85-87. Sitios de modificación potencial adicionales son sitios de amidación, localizados preferiblemente en las posiciones 22-25 y/o 30-33, sitios de glicosilación en las posiciones 150-153, 156-159 y/o 204-207, y sitios de miristilación, localizados preferiblemente en las posiciones 94-99, 149-154, 168-173, 175-180 y/o 202-207 de acuerdo con la nomenclatura de Falquet et al. 2002.

En lo que sigue, la relevancia de los datos experimentales de acuerdo con la presente solicitud se explica con relación a indicaciones médicas preferidas.

Esquizofrenia

La esquizofrenia es un trastorno mental grave e incapacitante con síntomas tales como alucinaciones auditivas, pensamiento desordenado y delirios, abulia, anhedonia, afectos debilitados y apatía. Estudios epidemiológicos, clínicos, neuropsicológicos, y neurofisiológicos han proporcionado evidencia sustancial de que anomalías en el desarrollo cerebral y la neuroplasticidad progresiva juegan papeles importantes en la patogénesis del trastorno (Arnold et al. 2005).

Se cree que la esquizofrenia incluye un trastorno de neurotransmisión dopaminérgica, pero la modulación del sistema dopaminérgico por neurotransmisión glutamatérgica parece jugar un papel fundamental. Esta opinión está respaldada por hallazgos genéticos de los genes de Neurregulina u disbindina, que tienen impacto funcional en el sistema glutamatérgico (Muller y Schwarz 2006). Ha llegado a esclarecerse crecientemente que varias regiones que contienen probablemente genes (con inclusión de Neurregulinas) que contribuyen a la esquizofrenia son relevantes también para el trastorno afectivo bipolar, un descubrimiento respaldado por datos dobles recientes (Farner et al. 2007; Owen et al. 2007).

La Neurregulina-1, que es un gen de susceptibilidad de psicosis con efectos sobre la migración neuronal, la orientación de los axones y la mielinización que podría explicar potencialmente hallazgos de conectividad anatómica y funcional anormal en la esquizofrenia y el trastorno bipolar (McIntosh et al. 2007).

Existe un cuerpo de evidencia cada vez mayor de un enlace genético de la Neurregulina-1 con la esquizofrenia (revisión: Farner et al. 2007). La mejora de la neurotransmisión de glutamato, GABA y nicotínica por Neurregulina-1 (Fischbach 2007; Woo et al. 2007; Li et al. 2007) es relevante en este contexto, así como la implicación con la inflamación cerebral (Hanninen et al. 2007).

La regulación de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A-reductasa, la enzima limitante de la velocidad para la biosíntesis del colesterol (Pertusa et al. 2007), importante para la mielinización, se supone que tiene asimismo implicaciones en esta afección.

El hecho de que entre los factores de riesgo genéticos comunes a la esquizofrenia, el trastorno bipolar y la depresión, NRG1 juega un papel fundamental, ha desencadenado sugerencias de que los genes implicados en estas psicosis tales como NRG1 pueden proporcionar eventualmente la base para una clasificación basada en biología en lugar de síntomas, y ha conducido a nuevas estrategias de tratamiento para estos trastornos cerebrales complejos (Blackwood et al. 2007; Bertram et al. 2007).

Los datos experimentales de la presente solicitud demuestran la eficacia de la administración de una isoforma de Neurregulina-1 β recombinante soluble en un modelo experimental de esquizofrenia.

Enfermedad de Alzheimer

La investigación inicial por los inventores demostró que la Neurregulina-1 β está disminuida en secciones post-mortem de los hipocampos de cerebros de pacientes de Alzheimer en comparación con controles de la misma edad (Sommer et al., 2004) con una correlación positiva clara del fragmento soluble de Neurregulina-1 con la eficiencia de aprendizaje en un test de laberinto radial (Sommer et al., 2004).

Existen numerosos informes que demuestran el papel de NRG-1 en cambios sinápticos dependientes de la actividad (Xie et al. 2006; Kwon et al. 2005; Rimer et al. 2005; Bao et al. 2004; Yang et al. 2005) importantes para el aprendizaje y la memoria (Ozaki et al. 1997; Ozaki et al. 2004; Golub et al. 2004; Schillo et al. 2005b). Como se muestra más adelante, el fragmento de NRG1 β que contiene el dominio extracelular estaba asociado claramente con el aprendizaje en un modelo animal de comportamiento. La demostración de la expresión disminuida de la proteína en cortes de cerebro post-mortem de las regiones del hipocampo (responsables de la formación de la memoria a corto plazo) de pacientes de Alzheimer en comparación con controles de la misma edad podría

demostrar la ausencia de actividad sináptica relacionada con la memoria, en regiones de neuronas aparentemente todavía sanas.

5 Descubrimientos muy recientes (Hu et al. 2006; Glabe 2006; Schubert 2006) indican que la NRG1 es procesada por BACE1 (= β -secretasa), una enzima que ayuda a generar grumos de amiloide- β en los cerebros de las personas con enfermedad de Alzheimer, lo que explica la relación con la enfermedad de Alzheimer, su papel concomitante en la formación de mielina está relacionado con las propiedades neurotróficas de NRG1 (Hu et al., 2006; Glabe 2006; Schubert 2006). Se requiere que la enzima, BACE1 (enzima de escisión 1 de la proteína precursora de amiloide del sitio beta), escinda el amiloide- β de un precursor mayor. (Después de la escisión mediada por BACE1, el complejo de gamma-secretasa que contiene presenilina realiza la escisión final, liberando el amiloide- β).

10 La escisión de NRG por las secretasas es crucial para la mielinización nerviosa. Exactamente del mismo modo que la proteína precursora de amiloide, la Neurregulina-1 es escindida también por la β -secretasa. La escisión proteolítica de la Neurregulina-1 por β -secretasa es crítica para la mielinización de los nervios periféricos por las células de Schwann. Los fármacos que direccionan la β -secretasa podían afectar al desarrollo y la función de los nervios periféricos.

15 La observación inicial fue realizada por el grupo de Haass (Willem et al., 2006), que encontraron que BACE1 parece ser necesaria también para la mielinización. La mielinización de los nervios periféricos ocurre al principio de la vida, por lo que no está claro de qué modo podría afectar la inhibición de BACE1 a animales de mayor edad. Existen indicaciones de que BACE1 desempeña también un papel en la mielinización del sistema nervioso central. Los animales transgénicos deficientes en BACE-1 tenían defectos de mielina en los nervios periféricos.

20 Asimismo, en el contexto de la neurodegeneración y la enfermedad de Alzheimer es relevante el reciente descubrimiento de la mejora de la neurotransmisión de glutamato, GABA y nicotínica por Neurregulina-1 (Fichbach 2007; Woo et al. 2007; Li et al. 2007).

Los datos experimentales de la presente solicitud demuestran la eficacia de la administración de una isoforma de Neurregulina-1 β recombinante soluble en un modelo experimental de enfermedad de Alzheimer.

25 **Ictus, lesión traumática cerebral**

Una serie de experimentos in vivo relacionados con el ictus por investigación externa independiente en los Estados Unidos, demuestran neuroprotección por Neurregulina-1 que es en sí misma antiapoptótica (Xu et al., 2004, 2005 y 2006; Guo et al. 2006).

30 La NRG-1 reduce el deterioro neuronal y mejora el resultado neurológico después de oclusión de la arteria cerebral media (un modelo común de ictus) (Xu et al. 2005b; Xu et al. 2004; Xu et al. 2006; Guo et al. 2006).

En el mismo estudio acerca de la eficacia terapéutica y el mecanismo de la NRG-1 humana recombinante en la atenuación de la lesión cerebral por isquemia/reperusión, se encontró que NRG es antiapoptótica. NRG-1 (3,0 ng/kg) se aplicó intravascularmente 10 minutos antes de la oclusión de la arteria cerebral media (MCAO) e isquemia cerebral focal subsiguiente durante 90 min y reperusión durante 24 h.

35 Los datos de la presente invención demuestran que la administración de isoformas de Neurregulina-1 recombinante soluble a baja concentración tiene un efecto farmacológico importante y por ello se asume que es eficaz en modelos de ictus y lesión traumática cerebral.

En lo que sigue, se explica la presente solicitud con mayor detalle por medio de las figuras y ejemplos dados a continuación.

40 **Figura 1:** Diversas revisiones y numerosos artículos de investigación acerca de Neurregulina-1 demuestran la posición funcional fundamental de NRG-1 como un principio regulador aguas arriba de mecanismos que se cree son fundamentales en enfermedades neurodegenerativas, trastornos neurológicos, y función fisiológica:

45 Las NRG son partes clave de complejos funcionales, constituidos al menos por Neurregulinas (NRG), tirosina-quinasas receptoras (receptores ErbB), proteoglicanos de sulfato de heparano (HSPG) y receptores de NMDA (NMDAR), que están ensamblados transitoriamente y son dependientes de la actividad juntos en microdominios de membrana ricos en colesterol (CHO). En particular, la conformación de señales de calcio es importante para la interacción con proteínas del armazón subsináptico por modificaciones posteriores a la traducción (PSD-95, por interacción con ciertos dominios fosforilados, como dominios PDZ o SH en proteínas asociadas). El complejo PSD-95 regula directamente enzimas pro-inflamatorias como la sintasa del óxido nítrico (NOS, iNOS es inducible, nNOS es neuronal) y Cox-2 (ciclooxigenasa-2), que promueven sus efectos en una relación compleja con mecanismos afines, pero no necesariamente situados aguas abajo, que implican enzimas dependientes de NAD⁺ como PARP-1 (poli-ADP-ribosa-polimerasa-) y Sir-2 (sirtuina-2); PARG es poli(ADP-ribosa)-glicohidrolasa, la enzima complementaria y antagonista para PARP-1, HDAC son histona-desacetilasas, la clase general de enzimas que incluye Sir-2. MPTP significa el poro de transición de permeabilidad mitocondrial. DRP-2 es la proteína 2 relacionada con dihidropirimidinas. Asimismo, otras proteínas de membrana importantes, como ciertos receptores nicotínicos de

55

acetilcolina (nAChR α 7), receptores de GABA_A (GABA_AR), la proteína precursora de amiloide (APP) y las proteasas (PS) están organizados transitoriamente en balsas lipídicas y adquieren propiedades funcionales diferentes fuera del ambiente fosfolipídico (PL) usual, detalles en (Schramm y Sossic 2006).

5 **Figura 2:** Sumario de experimentos de aprendizaje en el laberinto de agua de Morris: los animales tratados con una dosis diaria de 3 ng/kg (i.v.) del dominio extracelular soluble de Neuregulinas-1 beta (NRG-1 beta-ECD) eran significativamente mejores en aprendizaje que los animales tratados con vehículo; IAE: entrada al área interior; IAEF frecuencia de entrada al área interior; TS: tiempo invertido en el área interior; DT: instancia recorrida en el área interior.

10 **Figura 3:** Reducción de la hiperactividad inducida por Anfetamina por NRG-1 beta-ECD, un modelo ampliamente aceptado para esquizofrenia. Las concentraciones estaban comprendidas entre 15 y 600 ng/kg (inyección i.v. 15 minutos antes de la aplicación de amfetamina). Se incluyó un control positivo de 0,125 mg/kg de Haloperidol.

15 Si bien Haloperidol, al igual que otros antipsicóticos no típicos y típicos, reducen usualmente la actividad por debajo del nivel de control (indicado aquí por líneas punteadas marcadas veh/veh, en azul para cruzamientos y en magenta para empinamientos), la reducción de NRG-1 beta-ECD se aproxima asintóticamente a los niveles de actividad de control, pero no causa reducción ulterior. Las bajas concentraciones eficaces de NRG-1 beta-ECD y la ausencia de efectos negativos (reducción de la actividad por debajo de los niveles de control de vehículo) son las propiedades más notables en este modelo. Los efectos son significativos con $p < 0,05$.

20 **Figura 4:** Sumario de los experimentos de aprendizaje con el modelo de ratón APPPS de amiloidosis cerebral y enfermedad de Alzheimer en un laberinto de agua de Morris; los animales tratados con una dosis diaria de 200 ng/kg i.p. de NRG-1 beta-ECD eran significativamente mejores en aprendizaje que los animales tratados con vehículo; IAE: entrada al área interior; IAEF: frecuencia de entrada al área interior; TS: tiempo invertido en el área interior; DT: distancia recorrida en el área interior.

Figura 5: Cuantificación por HPLC de dopamina y sus metabolitos: las columnas marcadas con asteriscos son altamente significativas.

Leyenda	S	Solución salina (control)
	aM	MPTP agudo
	aMN	MPTP agudo y NRG-1 beta ECD
	aN	NRG-1 agudo beta ECD
	cM	MPTP crónico
	cMN	MPTP crónico y NRG-1 beta ECD
	cN	NRG-1 crónico beta ECD

25 **Figura 6:** Metabolismo de dopamina por MAO-B y COMT.

30 **Figura 7:** La exposición a MPTP conduce a una pérdida significativa de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra (aMPTP, $p = 0,0005$; y cMPTP, $p = 0,0075$). La aplicación i.p. de 20 ng/kg de NRG-1 beta-ECD conduce a una inversión (aN-MPTP; $p = 0,57$, es decir no diferente del control de vehículo) de mejora clara y significativa de la lesión MPTP (cNR-MPTP; $p = 0,0097$); en el modelo crónico (5 días de aplicación diaria i.p. de 20 ng/kg de NRT-1 beta-ECD) existe también un efecto significativo del número de neuronas dopaminérgicas (cNR; $p = 0,0002$);

Leyenda	NaCl	Solución salina (control)
	aMPTP	MPTP agudo
	aNR-	
	MPTP	MPTP agudo y NRG-1 beta-ECD
	aNR	NRG-1 beta-ECD agudo
	cMPTP	MPTP crónico
	cNR-	
	MPTP	MPTP crónico y NRG-1 beta-ECD
	cNR	NRG-1 beta-ECD crónico

Figura 8: Se muestran dos imágenes representativas de transferencias Western 2D de proteínas cerebrales de ratones APPPS teñidas para Neuregulina-1 β de cada uno, un animal tratado y de aprendizaje satisfactorio (arriba) y un animal sin tratar con eficiencia de aprendizaje inferior (abajo).

35 Los números en la parte superior son valores pI del gel 2D.

Figura 9: Un experimento de transferencia Western compara la abundancia del fragmento NRG-1 β ECD en material cortical post-mortem procedente de pacientes de Alzheimer y controles.

40 **Figura 10:** La 2D-PAGE muestra que la isoforma ácida de NRG-1 β -ECD, con un pI de aproximadamente 5-5,5 y un peso molecular de aproximadamente 25-32 kD en estos experimentos está claramente reducida en los cerebros de los pacientes de Alzheimer.

Ejemplos**Generalidades:**

5 En la totalidad de los experimentos que siguen, se han utilizado fragmentos de Neurregulina-1 beta, que comprenden únicamente el dominio extracelular (ECD) del transcrito entero del gen nrg-1 humano. Dichos fragmentos tenían un peso molecular de aproximadamente 25-32 kD y puntos isoeléctricos entre aproximadamente 5 y 9,5, dependiendo del estatus de fosforilación y/o glicosilación.

10 La forma fisiológicamente activa de la isoforma de Neurregulina-1 tiene un pI de aproximadamente 5,5. La forma fisiológicamente activa tiene un pI de aproximadamente 5,5 (la mayor parte de los experimentos se llevaron a cabo con una isoforma disponible comercialmente producida en E. coli, que tenía un peso molecular de 26 kD y un pI de aproximadamente 9,0).

Esta isoforma es un fragmento de NRG-1 beta humana recombinante soluble constituido por los 245 primeros aminoácidos de NRG-1β, adquirido de R&D Systems, Inc. (No. de Catálogo 377-HB-CF). El mismo se designará en lo que sigue NRG-1 beta-ECD. Esta isoforma activa tiene un pI de aproximadamente 9,0.

15 Se testó también un fragmento correspondiente de NRG-1β con 8 kD, que comprendía únicamente el dominio EGF, adquirido de R&D Systems (Catálogo No. 396-HB). Este fragmento parece ser neuroprotector tanto in vitro como in vivo, pero no se investigó en profundidad debido a propiedades proliferativas muy superiores, lo que aumentó las preocupaciones acerca de la carcinogenicidad.

Ejemplo 1

20 **Datos de toxicología iniciales indican que NRG-1β (ECD) no tiene efecto adverso alguno en la toxicología aguda y en tests de mutagenicidad in vitro.**

• No se encontró en ningún caso toxicidad intravenosa aguda en las ratas: todos los animales sobrevivieron hasta el final del periodo de estudio. No se observó signo clínico alguno durante el curso del estudio. El peso corporal de los animales estaba comprendido dentro del intervalo registrado comúnmente para esta variedad y edad. No se encontró ningún hallazgo macroscópico en la necropsia. La dosis letal media de NRG-1β (ECD) después de administración intravenosa simple a ratas hembra, observadas a lo largo de un periodo de 14 días es:

LD₅₀ (rata hembra): mayor que 5000 ng/kg de peso corporal.

• La administración intravenosa diaria de Neurregulina a lo largo de un periodo de 7 días a niveles de dosis de 50, 200 y 600 ng/kg de peso corporal/día no dio como resultado ninguna muerte prematura. No se registraron signos clínicos de ningún tipo. El tratamiento no afectaba al consumo de alimentos y al desarrollo del peso corporal. La ausencia de efectos no observados (NOEL) se estableció en 600 ng/kg de peso corporal/d.

• En el ensayo del locus timidinaquinasa del linfoma de ratón utilizando la línea de células L5178Y de acuerdo con la Directriz de la OECD para el Test de Productos Químicos, No. 476 "In vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test", NRG1β (ECD) era no mutágena.

• En el test de aberración cromosómica en las células V79 del hámster chino de acuerdo con la Directriz de la OECD para el Test de Productos Químicos, No. 473, NRG1β (ECD) no inducía aberraciones cromosómicas estructurales.

40 Además, en ninguno de los experimentos con animales realizados con relación a eficacia (algunos de ellos con una duración de varios meses con aplicaciones iv) diarias, los inventores observaron efectos adversos de NRG1β (ECD).

La aplicación de NRG1β (ECD) en los diversos modelos animales descritos más adelante, se realizó por inyecciones intravenosas (iv) o intraperitoneales (ip); las concentraciones estaban comprendidas entre 3 y 600 ng/kg.

Ejemplo 2

Aprendizaje y Memoria: Aprendizaje Espacial con y sin Aplicación de NRG-1 beta-ECD

45 **Métodos:**

El Laberinto de Agua de Morris evalúa el aprendizaje espacial. Requiere que los animales naden en una piscina llena de agua y encuentren una plataforma de rescate sumergida justamente por debajo de la superficie. Es obligado que la plataforma se sitúe lejos de las paredes del laberinto y que los animales tengan puntos de referencia visibles desde la superficie del agua que permitan la estimación de la localización, pero no estén suficientemente próximos a la diana a fin de permitir un aprendizaje asociativo. Los animales se entrenan a fin de que el rescate llegue únicamente por la vía de la plataforma, lo que significa que todos los animales que no encuentran la plataforma, son

guiados hacia la plataforma y se dejan descansar antes de ser retirados del montaje. Por tanto, uno de los puntos de referencia más importantes para el ratón es el operador humano.

El experimento está orientado a determinar dos parámetros fundamentales asociados con la memoria espacial murina:

- 5 • la velocidad a la que los ratones aprenden a relocalizar la plataforma,
- la capacidad para retener la información a corto plazo (dentro de un periodo de entrenamiento o a lo largo de una noche)

Animales

10 El estudio se realiza con dos grupos de ratones APP/PS (Meyer-Luehmann et al. 2006; Radde et al. 2006), uno de los cuales se trata con una dosis diaria de NRG-1 beta-ECD y el otro se trata falsamente como control. Cada grupo está constituido por 8 animales macho que tienen 9 semanas de edad al comienzo de su primera serie de experimentos.

15 La primera serie de experimentos se inició con dos subgrupos de 8 ratones tratados y 8 sin tratar en la semana 42 y tenía una duración de 15 días. Las series ulteriores de experimentos idénticos se realizarán 6, 12, etc. semanas más tarde.

Para un segundo par de subgrupos (8 animales macho tratados y 8 sin tratar de 9 semanas de edad) se inició la misma serie de experimentos en la semana 48, por lo que los experimentos de estos subgrupos tuvieron exactamente un retraso de 6 semanas después de los primeros subgrupos.

Aparato

20 La aptitud de aprendizaje de los ratones APP/PS tratados y sin tratar se evalúa utilizando un laberinto de agua de Morris circular que debería ser lo bastante grande para proporcionar espacio de investigación sin agotar al ratón. Es necesario que se ponga el máximo cuidado a fin de mantener cada detalle del montaje experimental lo más invariable posible a lo largo de todos los experimentos.

25 En el estudio normal, se utiliza una piscina de 120 cm de diámetro que está situada en una posición exactamente reproducible en el laboratorio siempre con orientación idéntica. En posiciones fijas en la piscina, se encuentra una plataforma circular translúcida blanca de 15, 10, ó 5 cm de diámetro que se extiende justamente por debajo de la superficie del agua (por lo que es invisible para los ratones) y a la que los animales pueden subirse - que es el único medio de permanecer descansando fuera del agua. Para ayudar a la subida, la plataforma está recubierta con una superficie de agarre de tela metálica (véase la Figura 11).

30 Con objeto de realizar el procedimiento de rescate en las pruebas de sonda como se detalla más adelante, la plataforma está equipada con un mecanismo que permite la elevación y el descenso automáticos de la misma sin intervención directa del operador. Así, dependiendo de su altura, la plataforma es accesible para los ratones que nadan, o no, "On-Demand Platform" (Buresova et al. 1985).

35 Las localizaciones de la plataforma están situadas siempre en una región concéntrica y de forma anular de la piscina con diámetros interior y exterior ~ 40 cm y ~ 80 cm, respectivamente. Están definidos cuatro cuadrantes de tal manera que la plataforma ocupa la región central de uno de ellos (el cuadrante diana). Para detalles adicionales acerca de los tamaños y posiciones de la plataforma, véase más adelante.

40 Con objeto de asegurarse de que la posición de la plataforma es exactamente la misma a todo lo largo de una serie entera de experimentos; se fijará firmemente un manguito al fondo de la piscina sobre el cual puede montarse la plataforma con un mínimo de tolerancia espacial. Encima de la plataforma, en su centro, se encuentra otro montaje para una señal (proximal) que sobresale del agua, y que es perfectamente visible en el registro de vídeo así como para los ratones que nadan en la piscina. Para una comprobación de la posición de la plataforma, se tomará un breve registro de vídeo sin animal alguno pero con la señal insertada en la plataforma siempre que la plataforma o la cámara de vídeo se hayan manipulado de alguna manera.

45 El agua se hace opaca utilizando leche en polvo con bajo contenido de grasa. La temperatura del agua debería ser lo bastante fría para estimular la búsqueda de una salida, pero no tan fría que los animales sufran o se agoten. Como un compromiso aceptable, la temperatura del agua se monitoriza al comienzo de cada experimento y se modula con agua caliente o escamas de hielo a 18°C. Entre las pruebas individuales, se reajusta la temperatura en caso necesario.

50 Se fijan cuatro señales distales (de diferentes formas geométricas y distintos colores, altura ~ 20 cm) ~ 20 cm por encima de los bordes de la piscina, una en cada cuadrante. Se tiene cuidado a fin de colocar cada señal exactamente en la misma localización en todos los experimentos. La piscina entera está encerrada por una cortina blanca translúcida. La iluminación es tenue y difusa.

Se monta firmemente una cámara de vídeo en una posición exactamente vertical encima del centro de la piscina, de tal modo que la piscina llene completamente la imagen del vídeo. Se toman registros de vídeo con resolución PAL (720 x 576 píxeles, 25 imágenes por segundo), como mínimo. Los vídeos se evalúan por un sistema de seguimiento automático que permite la detección sin fallos de los movimientos de los animales con el tiempo.

- 5 Los ratones se introducen en el agua utilizando un dispositivo especial que está montado sobre una barra, de tal manera que los mismos pueden mojarse en puntos exactamente definidos a lo largo del borde de la piscina sin que el operador entre en la cabina constituida por la cortina translúcida.

Diseño Experimental

10 En cada sesión, los ratones se introducen en la piscina en sitios predefinidos y se deja que naden durante 60 s. Se registra el curso del movimiento de los animales por un sistema de seguimiento por vídeo, y se computan los parámetros a partir de los cuales pueden extraerse conclusiones concernientes a la aptitud de aprendizaje de los animales (muy particularmente el periodo hasta que el ratón llega a la plataforma por primera vez = "latencia de escape"; véanse detalles adicionales más adelante). Si un ratón tiene éxito en encontrar la plataforma se le deja descansar en ella durante un breve periodo de tiempo (~ 15 s). En caso contrario, después de 60 s de natación, el ratón es guiado hasta la plataforma por el operador y se le deja descansar durante ~ 15 s. Después de ello, el animal es recogido por el operador, se le seca suavemente y se devuelve a su jaula o se prepara para la próxima natación.

15 Cada día de los experimentos, se realiza una prueba por ratón a principios de la mañana. Cada prueba consiste en dos nataciones consecutivas procedentes desde dos cuadrantes diferentes, pero nunca desde el cuadrante diana. Se asignan aleatoriamente sitios exactos de entrada en el agua (y las posiciones de la plataforma en caso aplicable) para cada natación de cada día, pero no difieren entre los ratones individuales durante dicho día.

20 Si los ratones llegan a aprender demasiado lentamente, el número de nataciones por prueba o pruebas por día puede aumentarse (y viceversa). Además, en muchas variedades de ratón los animales más jóvenes aprenden muy rápidamente, de tal modo que después de 4 ó 5 días de entrenamiento, las latencias de escape se mantienen constantes en sólo unos pocos segundos, lo cual es cierto igualmente en los animales tratados y en los animales sin tratar. No obstante, para la evaluación estadística, es ventajoso que la curva de latencias de escape a lo largo de los días de entrenamiento no se sature sino que más bien disminuya monótonamente. Por tanto, se utiliza un diseño experimental en el cual el problema a resolver se hace más difícil a medida que progresa el entrenamiento: En días predefinidos, la plataforma se reemplaza con una más pequeña en tanto que las coordenadas del centro de la plataforma se mantienen iguales. Si cambian las plataformas y en qué momento se realiza el cambio, puede determinarse independientemente para cada serie de experimentos, y ello debería hacerse dependiendo de los resultados de la serie anterior.

En cada serie de experimentos, los ratones se someten a tres clases de tareas diferentes:

- 35 • Navegación con sitio señalado. La plataforma se marca con una señal, y se deja que el ratón nade hasta que encuentra la plataforma. Este procedimiento ensaya el aprendizaje asociativo y sirve para dividir los ratones en dos grupos experimentales cuyas aptitudes de aprendizaje son lo más parecidas posible. Además, en la segunda serie de experimentos y en las ulteriores, la navegación con sitio señalado respalda la recogida en blanco de la posición de la plataforma en las series precedentes.
- 40 • Entrenamiento de adquisición de plataforma oculta. La plataforma es invisible para los ratones y está localizada en la misma posición que durante la natación anterior. Esta tarea permite la monitorización del progreso del ratón en lo que respecta al recuerdo de la localización exacta de una plataforma oculta ("aprendizaje espacial").
- 45 • Test de la prueba de sonda. En esta tarea, la plataforma que se busca se sumerge en grado máximo por debajo de la superficie y se deja que el ratón nade libremente buscándola. El test de la prueba de sonda evalúa el recuerdo absoluto de los animales que, en este contexto, puede interpretarse también como convicción, persistencia o certidumbre en lo que respecta a la localización de la plataforma. El enfoque convencional para interpretar el experimento es que los animales que han fijado firmemente la localización de la plataforma la buscarán más persistentemente en una localización limitada e invertirán por ello más tiempo en la zona próxima a la plataforma.
- 50 • En el test de la prueba de sonda, existe un riesgo de que la imposibilidad de encontrar la plataforma pueda reducir el incentivo para nadar en la zona de la plataforma. Con objeto de mantener estas irritaciones tan pequeñas como sea posible, las modalidades de rescate humano deberían mantenerse iguales a fin de que exista cierta constancia espacial a pesar la ausencia de la plataforma. Para ello, después de 60 s de natación, la plataforma se levanta hasta justamente por debajo de la superficie, el ratón es guiado hacia ella por el operador y se deja que descanse durante ~ 15 s antes de retirarlo del aparato.

55 Todos los días del test de la prueba de sonda, se realiza solamente una natación.

Aproximadamente 60 minutos antes de cada prueba, los ratones se tratan diariamente con 5 ng/kg de NRG-1 beta-ECD (suspendida en suero de ratón negro 6 y proporcionada i.v. en un volumen de 20 µl por ratón) o con 20 µl de vehículo i.v., respectivamente.

- 5 El día 1 de la primera serie de experimentos, todos los ratones incluidos en el estudio reciben únicamente tratamiento falso. Después de ello, se asignan los ratones a los grupos de Neurregulina y de control de tal modo que las distribuciones de las latencias de escape coincidan en ambos grupos.

En cada serie de experimentos se sigue la cronología siguiente:

- | | | |
|----|---------|---|
| | día 1. | Búsqueda de la plataforma señalizada con plataforma de 10 cm de tamaño y posición cambiante para cada natación; |
| 10 | día 2. | Búsqueda de la plataforma señalizada con plataforma de 10 cm de tamaño y posición cambiante para cada natación; |
| | día 3. | Búsqueda de la plataforma señalizada con plataforma de 10 cm de tamaño y posición cambiante para cada natación; |
| 15 | día 4. | Búsqueda de la plataforma señalizada con plataforma de 10 cm de tamaño y la misma posición que la última del día 3; |
| | día 5. | Búsqueda de la plataforma oculta con plataforma de 15 cm de tamaño y la misma posición. |
| | día 6. | Búsqueda de la plataforma oculta con plataforma de 15 cm de tamaño y la misma posición. |
| | día 7. | Búsqueda de la plataforma oculta con plataforma de 15 cm de tamaño y la misma posición. |
| 20 | día 8. | Búsqueda de la plataforma oculta con plataforma de 10 cm de tamaño y la misma posición. |
| | día 9. | Test de la prueba de sonda. |
| | día 10. | Búsqueda de la plataforma oculta con plataforma de 10 cm de tamaño y la misma posición. |
| | día 11. | Búsqueda de la plataforma oculta con plataforma de 10 cm de tamaño y la misma posición. |
| | día 12. | Búsqueda de la plataforma oculta con plataforma de 5 cm de tamaño y la misma posición. |
| | día 13. | Búsqueda de la plataforma oculta con plataforma de 5 cm de tamaño y la misma posición. |
| 25 | día 14. | Búsqueda de la plataforma oculta con plataforma de 5 cm de tamaño y la misma posición. |
| | día 15. | Test de la prueba de sonda. |

Puede ser necesario favorecer el olvido de la posición de la plataforma con respecto a una serie de experimentos anterior dejando que los ratones naden libremente durante varios días sin plataforma presente.

- 30 La velocidad de aprendizaje se evalúa por monitorización de cada sesión de entrenamiento/test y anotando el éxito de los animales en la localización de la plataforma así como la evolución de la estrategia de búsqueda desde el rodeo de los lados de la piscina para alejarse de los bordes hasta buscar en las proximidades del área central en la que se encuentra la plataforma.

Parámetros Medidos

- 35 A partir de los registros en vídeo de los animales, se extrae el seguimiento del movimiento de cada ratón y se exporta como una serie de coordenadas x, y, y tiempo para procesamiento ulterior. Es preciso tener cuidado a fin de identificar fiablemente cada punto de partida del seguimiento y evitar errores de seguimiento. Simultáneamente, se computan cierto número de parámetros de los cuales pueden extraerse conclusiones con relación a la aptitud de aprendizaje de los animales (véase más adelante). Los registros de los parámetros cesan después de 60 s o si el ratón ha encontrado la plataforma (lo que ocurra antes).

- 40 Para la definición de los parámetros a computar a partir de los registros de seguimiento de los animales, se definen las zonas siguientes (véase la Figura 12):

A fin de mantener las evaluaciones lo más flexibles posible, se emplean cuatro zonas diana concéntricas (centradas alrededor de la plataforma) de 5,5 a 30 cm de diámetro. Los parámetros computados a partir de los registros de seguimiento de los animales incluyen:

- | | |
|----|--|
| 45 | <ul style="list-style-type: none"> ● Distancia total recorrida ● Velocidad global media ● Número de entradas en el centro de la piscina ● Tiempo en el centro de la piscina |
| 50 | <ul style="list-style-type: none"> ● Latencia hasta la primera entrada en el centro de la piscina ● Distancia recorrida hasta la primera entrada en el centro de la piscina ● Número de entradas en el área interior ● Tiempo en el área interior ● Distancia recorrida en el área interior |
| 55 | <ul style="list-style-type: none"> ● Latencia hasta la primera entrada en el área interior ● Distancia recorrida hasta la primera entrada en el área interior y para cada zona diana 1 a 4 y el cuadrante diana ● Número de entradas en la zona ● Tiempo en la zona |

- Distancia recorrida en la zona
- Latencia hasta la primera entrada en la zona
- Distancia recorrida hasta la primera entrada en la zona
- Distancia desde el comienzo del seguimiento hasta el punto más próximo de la zona
- 5 • Distancia media de la zona cuando está fuera de la zona
- Distancia mínima de la zona cuando está fuera de la zona
- Tiempo hasta la distancia mínima desde la zona cuando está fuera de la piscina
- Tiempo de acercamiento a la zona
- Tiempo de alejamiento de la zona
- 10 • Tiempo de movimiento hacia la zona
- Tiempo de alejamiento de la zona
- Número de entradas de la cabeza a la zona
- Tiempo de la cabeza en la zona
- Distancia recorrida de la cabeza en la zona
- 15 • Latencia hasta la primera entrada de la cabeza en la zona
- Distancia media de la cabeza desde la zona cuando está fuera de la zona
- Distancia mínima de la cabeza desde la zona cuando se encuentra fuera de la zona
- Error de orientación inicial
- Error de orientación medio
- 20 • Número de salidas de la zona.

Para cada día del experimento, las lecturas de los parámetros de progreso del aprendizaje en los grupos tratado y sin tratar se comparan estadísticamente unas con otras.

- Al examinar los registros de seguimiento de los ratones individuales, un observador humano es capaz de extraer una apreciación realística de la confianza de los animales en la localización de la plataforma que no se refleja plenamente en los valores de los parámetros medidos. Para ello, los registros de seguimiento se inspeccionan también manualmente y se evalúa el recuerdo por los animales de la posición de la plataforma.

Resultados

- Los animales tratados con una dosis diaria de 3 ng/kg de NRG-1 beta-ECD i.v. 30 min antes del entrenamiento exhibían parámetros significativamente mejores en lo relacionado con el aprendizaje que el grupo tratado con vehículo.

- La Neurregulina no sólo mejoraba el aprendizaje, sino que los animales tratados desarrollaban también estrategias de búsqueda más avanzadas: más animales tratados entraban en el área interior de la piscina (11 frente a 7, $p = 0,019$), las entradas en el área interior se producían más a menudo (2,17 frente a 0,92 veces, $p = 0,02$) y el tiempo invertido y la distancia recorrida en la zona interior eran mayores (6,51 s frente a 2,13 s, $p = 0,09$ y 0,64 m frente a 0,25 m, $p = 0,031$, respectivamente).

Los resultados de los experimentos de aprendizaje en un laberinto de agua de Morris se resumen en la Figura 2.

Ejemplo 3

Esquizofrenia: Hiperactividad inducida por la anfetamina en la rata

Métodos:

- 40 El método, que detecta actividad antipsicótica y anti-Parkinson, sigue lo descrito por Costall et al. 1978 utiliza un medidor de actividad similar al descrito por Boissier y Simon 1966.

La anfetamina induce hiperactividad en la situación de este test. La hiperactividad es antagonizada por antipsicóticos clásicos y atípicos que actúan sobre los sistemas dopaminérgicos al nivel límbico, y está potenciada por los fármacos anti-Parkinson.

- 45 Las ratas se inyectan con d-anfetamina (3 mg/kg, i.p.) y se colocan inmediatamente en el medidor de actividad.

- El medidor de actividad consiste en 12 jaulas de plexiglás con tapa (40 x 25 x 25 cm) contenidas dentro de un armario oscuro. Cada jaula está equipada con dos montajes de célula fotoeléctrica en ambos extremos de la jaula, 3 cm por encima del suelo, a fin de medir el número de movimientos de cada animal (uno por jaula) de un extremo de la jaula al otro. Están situados dos montajes de célula fotoeléctrica adicionales a 20 cm por encima del suelo a fin de registrar el levantamiento. Las puntuaciones de actividad y levantamiento se registran por computadora durante intervalos de 10 minutos y se acumulan durante un periodo de 30 minutos.

Se estudiaron 15 ratas por grupo. El test se realizó a ciegas.

La sustancia de test se evaluó al cabo de 8 dosis, administradas i.v. 15 minutos antes de la anfetamina, y se comparó con un grupo de control de vehículo. El experimento incluía también un grupo de control que no se trató con anfetamina. Como sustrato de referencia se utilizó Haloperidol (0,125 mg/kg i.v.), administrado en las mismas condiciones experimentales.

5 El experimento incluyó por tanto 16 grupos.

Los datos se analizaron por comparación de los grupos tratados con un control apropiado utilizando tests de Student no apareados.

Resultados:

10 Como se muestra en la Figura 3, NRG-1 beta-ECD inhibe de una manera dependiente de la dosis la hiperactividad inducida por anfetamina en un modelo animal de esquizofrenia.

Claramente, los experimentos revelan propiedades destacadas de NRG-1 beta-ECD:

- Los efectos que se muestran en la Figura 3 son más fuertes en la segunda mitad del experimento (minutos 20-40). En los primeros 20 minutos puede encontrarse sólo un efecto menor, señalando este efecto retardado el procesamiento ulterior de la proteína.
 - 15 • Las concentraciones eficaces de NRG-1 beta-ECD utilizadas en este caso son aproximadamente 200-1000 veces menores que las utilizadas para neurolepticos de control típicos tales como Haloperidol (125 µg/kg).
 - En contraste con Haloperidol, Clozapina, Olanzapina, etc., no se observa efecto negativo alguno, en el sentido de que la NRG-1 beta-ECD no reduce la actividad de los animales de test por debajo de los niveles de control de vehículo.
- 20

Ejemplo 4

Esquizofrenia: Inhibición del Prepulso

25 Los roedores con NRG-1 se desactivada exhiben una inhibición del prepulso (PPI) significativamente deteriorada que relaciona NRG-1 con la esquizofrenia. Una medida sustitutiva ampliamente utilizada de la psicosis en modelos animales, la PPI está considerada como un endofenotipo de esquizofrenia. Se informó que existen efectos neurofisiológicos de mutaciones de sentido erróneo de un polimorfismo de nucleótidos simples no sinónimos localizados en NRG1 (rs3924999) en la PPI después de determinación extensa del genotipo, en ambas poblaciones esquizofrénicas y sanas de control (Hong et al. 2007). Se testó el efecto de NRG-1 beta-ECD sobre la PPI. Los resultados encontrados hasta ahora pueden resumirse como sigue:

30 A 105 dB, NRG-1 beta-ECD exhibía una tendencia general hacia el restablecimiento de la PPI (+26%, +23% y +36%, a 150, 300 y 600 ng/kg respectivamente), aunque el efecto no alcanzaba significación estadística y no se observaba a 115 dB. La misma no tenía efecto alguno sobre los movimientos espontáneos en ausencia de estímulo a 150 ó 300 ng/kg, pero reducía significativamente los movimientos espontáneos en ausencia de estímulo a 600 ng/kg (-20% y -29%, por término medio e intensidades pico respectivamente, $p < 0,05$, lo que es similar al efecto de aripiprazol). NRG-1 beta-ECD no tenía efecto alguno sobre la reacción al prepulso sola.

35

Los resultados obtenidos hasta ahora sugieren la ausencia de efectos significativos sobre los déficits de PPI inducidos por apomorfina para Propisi100 en el intervalo de dosis 150-300 ng/kg y una disminución de los movimientos espontáneos así como cierta tendencia hacia el restablecimiento de la PPI a 600 ng/kg i.v. en el Test de Inhibición del prepulso (PPI) en la rata (déficits inducidos por apomorfina).

40 En esta serie de experimentos, la sustancia de referencia, aripiprazol, tenía actividad débil pero significativa a 3 mg/kg i.p., pero no a 10 mg/kg i.p., en el mismo test.

En conjunto y en las condiciones utilizadas, NRG-1 beta-ECD parece afectar a la PPI a mayores concentraciones próximas a 600 ng/kg. Estos resultados abren sorprendentemente una nueva comprensión de la investigación neurológica reciente que implica (NRG1) como uno de los genes candidatos líderes en la esquizofrenia.

Ejemplo 5

Aprendizaje y memoria en un modelo animal para enfermedad de Alzheimer (ratones APPPS dt)

50 Los experimentos con animales para testar el aprendizaje y la memoria con o sin aplicación del dominio extracelular soluble de Neuregulina-1 β (NRG-1 beta-ECD) en un montaje de laberinto de agua de Morris arriba descrito para ratones normales, se han repetido para un modelo de ratón doblemente transgénico para la amiloidosis cerebral (ratones APPPS (Meyer-Luehmann et al. 2006; Radde et al. 2006)).

Nuevamente en este caso, aquellos animales que se trataron con una dosis diaria de NRG-1 beta-ECD (en este caso se aplicaron 200 ng/kg i.p.) 30 min antes del entrenamiento se comportaban significativamente mejor que el grupo tratado con vehículo en los parámetros relacionados con el aprendizaje.

5 La Neurregulina no sólo mejoraba el aprendizaje, sino que los animales tratados habían desarrollado también estrategias de búsqueda más avanzadas: más animales tratados entraban en el área interior de la piscina (12 frente a 7, $p = 0,009$), las entradas al área interior se producían con mayor frecuencia (2,0 frente a 0,7 veces, $p = 0,03$), el tiempo invertido y la distancia recorrida en la zona interior eran mayores (5,3 s frente a 2,1 s, $p = 0,09$ y 0,7 m frente a 0,3 m, $p = 0,025$, respectivamente).

10 Los resultados de los experimentos de aprendizaje con el modelo de ratón APPPS de amiloidosis cerebral y enfermedad de Alzheimer en un laberinto de agua de Morris se resumen en la Figura 4.

Ejemplo 6

Modelo de Neurregulina-1 beta en la enfermedad de Parkinson del ratón inducida por MPTP

Métodos:

15 Se utilizaron ratones macho C57Bl/6 de 10 semanas en el modelo MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) para la enfermedad de Parkinson.

Se disecciona el tejido cerebral (Sustancia Negra, Cuerpo Estriado, Córtex) de ratones macho de 10 semanas C57Bl/6 (N = 10 por grupo) en momentos diferentes después del tratamiento (0, 1, 3, 7, 21 días) con NaCl (controles) o con MPTP (modelos agudo y subcrónico). Los métodos siguen procedimientos publicados (Hoglinger et al. 2007; Hoglinger et al, 2004).

Tratamiento	Tiempo después de la inyección de MPTP				
	0 días	1 día	3 días	7 días	21 días
MPTP agudo	N=10	N=10	N=10	N=10	N=10
MPTP crónico	N=10	N=10	N=10	N=10	N=10
NaCl	N=10				

20 Total: N = 110

25 Se disuelve MPTP en forma de polvo en NaCl al 0,9% y se inyecta por vía intraperitoneal (aplicación aguda: 4 x 20 mg/kg, cada una con intervalos de 2 horas; aplicación crónica: 5 x 30 mg/kg; cada una a intervalo de 24 horas). Estas inyecciones duran aproximadamente 10 segundos, y los animales se sacrifican en momentos definidos (véase la tabla) por dislocación cervical. Los procedimientos siguen protocolos publicados (Hoglinger et al. 2007; Hoglinger et al, 2004; Liberatore et al. 1999; Przedborski y Vila 2003; Vila y Przedborski 2003).

- 0 días después de la última administración de MPTP: Pérdida de nervios dopaminérgicos estriados
- 1 día después de la última administración de MPTP: Comienzo de la activación de la microglía
- 3 días después de la última administración de MPTP: Activación máxima de la microglía
- 7 días después de la última administración de MPTP: Máximo de la activación de los astrocitos
- 21 días después de la última administración de MPTP: Máximo de muerte celular

30 Veintiún días después de la infusión intracerebral de NRG-1 beta-ECD y un péptido de control por bombas Alzet Mini, seguida por tratamiento con MPTP (agudo frente a crónico), se realizó una cuantificación histológica de neuronas dopaminérgicas del cerebro medio de acuerdo con principios estereológicos. Asimismo, se realiza una cuantificación bioquímica de dopamina y sus metabolitos en el cuerpo estriado por HPLC. Los procedimientos se realizan de acuerdo con protocolos publicados (Hoglinger et al. 2007; Hoglinger et al, 2004).

Tratamiento	Infusión	N
MPTP agudo	NRG-1 beta-ECD	N=10
Control agudo	NRG-1 beta-ECD	N=10
MPTP crónico	NRG-1 beta-ECD	N=10

Control crónico	NRG-1 beta-ECD	N=10
MPTP agudo	Péptido de control	N=10
Control agudo	Péptido de control	N=10
MPTP crónico	Péptido de control	N=10
Control crónico	Péptido de control	N=10

Total: N = 80

Resultados:

5 Como se muestra en la Figura 5, los resultados de las medidas por HPLC de dopamina y sus metabolitos revelan un efecto claro de la administración de NRG-1 beta-ECD durante la agresión por MPTP, en este modelo para la enfermedad de Parkinson.

10 Los efectos son no-clásicos: mientras que no se produce efecto significativo alguno en los niveles de dopamina, ni durante la agresión con MPTP ni en los controles agudos o crónicos de administración de NRG-1 beta-ECD, existen efectos pronunciados y claros sobre las concentraciones de DOPAC y HVA. La administración crónica de NRG-1 beta-ECD da como resultado una reducción clara y significativa de este metabolito en ausencia de agresión con MPTP, mientras que en el régimen agudo se observa solamente una ligera disminución. Durante la afeción crónica de la agresión con MPTP, NRG-1 beta-ECD causa un aumento significativo de ácido homovanílico (HVA), un efecto que es aún más pronunciado en ausencia de agresión con MPTP.

15 Estos resultados pueden interpretarse por una regulación decreciente de MAO-B durante la administración crónica de NRG-1 beta-ECD y/o regulación creciente de COMT. En las condiciones aplicadas, se observó un efecto positivo enorme e importante sobre la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas. NRG-1 beta-ECD es también acusadamente neuroprotector en este modelo. Dada la inyección ip durante esta serie de experimentos, la eficiencia clara demuestra también una vez más que NRG-1 beta-ECD es sumamente eficiente en el paso a través de la barrera hematoencefálica.

20 La Figura 6 muestra el esquema metabólico que parece verse afectado por la administración de NRG-1 beta-ECD: la dopamina es convertida por MAO-B en DOPAC y por COMT en 3-MT; subsiguientemente se genera ácido homovanílico a partir de ambos metabolitos por COMT a partir de DOPAC y por MAO-B a partir de 3-MT; la administración de NRG-1 beta-ECD está regulando obviamente las actividades de ambas enzimas.

25 Aún más importante y como se muestra en la Figura 7, el modelo MPTP de la enfermedad de Parkinson se observa un efecto neuroprotector claro y significativo de NRG-1 beta-ECD que se hace evidente por cuantificación histológica de neuronas dopaminérgicas en el cerebro medio. El método estereológico ha sido descrito en otro lugar (Liberatore et al., 1999, Przedborski & Vila, 2003; Vila & Przedborski, 2003; Hoglinger et al., 2004; Hoglinger et al., 2007).

30 Considerado en su conjunto, existe un efecto neuroprotector sorprendentemente claro y beneficioso en el modelo animal MPTP de la enfermedad de Parkinson: los efectos demuestran una vez más que la administración intraperitoneal de concentraciones muy bajas de NRG-1 beta-ECD (v.g. 20 ng/kg) es suficiente para conseguir eficacia y por tanto que la NRG-1 beta-ECD atraviesa la barrera hematoencefálica. Asimismo, la influencia del complejo sobre los metabolitos de dopamina (resultados de HPLC; Figura 5) apunta a la regulación de MAO-B y COMT por NRG-1 y NRG-1 beta-ECD.β

Ejemplo 7

Identificación de una isoforma de NRG-1 beta-ECD ácida posterior a la traducción como principio activo

35 Los autores de la invención han publicado la evidencia de que en el aprendizaje y la memoria una isoforma ácida particular posterior a la traducción de NRG-1 beta-ECD es la forma activa (Schillo et al., 2005a). En este caso se demuestra que se observan patrones similares en modelos animales de la enfermedad de Alzheimer y tejido cerebral post-mortem de pacientes de la enfermedad de Alzheimer y de Parkinson. Se llega a la conclusión de que esta isoforma ácida es el principio activo.

Métodos:

Para tinción de las transferencias Western se utilizaron los anticuerpos siguientes: policlonal de conejo anti-NRG1-ECD (sc-28916 lote: I 2905 Santa Cruz; H-210)

Neurregulina-1 (H-210) es un anticuerpo policlonal de conejo generado contra los aminoácidos 21-230 que mapean

dentro de un dominio extracelular N-terminal de la isoforma de Neurregulina-1 HRG- α de origen humano. La Neurregulina-1 (H-210) está recomendada para la detección de las isoformas de Neurregulina-1 HRG- α , HRG- α 1A, HRG- α 2B, HRG- α 3, HRG- β 1, HRG- β 2, HRG- β 3 (GGF), GGF2 y SMDF de ratón, de rata y de origen humano por Transferencia Western (dilución inicial 1:200, intervalo de dilución 1:100-1:1000), inmunoprecipitación [1-2 μ g por 100-500 μ g de proteína total (1 ml de lisado de células)] e inmunofluorescencia (dilución inicial 1:50, intervalo de dilución 1:50-1:500).

Los anticuerpos secundarios fueron:

HRP anti-cabra,
 Lote sc-2922: C1405 Santa Cruz
 HRP anti-conejo,
 Lote sc-2054: G2005 Santa Cruz

A continuación de la inmunotinción se realizó espectrometría de masas MALDI-TOF y Q-TOF para confirmar NRG-1 beta-ECD.

Se encuentra ahora un patrón muy similar en el modelo de ratón APPPS de amiloidogénesis cerebral y enfermedad de Alzheimer como se muestra en la Figura 8. La concentración de esta isoforma ácida particular de NRG-1 beta-ECD a un pl aproximado de 5,0 es considerablemente mayor en los ratones tratados con APPPS que son al mismo tiempo aprendices mejores.

En la Figura 8 se muestran dos imágenes representativas de cada uno de un animal tratado, de buen aprendizaje (superior) y un animal sin tratar con eficiencia de aprendizaje inferior (abajo).

La Figura 9 muestra los resultados de un experimento de transferencia Western utilizando material cortical post-mortem de cada uno de 9 pacientes de Alzheimer y controles de la misma edad. La figura revela claramente que el fragmento NRG-1 β -ECD es significativamente menos abundante en los casos de Alzheimer. Como control interno se midió la abundancia de NRG-12, que parece no verse afectada por la pérdida de memoria asociada con la enfermedad.

Una investigación ulterior de esta isoforma específica de NRG-1 β -ECD asociada con Alzheimer y con la memoria por transferencias Western de genes bidimensionales (2D-PAGE) del mismo material de cerebro humano post-mortem utilizado para la Figura 9, revela, como se muestra por ejemplos representativos en la Figura 10, que es realmente la isoforma ácida de NRG-1 β -ECD la que se encuentra disminuida en la afección del Alzheimer.

Conclusiones

Se presenta aquí por primera vez la evidencia funcional de los efectos in vivo de modificaciones posteriores a la traducción del transcrito del gen nrg-1, en particular una forma truncada generada por escisión proteolítica, que comprende el dominio extracelular de NRG-1 beta con PM 15-35, pl 4-10; más específicamente, se encontró una actividad antipsicótica en modelos animales de esquizofrenia, basada probablemente en la regulación de MAO-B y COMT, a concentraciones de 5-600 ng/kg (i.v.). En contraste con los neurolepticos de control que se utilizan a concentraciones que son 100-1000 veces mayores, no se observó efecto negativo alguno.

Se encontró además un efecto neuroprotector en el modelo MPTP de la enfermedad de Parkinson a concentraciones de 3-300 ng/kg (i.v.).

Adicionalmente, se encontró un efecto positivo sobre la memoria y el aprendizaje en los modelos animales respectivos (laberinto de agua de Morris) para el aprendizaje y la amiloidosis cerebral y enfermedad de Alzheimer.

Dados los efectos adversos de muchos antipsicóticos atípicos, actualmente en uso (Haddad y Sharma 2007) se deduce que el fragmento soluble de NRG-1-ECD con dominios EGF de SMDF, NRG-1 alfa, pero en particular NRG-1 beta podría ser útil como medicación sola o co-medicación para el tratamiento de la esquizofrenia, el trastorno bipolar y la depresión.

El mismo podría utilizarse también en el mismo sentido en otras enfermedades del sistema nervioso central, como trastornos neurodegenerativos semejantes a las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, ictus, y lesiones traumáticas del cerebro y la médula espinal.

Las proteínas solubles NRG-1-ECD tienen estos efectos muy amplios debido a un papel central en la transducción de señales neuronales, en particular la mediación de la señalización y excitotoxicidad del glutamato, que juega un papel central en todas las indicaciones arriba mencionadas (Schrattenholz y Soskic 2006).

Referencias

1. Arnold SE, Talbot K, Hahn CG (2005) Neurodevelopment, neuroplasticity, and new genes for schizophrenia. *Prog Brain Res* 147:319-345
- 5 2. Bao J, Lin H, Ouyang Y, Lei D, Osman A, Kim TW, Mei L, Dai P, Ohlemiller KK, Ambron RT (2004) Activity-dependent transcription regulation of PSD-95 by neuregulin-1 and Eos. *Nat Neurosci* 7:1250-1258
- 10 3. Benzel I, Bansal A, Browning BL, Galwey NW, Maycox PR, McGinnis R, Smart D, St CD, Yates P, Purvis I (2007) Interactions among genes in the ErbB-Neuregulin signalling network are associated with increased susceptibility to schizophrenia. *Behav Brain Funct* 3:31
- 15 4. Bertram I, Bernstein HG, Lendeckel U, Bukowska A, Dobrowolny H, Keilhoff G, Kanakis D, Mawrin C, Bielau H, Falkai P, Bogerts B (2007) Immunohistochemical evidence for impaired neuregulin-1 signaling in the prefrontal cortex in schizophrenia and in unipolar depression. *Ann N Y Acad Sci* 1096:147-156
- 20 5. Blackwood DH, Pickard BJ, Thomson PA, Evans KL, Porteous DJ, Muir WJ (2007) Are some genetic risk factors common to schizophrenia, bipolar disorder and depression? Evidence from DISC1, GRIK4 and NRG1. *Neurotox Res* 11:73-83
- 25 6. Boissier JR, Simon P (1966) [On the potentiation of DOPA effects by monoamine oxidase inhibitors]. *Psychopharmacologia* 8:428-436
7. Britsch S (2007) The neuregulin-I/ErbB signaling system in development and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 190:1-65
8. Buonanno A, Fischbach GD (2001) Neuregulin and ErbB receptor signaling pathways in the nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 11:287-296

9. Buresova O, Krekule I, Zahalka A, Bures J (1985) On-demand platform improves accuracy of the Morris water maze procedure. *J Neurosci Methods* 15:63-72
- 5 10. Costall B, Hui SC, Naylor RJ (1978) Modulation of amphetamine hyperactivity by DPI injected into rat nucleus accumbens [proceedings]. *Br J Pharmacol* 64:461P
11. Eilam R, Pinkas-Kramarski R, Ratzkin BJ, Segal M, Yarden Y (1998) Activity-dependent regulation of Neu differentiation factor/neuregulin expression in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1888-1893
- 10 12. Esper RM, Pankonin MS, Loeb JA (2006) Neuregulins: versatile growth and differentiation factors in nervous system development and human disease. *Brain Res Brain Res Rev* 51:161-175
- 15 13. Falquet L, Pagni M, Bucher P, Hulo N, Sigrist CJ, Hofmann K, Bairoch A (2002) The PROSITE database, its status in 2002. *Nucleic Acids Res* 30:235-238
14. Farmer A, Elkin A, McGuffin P (2007) The genetics of bipolar affective disorder. *Curr Opin Psychiatry* 20:8-12
15. Fischbach GD (2007) NRG1 and synaptic function in the CNS. *Neuron* 54:495-497
- 20 16. Geuna S, Nicolino S, Raimondo S, Gambarotta G, Battiston B, Tos P, Perroteau I (2007) Nerve regeneration along bioengineered scaffolds. *Microsurgery* 27:429-438
17. Glabe C (2006) Biomedicine. Avoiding collateral damage in Alzheimer's disease treatment. *Science* 314:602-603
- 25 18. Go RC, Perry RT, Wiener H, Bassett SS, Blacker D, Devlin B, Sweet RA (2005) Neuregulin-1 polymorphism in late onset Alzheimer's disease families with psychoses. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 139:28-32

19. Golub MS, Germann SL, Lloyd KC (2004) Behavioral characteristics of a nervous system-specific erbB4 knock-out mouse. *Behav Brain Res* 153:159-170
- 5 20. Guo WP, Wang J, Li RX, Peng YW (2006) Neuroprotective effects of neuregulin-1 in rat models of focal cerebral ischemia. *Brain Res* 1087:180-185
21. Haddad PM, Sharma SG (2007) Adverse effects of atypical antipsychotics : differential risk and clinical implications. *CNS Drugs* 21:911-936
- 10 22. Hahn CG, Wang HY, Cho DS, Talbot K, Gur RE, Berrettini WH, Bakshi K, Kamins J, Borgmann-Winter KE, Siegel SJ, Gallop RJ, Arnold SE (2006) Altered neuregulin 1-erbB4 signaling contributes to NMDA receptor hypofunction in schizophrenia. *Nat Med* 12:824-828
- 15 23. Hanninen K, Katila H, Saarela M, Rontu R, Mattila KM, Fan M, Hurme M, Lehtimaki T (2007) Interleukin-1 beta gene polymorphism and its interactions with neuregulin-1 gene polymorphism are associated with schizophrenia. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci*
- 20 24. Hoglinger GU, Breunig JJ, Depboylu C, Rouaux C, Michel PP, varez-Fischer D, Boutillier AL, Degregori J, Oertel WH, Rakic P, Hirsch EC, Hunot S (2007) The pRb/E2F cell-cycle pathway mediates cell death in Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:3585-3590
- 25 25. Hoglinger GU, Rizk P, Muriel MP, Duyckaerts C, Oertel WH, Caille I, Hirsch EC (2004) Dopamine depletion impairs precursor cell proliferation in Parkinson disease. *Nat Neurosci* 7:726-735
26. Holbro T, Hynes NE (2004) ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44:195-217
27. Hong LE, Wonodi I, Stine OC, Mitchell BD, Thaker GK (2007) Evidence of Missense Mutations on the Neuregulin 1 Gene Affecting Function of

Prepulse Inhibition. Biol Psychiatry

28. Hu X, Hicks CW, He W, Wong P, Macklin WB, Trapp BD, Yan R (2006) Bace1 modulates myelination in the central and peripheral nervous system. *Nat Neurosci* 9:1520-1525
- 5 29. Karoutzou G, Emrich HM, Dietrich DE (2007) The myelin-pathogenesis puzzle in schizophrenia: a literature review. *Mol Psychiatry*
30. Kwon OB, Longart M, Vullhorst D, Hoffman DA, Buonanno A (2005) Neuregulin-1 reverses long-term potentiation at CA1 hippocampal synapses. *J Neurosci* 25:9378-9383
- 10 31. Li B, Woo RS, Mei L, Malinow R (2007) The neuregulin-1 receptor erbB4 controls glutamatergic synapse maturation and plasticity. *Neuron* 54:583-597
32. Liberatore GT, Jackson-Lewis V, Vukosavic S, Mandir AS, Vila M, McAuliffe WG, Dawson VL, Dawson TM, Przedborski S (1999) Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nat Med* 5:1403-1409
- 15 33. Mathew SV, Law AJ, Lipska BK, Vila-Garcia MI, Zamora ED, Mitkus SN, Vakkalanka R, Straub RE, Weinberger DR, Kleinman JE, Hyde TM (2007) $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor mRNA expression and binding in postmortem human brain are associated with genetic variation in Neuregulin 1. *Hum Mol Genet*
- 20 34. McIntosh AM, Moorhead TW, Job D, Lymer GK, Munoz MS, McKirdy J, Sussmann JE, Baig BJ, Bastin ME, Porteous D, Evans KL, Johnstone EC, Lawrie SM, Hall J (2007) The effects of a neuregulin 1 variant on white matter density and integrity. *Mol Psychiatry*
- 25 35. Meeks TW, Ropacki SA, Jeste DV (2006) The neurobiology of neuropsychiatric syndromes in dementia. *Curr Opin Psychiatry*

19:581-586

36. Meyer-Luehmann M, Coomaraswamy J, Bolmont T, Kaeser S, Schaefer C, Kilger E, Neuenschwander A, Abramowski D, Frey P, Jaton AL, Vigouret JM, Paganetti P, Walsh DM, Mathews PM, Ghiso J, Staufenbiel M, Walker LC, Jucker M (2006) Exogenous induction of cerebral beta-amyloidogenesis is governed by agent and host. *Science* 313:1781-1784
- 5
37. Muller N, Schwarz M (2006) Schizophrenia as an inflammation-mediated dysbalance of glutamatergic neurotransmission. *Neurotox Res* 10:131-148
- 10
38. Nadri C, Belmaker RH, Agam G (2007) Oxygen restriction of neonate rats elevates neuregulin-1alpha isoform levels: Possible relationship to schizophrenia. *Neurochem Int* 51:447-450
39. Owen MJ, Craddock N, Jablensky A (2007) The genetic deconstruction of psychosis. *Schizophr Bull* 33:905-911
- 15
40. Ozaki M, Itoh K, Miyakawa Y, Kishida H, Hashikawa T (2004) Protein processing and releases of neuregulin-1 are regulated in an activity-dependent manner. *J Neurochem* 91:176-188
41. Ozaki M, Sasner M, Yano R, Lu HS, Buonanno A (1997) Neuregulin-beta induces expression of an NMDA-receptor subunit. *Nature* 390:691-694
- 20
42. Pertusa M, Morenilla-Palao C, Carteron C, Viana F, Cabedo H (2007) Transcriptional control of cholesterol biosynthesis in Schwann cells by axonal neuregulin 1. *J Biol Chem*
- 25
43. Przedborski S, Vila M (2003) The 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model: a tool to explore the pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci* 991:189-198
44. Radde R, Bolmont T, Kaeser SA, Coomaraswamy J, Lindau D, Stoltze

- L, Calhoun ME, Jaggi F, Wolburg H, Gengler S, Haass C, Ghetti B, Czech C, Holscher C, Mathews PM, Jucker M (2006) Abeta42-driven cerebral amyloidosis in transgenic mice reveals early and robust pathology. *EMBO Rep* 7:940-946
- 5 45. Rimer M, Barrett DW, Maldonado MA, Vock VM, Gonzalez-Lima F (2005) Neuregulin-1 immunoglobulin-like domain mutant mice: clozapine sensitivity and impaired latent inhibition. *Neuroreport* 16:271-275
- 10 46. Ross CA, Margolis RL, Reading SA, Pletnikov M, Coyle JT (2006) Neurobiology of schizophrenia. *Neuron* 52:139-153
47. Schillo S, Pejovic V, Hunzinger C, Hansen T, Poznanovic S, Kriegsmann J, Schmidt WJ, Schrattenholz A (2005b) Integrative proteomics: functional and molecular characterization of a particular glutamate-related neuregulin isoform. *J Proteome Res* 4:900-908
- 15 48. Schillo S, Pejovic V, Hunzinger C, Hansen T, Poznanovic S, Kriegsmann J, Schmidt WJ, Schrattenholz A (2005a) Integrative proteomics: functional and molecular characterization of a particular glutamate-related neuregulin isoform. *J Proteome Res* 4:900-908
- 20 49. Schrattenholz A, Soskic V (2006) NMDA receptors are not alone: dynamic regulation of NMDA receptor structure and function by neuregulins and transient cholesterol-rich membrane domains leads to disease-specific nuances of glutamate-signalling. *Curr Top Med Chem* 6:663-686
- 25 50. Schubert C (2006) Alzheimer disease: BACE1 branches out. *Nat Med* 12:1123
51. Scolnick EM, Petryshen T, Sklar P (2006) Schizophrenia: do the genetics and neurobiology of neuregulin provide a pathogenesis model? *Harv Rev Psychiatry* 14:64-77

52. Thomson PA, Christoforou A, Morris SW, Adie E, Pickard BS, Porteous DJ, Muir WJ, Blackwood DH, Evans KL (2007) Association of Neuregulin 1 with schizophrenia and bipolar disorder in a second cohort from the Scottish population. *Mol Psychiatry* 12:94-104
- 5 53. Vila M, Przedborski S (2003) Targeting programmed cell death in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 4:365-375
54. Willem M, Garratt AN, Novak B, Citron M, Kaufmann S, Rittger A, Destrooper B, Saftig P, Birchmeier C, Haass C (2006) Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science* 314:664-666
- 10 55. Woo RS, Li XM, Tao Y, Carpenter-Hyland E, Huang YZ, Weber J, Neiswender H, Dong XP, Wu J, Gassmann M, Lai C, Xiong WC, Gao TM, Mei L (2007) Neuregulin-1 enhances depolarization-induced GABA release. *Neuron* 54:599-610
- 15 56. Xie F, Padival M, Siegel RE (2006) Association of PSD-95 with ErbB4 facilitates neuregulin signaling in cerebellar granule neurons in culture. *J Neurochem*
57. Xu Z, Croslan DR, Harris AE, Ford GD, Ford BD (2005a) Extended therapeutic window and functional recovery after intraarterial administration of neuregulin-1 after focal ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*
- 20 58. Xu Z, Croslan DR, Harris AE, Ford GD, Ford BD (2006) Extended therapeutic window and functional recovery after intraarterial administration of neuregulin-1 after focal ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:527-535
- 25 59. Xu Z, Ford GD, Croslan DR, Jiang J, Gates A, Allen R, Ford BD (2005b) Neuroprotection by neuregulin-1 following focal stroke is associated with the attenuation of ischemia-induced pro-inflammatory and stress gene expression. *Neurobiol Dis* 19:461-470

60. Xu Z, Jiang J, Ford G, Ford BD (2004) Neuregulin-1 is neuroprotective and attenuates inflammatory responses induced by ischemic stroke. *Biochem Biophys Res Commun* 322:440-446
- 5 61. Yang XL, Huang YZ, Xiong WC, Mei L (2005) Neuregulin-induced expression of the acetylcholine receptor requires endocytosis of ErbB receptors. *Mol Cell Neurosci* 28:335-346

REIVINDICACIONES

1. Uso de una isoforma recombinante soluble de Neurregulina-1 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la esquizofrenia, en particular aspectos de esquizofrenia relacionados con la cognición, trastorno bipolar y depresión, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, epilepsia, MS, ALS, ictus, lesión traumática cerebral y lesión de la médula espinal, en donde la isoforma de Neurregulina-1 es una isoforma de Neurregulina-1 humana recombinante soluble y en donde la isoforma de Neurregulina-1 tiene un peso molecular de aproximadamente 15 a aproximadamente 35 KD como se mide por SDS-PAGE.
2. El uso de la reivindicación 1, en donde la isoforma de Neurregulina-1 es una isoforma de Neurregulina-1 β , una isoforma de Neurregulina-1 α o una isoforma SMDF, particularmente una isoforma de Neurregulina-1 β .
3. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en donde la isoforma de Neurregulina-1 comprende al menos una porción del dominio extracelular.
4. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la isoforma de Neurregulina-1 tiene un punto isoelectrico (pI) de aproximadamente 4 a aproximadamente 10, con preferencia de aproximadamente 4 a aproximadamente 6.
5. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la isoforma de Neurregulina-1 es un polipéptido modificado, en el cual las modificaciones se seleccionan de fosforilación, glicosilación, metilación, miristoilación, oxidación y cualquier combinación de las mismas.
6. El uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en combinación con un medicamento adicional, en donde el medicamento adicional es preferiblemente un medicamento para el tratamiento de afecciones neurológicas, que se selecciona, v.g., de compuestos que afectan al metabolismo de las catecolaminas, inhibidores de la acetilcolinesterasa, inhibidores de MAO-B o COMT, bloqueadores de canales de tipo memantina, agonistas o antagonistas de los receptores de dopamina o serotonina, inhibidores de la reabsorción de catecolamina o serotonina o cualquier tipo de medicación antipsicótica como clozapina u olanzapina o fármacos similares a gabapentina en los tratamientos de las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, esquizofrenia, trastorno bipolar, deflexión u otras afecciones neurológicas.
7. El uso de la reivindicación 6, en donde el medicamento adicional es un medicamento para el tratamiento de trastornos psicóticos tales como esquizofrenia, trastornos bipolares y depresión, v.g. olanzapina o clozapina, o en donde el medicamento adicional es un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, o en donde el medicamento adicional es un medicamento para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, o en donde el medicamento adicional es un medicamento para el tratamiento de la Esclerosis Múltiple (MS), o en donde el medicamento adicional es un medicamento para el tratamiento de la Esclerosis Amiotrófica Lateral (ALS); o en donde el medicamento adicional es un medicamento para el tratamiento de la epilepsia, o en donde el medicamento adicional es un medicamento para el tratamiento del ictus, o en donde el medicamento adicional es un medicamento para el tratamiento de una lesión traumática cerebral, o en donde el medicamento adicional es un medicamento para el tratamiento de una lesión de la médula espinal.
8. Una composición farmacéutica o kit que comprende:
 - (i) una isoforma de Neurregulina-1 recombinante soluble, en donde la isoforma de Neurregulina-1 es una isoforma de Neurregulina-1 humana recombinante soluble y en donde la isoforma de Neurregulina-1 tiene un peso molecular de aproximadamente 15 a aproximadamente 35 KD como se mide por SDS-PAGE, y
 - (ii) un medicamento adicional particularmente para el tratamiento de afecciones neurológicas.
9. Uso de una isoforma de Neurregulina-1 recombinante soluble, en donde la isoforma de Neurregulina-1 es una isoforma de Neurregulina-1 humana recombinante soluble y en donde la isoforma de Neurregulina-1 tiene un peso molecular de aproximadamente 15 a aproximadamente 35 KD como se mide por SDS-PAGE para la fabricación de un medicamento para mejora de la memoria y la cognición.
10. El uso de la reivindicación 9 para reducir y/o inhibir la pérdida de memoria y cognición asociada con una afección neurológica tal como la enfermedad de Alzheimer.
11. El uso de la reivindicación 9 ó 10, en donde la isoforma de Neurregulina-1 se define como en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7.

Figura 1

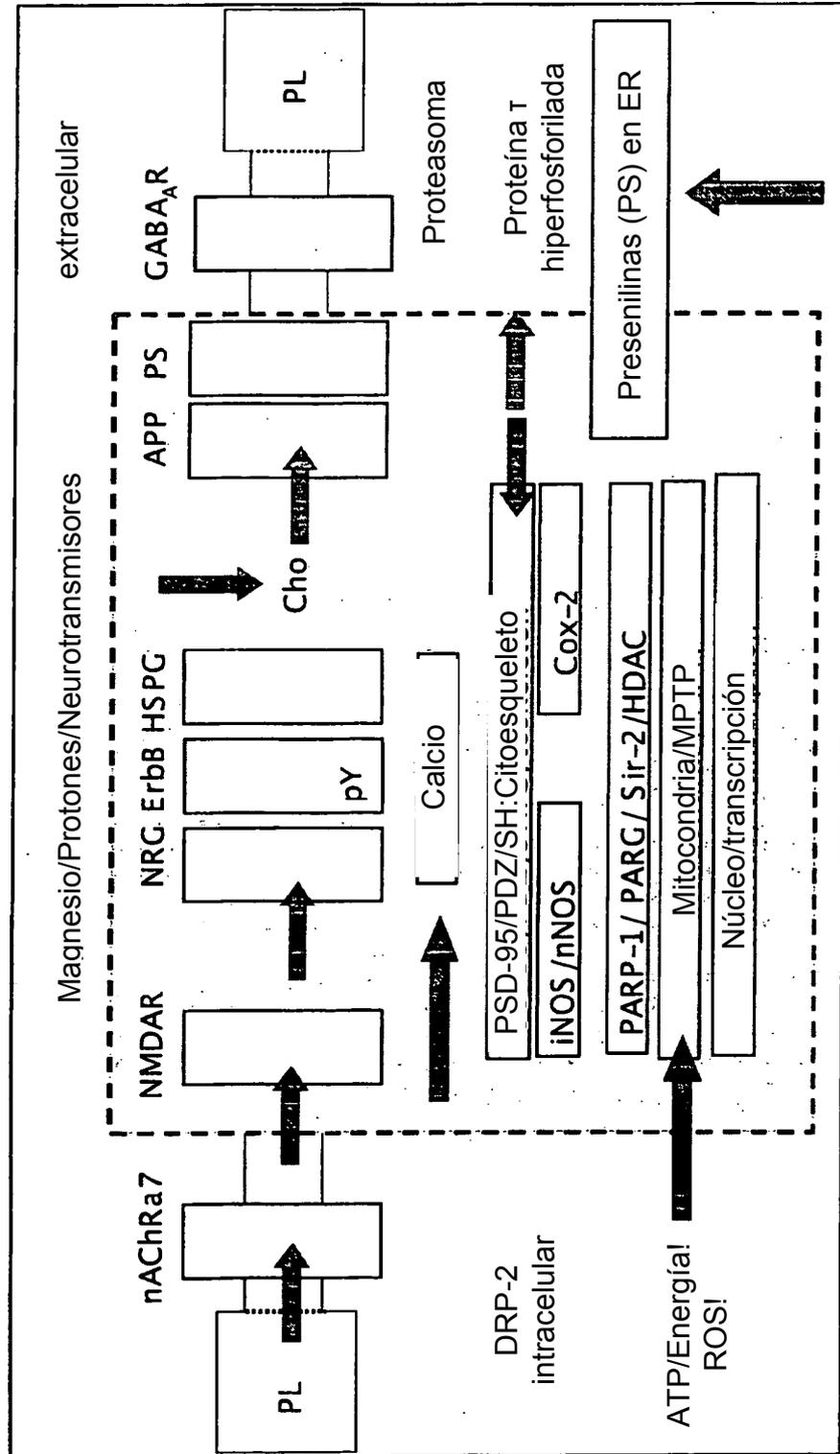


Figura 2

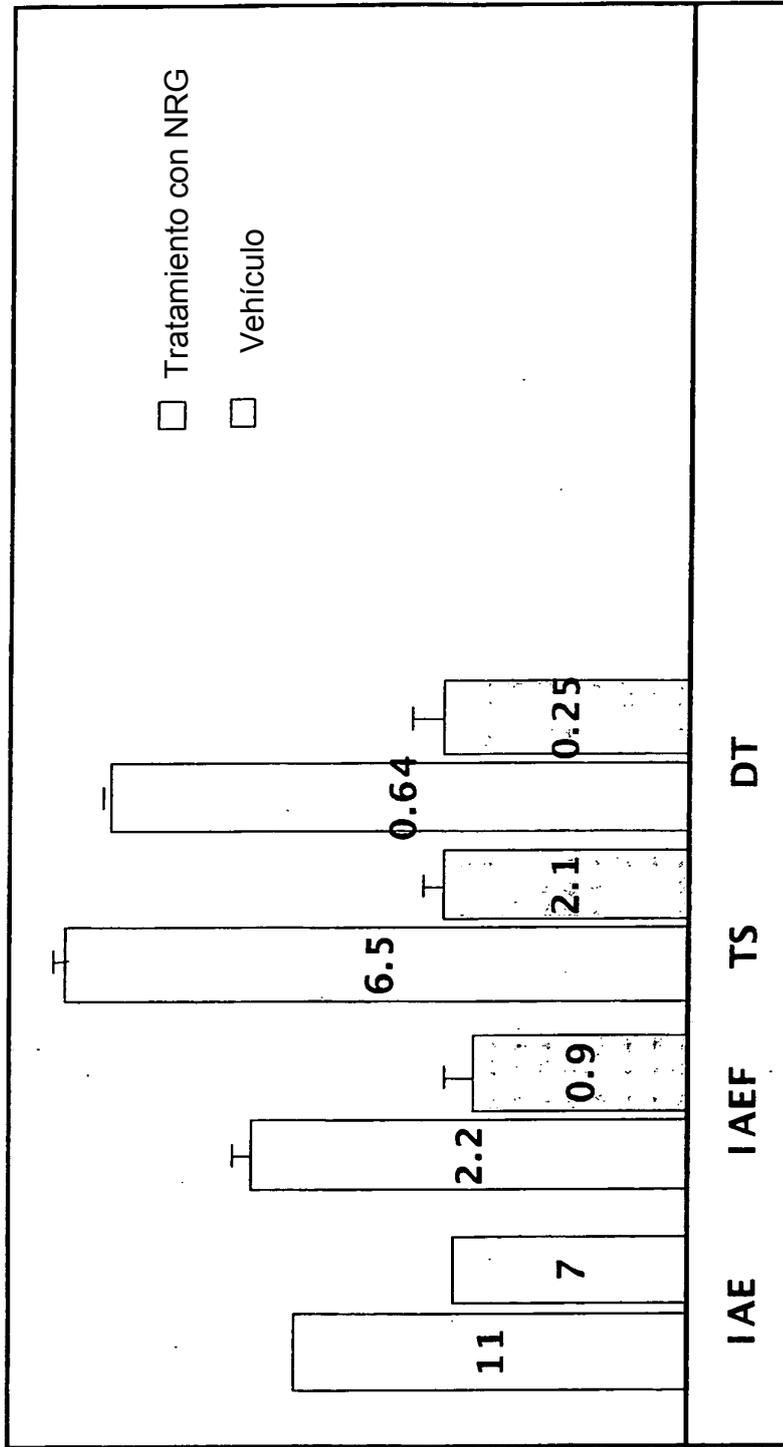


Figura 3

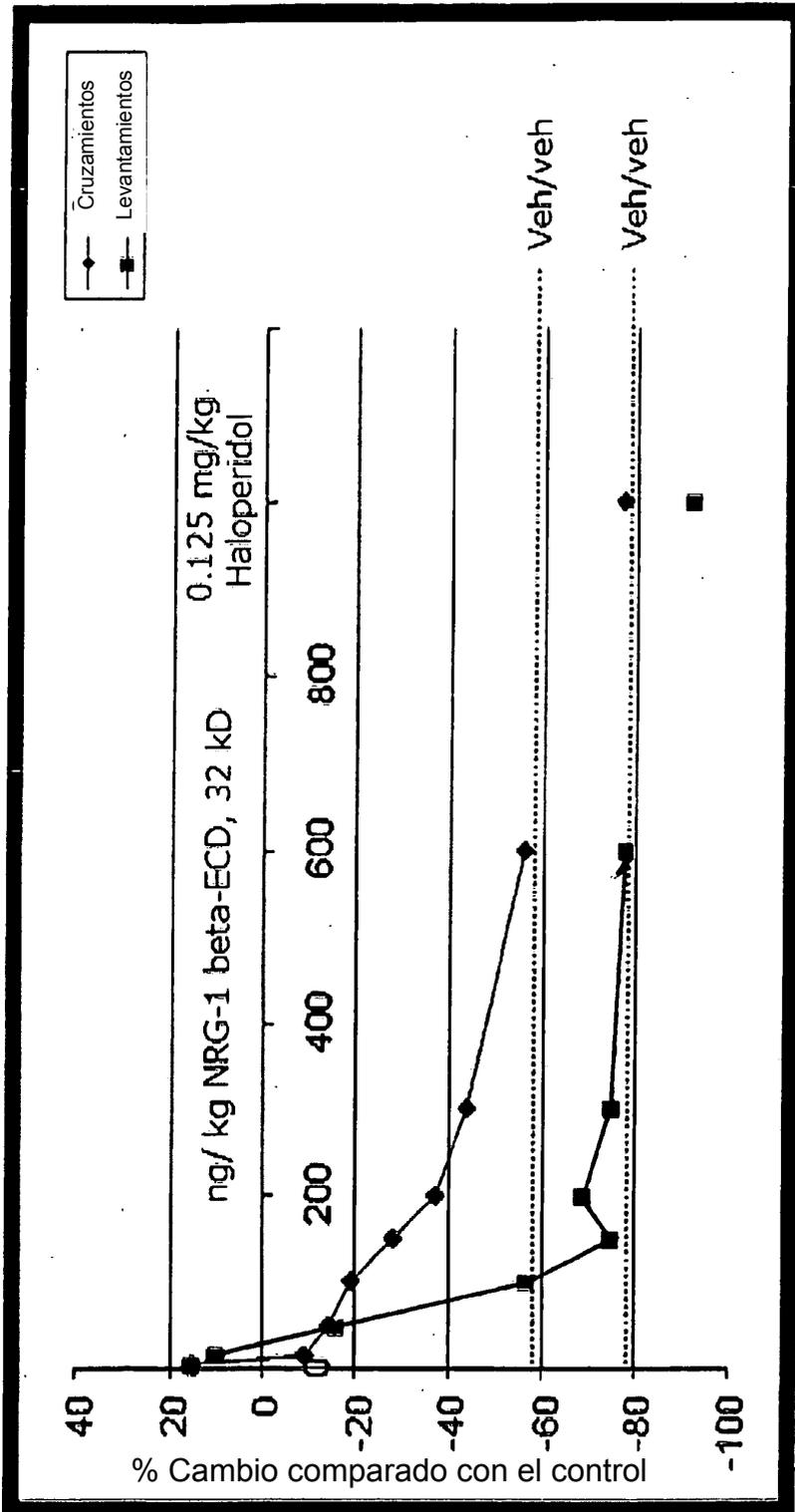


Figura 4

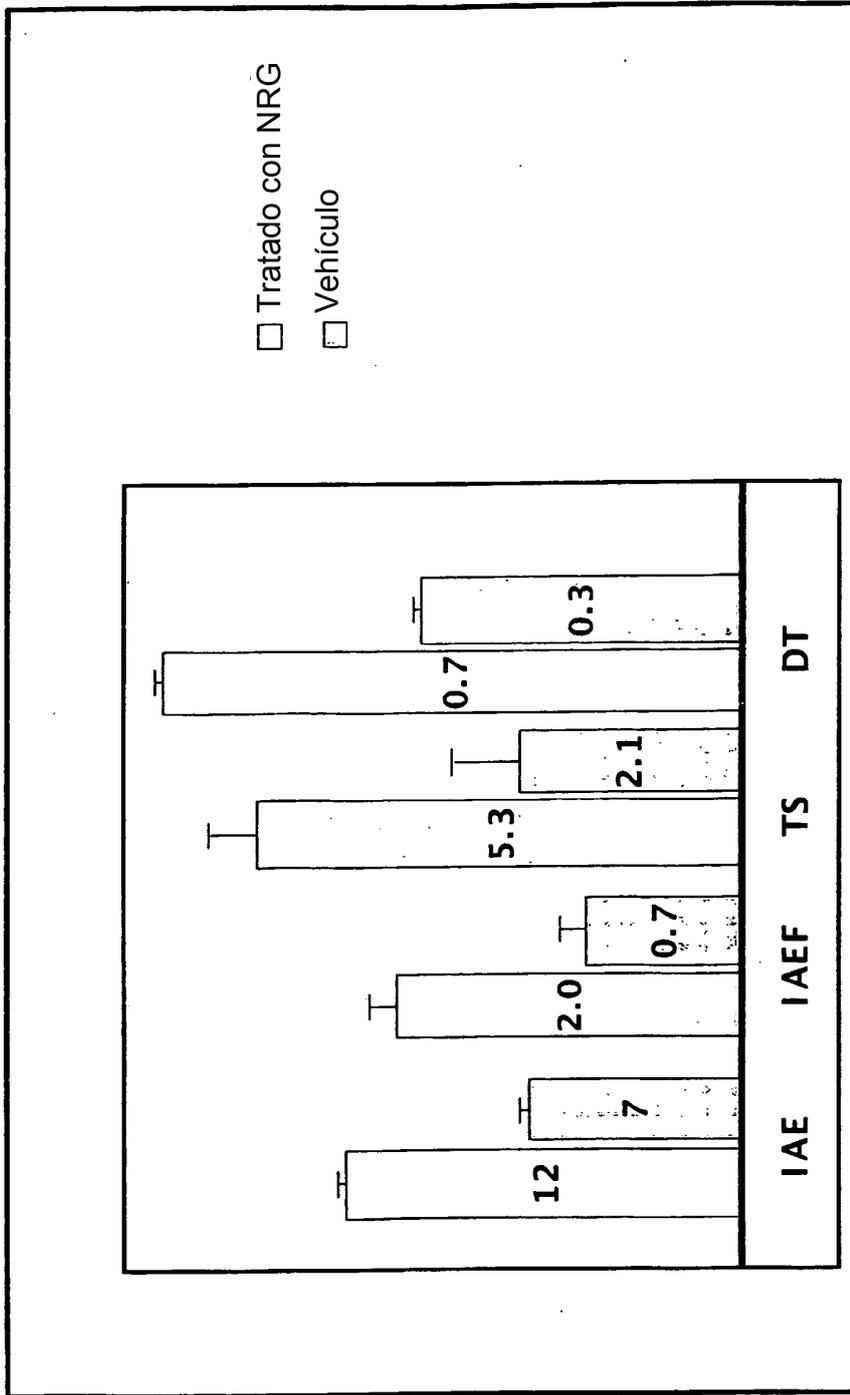


Figura 5

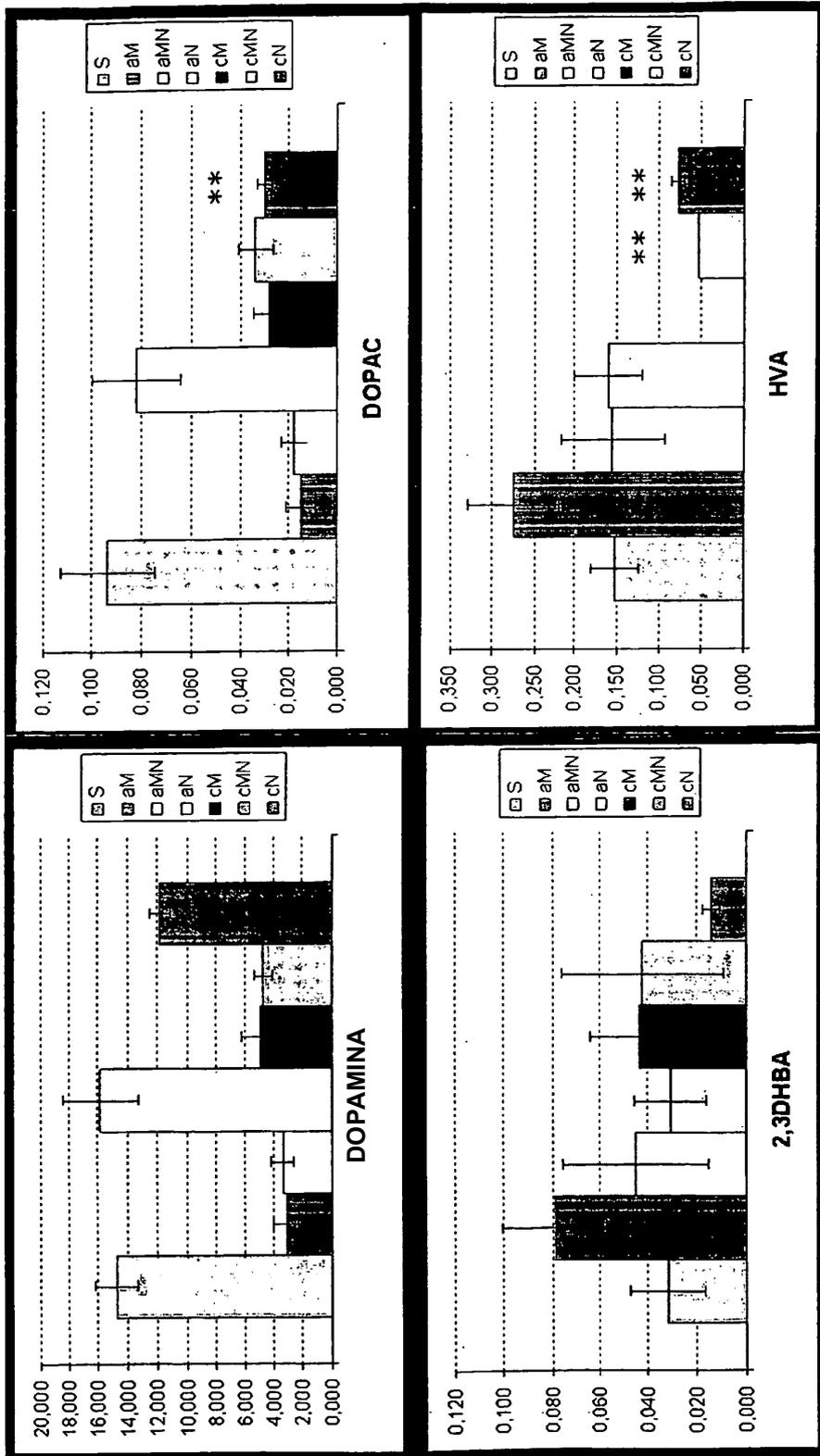


Figura 6

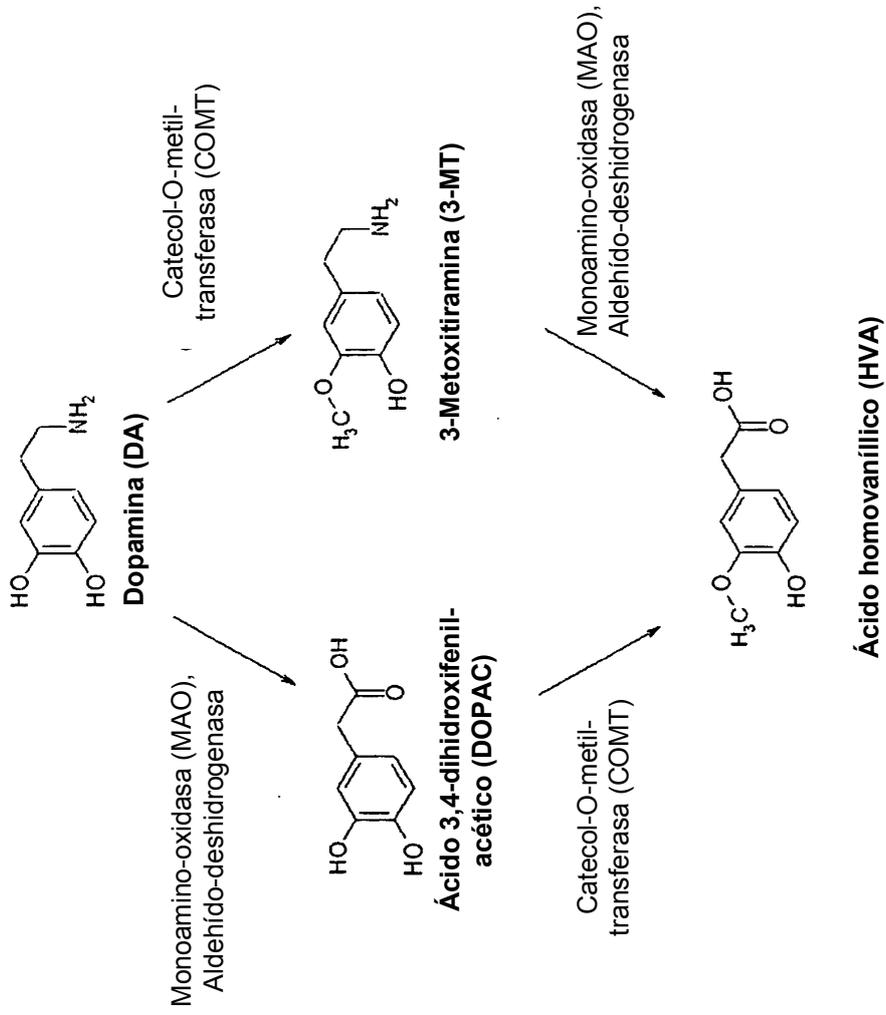


Figura 7

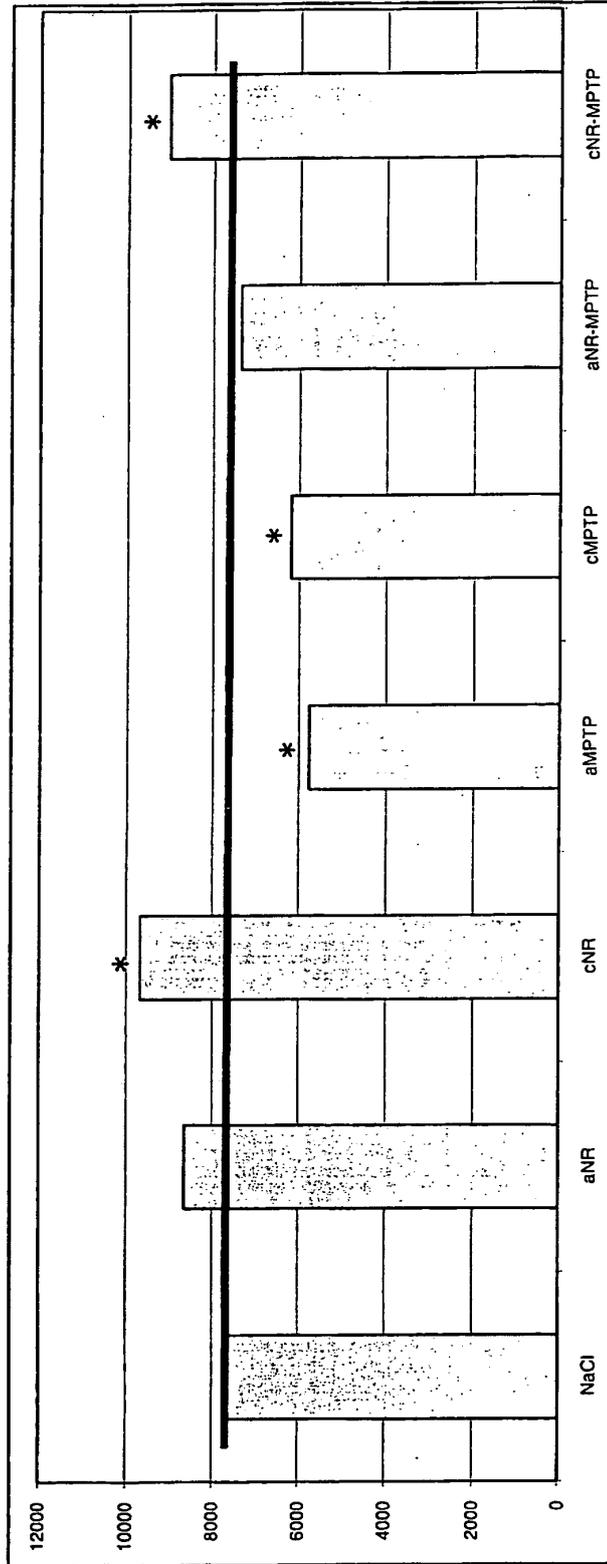


Figura 8

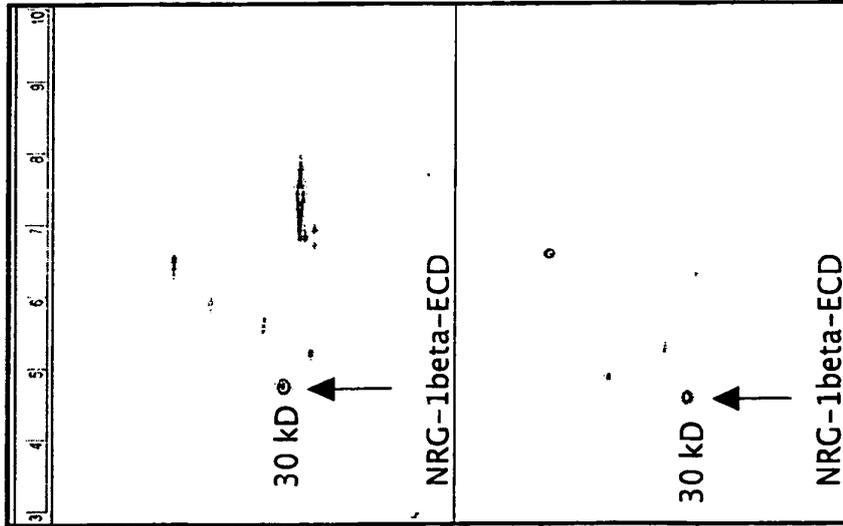


Figura 9

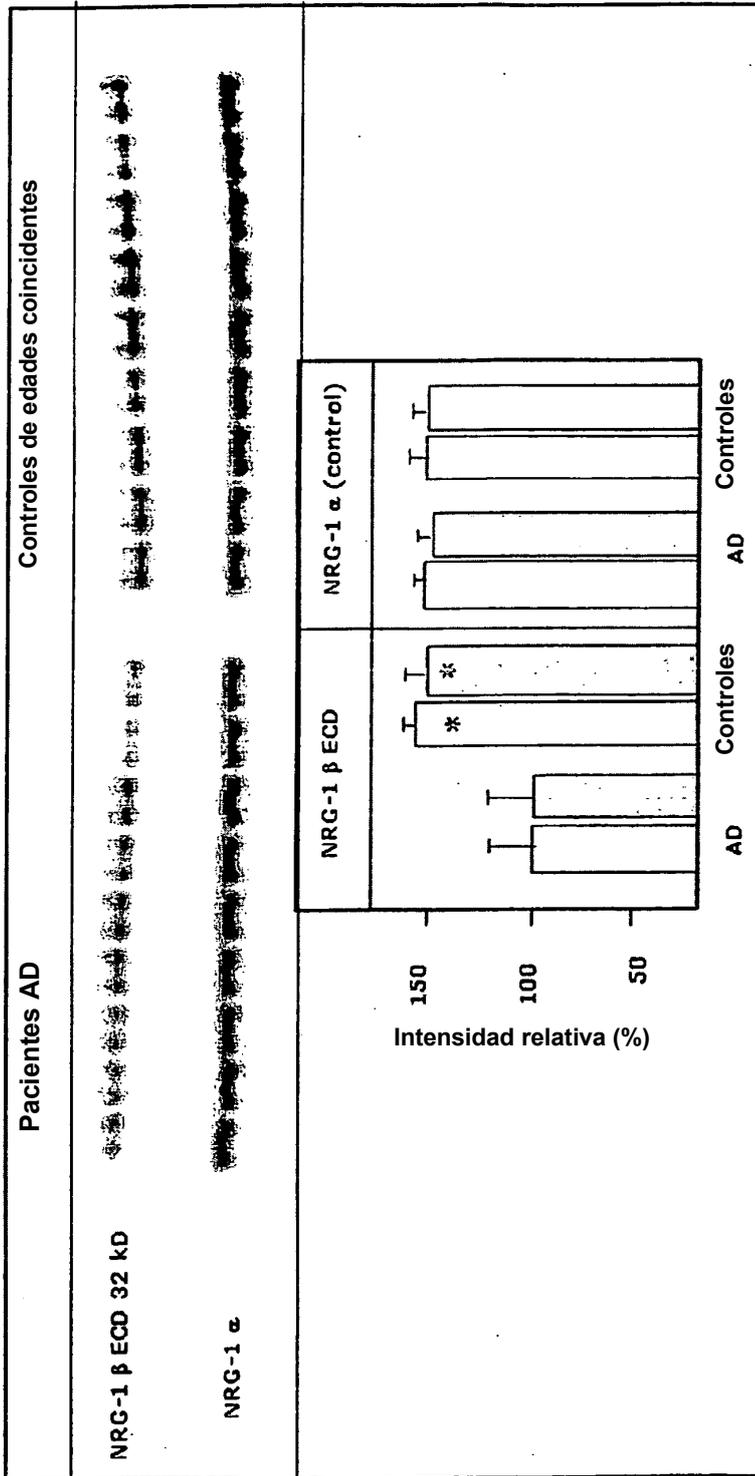


Figura 10

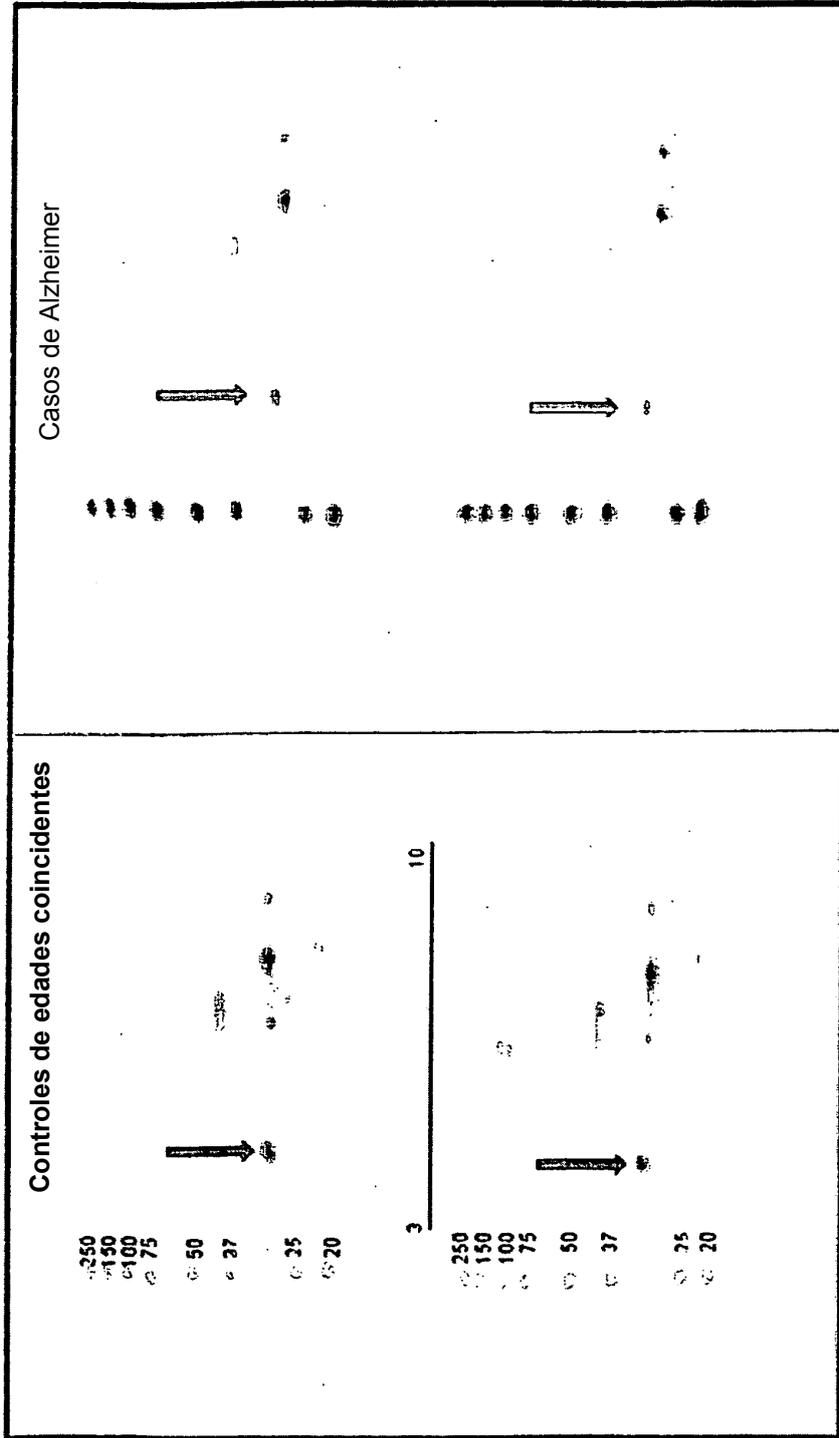


Figura 11

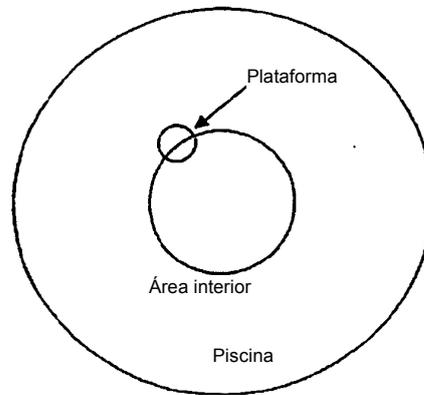


Figura 12

