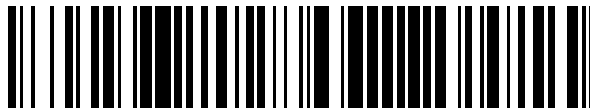


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 927**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.08.2009 PCT/US2009/004692**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.02.2010 WO10019275**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.08.2009 E 09806990 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2328606**

54 Título: **Composiciones y métodos para tratamientos durante periodos no agudos después de lesiones neurológicas del SNC**

30 Prioridad:

15.08.2008 US 189191 P

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

25.04.2017

73 Titular/es:

**ACORDA THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
420 Saw Mill River Road
Ardsley, NY 10502, US**

72 Inventor/es:

**CAGGIANO, ANTHONY y
IACI, JENNIFER**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 609 927 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

Composiciones y métodos para tratamientos durante periodos no agudos después de lesiones neurológicas del SNC

Campo de la invención

5 El campo de la invención se refiere al tratamiento de las lesiones neuronales del sistema nervioso central. Más específicamente, la invención se refiere a la administración de una neuregulina [por ejemplo, el factor de crecimiento glial 2 (GGF2)] a un sujeto durante el período no agudo o crónico siguiente a una lesión traumática neuronal.

Antecedentes de la invención

10 Las lesiones del sistema nervioso central (SNC) son un grave problema de salud. Esta categoría de lesiones incluye eventos tales como la lesión isquémica, lesión hemorrágica, traumatismo penetrante y traumatismo no penetrante. Las lesiones del SNC en general no se curan completamente dejando al sujeto con algún grado de disfunción permanente que va desde muy leve a la muerte. La disfunción residual puede incluir alteraciones motoras, sensoriales, cognitivas, emocionales y autonómicas.

15 Una categoría clave de las lesiones neuronales del SNC comprende la lesión cerebral. La lesión cerebral es una enfermedad devastadora que da lugar a un cierto grado de incapacidad permanente incluyendo déficits motores, sensoriales y cognitivos e inestabilidad emocional, tal como el trastorno de estrés postraumático, trastorno del déficit de atención, depresión y labilidad emocional. Las causas comunes de las lesiones cerebrales incluyen el accidente cerebrovascular isquémico, accidente cerebrovascular hemorrágico, hematoma subdural, hematoma epidural, lesión en la cabeza (aceleración/deceleración, conmoción cerebral y de rotación), lesión cerebral penetrante (heridas de bala y otros proyectiles).

20 El accidente cerebrovascular es la tercera causa más importante de muerte y la principal causa de discapacidad en el mundo occidental. El accidente cerebrovascular, por lo tanto, presenta una gran carga socioeconómica. La etiología de un accidente cerebrovascular puede ser isquémico, que es el caso en la mayoría de los accidentes cerebrovasculares, o hemorrágico. Un accidente cerebrovascular isquémico puede ser causado por un coágulo que se forma en otra parte en el cuerpo y se desplaza a través del torrente sanguíneo al cerebro (accidente cerebrovascular embólico) o por un coágulo de sangre que se forma dentro de la arteria del cerebro (accidente cerebrovascular trombótico). Después de la muerte celular masiva en el núcleo del infarto inmediato, debido a la falta de glucosa y oxígeno, el área del infarto se expande durante días, debido a mecanismos secundarios tales como la excitotoxicidad del glutamato, los mecanismos de apoptosis, y la generación de radicales libres. Después de las lesiones neuronales (por ejemplo, un evento isquémico) los animales y las personas pueden recuperar la función durante varios días, semanas y meses sin ningún tipo de terapéutica. Con demasiada frecuencia, sin embargo, esta recuperación es sólo parcial, y los animales y las personas sufren de incapacidad permanente, lo que puede incluir déficits en las funciones motoras, sensoriales y cognitivas.

35 Los factores de riesgo que aumentan la probabilidad en un individuo de que tenga un derrame cerebral son bien conocidos. Estos incluyen, pero no se limitan a, los factores de riesgo que no se pueden cambiar: la edad avanzada, herencia, raza, género, antecedentes de accidente cerebrovascular o ataque al corazón; y los factores de riesgo que se pueden cambiar, tratar o controlar: presión arterial alta, el tabaquismo, la diabetes mellitus, enfermedad de la carótida u otras arterias, la fibrilación auricular, otras enfermedades cardíacas, enfermedad de células falciformes, el colesterol alto, la mala alimentación y la inactividad física y la obesidad.

40 Hasta la fecha, el tratamiento no paliativo del accidente cerebrovascular isquémico se limita a los productos terapéuticos administrados en la fase aguda después de la apoplejía. La fase aguda ocupa el intervalo desde el momento del inicio de la lesión neuronal (por ejemplo, el derrame cerebral) a aproximadamente seis horas después de la lesión neuronal. La fase aguda es seguida de una fase semi-aguda, que se encuentra en el intervalo de aproximadamente seis horas a dos días después de la lesión neuronal. De acuerdo con esto, los actuales agentes terapéuticos no paliativos se utilizan en un intento de revertir la oclusión del flujo de sangre, restaurar la oxigenación del cerebro y limitar la extensión de la estructura del cerebro perdido. Aparte de tPA para el uso agudo, no hay medicamentos aprobados para el tratamiento de accidentes cerebrovasculares. Los pacientes permanecen con algún nivel de disfunción que, en el mejor de los casos, puede mejorar algo endógenamente durante aproximadamente 60 días. Esta recuperación sólo puede ser aumentada por terapias físicas. Desafortunadamente, muchos pacientes se quedan con discapacidad permanente con poca esperanza de mejora.

50 En la actualidad, el único fármaco aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para el tratamiento del accidente cerebrovascular isquémico es el activador del plasminógeno tisular (tPA). El tPA es una serina proteasa que convierte el plasminógeno en plasmina. La plasmina, a continuación, rompe la fibrina, que es un componente de los coágulos que obstruyen los vasos en el cerebro y causan los accidentes cerebrovasculares. Se administra idealmente en menos de tres horas desde el inicio de los síntomas. En general, sólo del 3% al 5% de las personas que sufren un accidente cerebrovascular llegan al hospital a tiempo para ser considerados para este tratamiento. Lo ideal sería que el tPA se administrara en las primeras tres horas después de la oclusión, pero se puede administrar por algunos clínicos más tarde, hasta seis horas después de la oclusión. Por desgracia, la gran mayoría de los pacientes que sufren un accidente cerebrovascular no llegan a tiempo al hospital para ser

considerados para este tratamiento. Para aquellos pacientes que llegan al hospital dentro de la ventana temporal eficaz, el tPA se administra en un intento de revertir la oclusión del flujo de sangre, restaurar la oxigenación del cerebro y limitar la extensión de la estructura del cerebro perdido. Sin embargo, hay algunas contraindicaciones importantes que limitan el uso continuo de tPA. Después de un período inicial de aproximadamente 3 a 6 horas, a lo sumo, el tPA puede causar sangrado intracerebral y accidente cerebrovascular hemorrágico. Por tales razones, el tPA se limita a la administración durante la fase aguda con el fin de alcanzar cualquier eficacia terapéutica.

Hasta la fecha ninguna otra terapia ha sido aprobada para el tratamiento del accidente cerebrovascular. Otras terapias experimentales tales como la pro-uroquinasa administrada por vía intraarterial están bajo investigación como medios potenciales para interrumpir la formación de coágulos y restaurar el flujo sanguíneo. La literatura científica ha descrito, sin embargo, muchos agentes que han demostrado ser beneficiosos para la protección de la masa cerebral y la restauración de la función en modelos animales experimentales de accidente cerebrovascular. Todos estos agentes se centran en la reducción de la muerte celular aguda, la inflamación y la apoptosis y deben, por lo tanto, ser administrados en cuestión de horas (algunos en hasta 24 horas) después del evento isquémico. Hasta ahora, en general se acepta que el tratamiento de las lesiones del SNC, tales como el accidente cerebrovascular, se requiere en la forma aguda. (Abe et al., 2008, *J Cereb Blood Flow Metab.* Jul 23, epub antes de imprenta, Sun et al, 2008, *Stroke* Jul 10, epub antes de imprenta, páginas aún no disponibles); Dohare et al., 2008, *Behav Brain Res.* 193(2): 289-97; Belayev et al, 2001, *Stroke* 32 (2): 553-60).

Tales agentes no han demostrado, sin embargo, que limiten el daño al cerebro, restaurar su función o mejorar la recuperación después del accidente cerebrovascular cuando se administran después de un tiempo de retraso de varias horas, a lo sumo en algunos modelos animales experimentales aproximadamente un día después del accidente cerebrovascular. El único tratamiento conocido que muestra eficacia en días y semanas después de un accidente cerebrovascular es el paliativo o de rehabilitación, tal como la terapia ocupacional o física. De hecho, los presentes inventores no conocen ningún agente o fármaco que haya demostrado que mejora a los días o las semanas de recuperación después del accidente cerebrovascular.

Después de una oclusión aguda, a menudo hay un área localizada de masa de cerebro destruida que se encuentra rodeada por una zona de penumbra que morirá en unas horas si la circulación no se restaura. El tiempo hasta la muerte de esta zona de penumbra puede extenderse en unas pocas horas en modelos experimentales con neuroprotectores, tales como los antagonistas de NMDA, antagonistas del calcio, eliminadores de radicales y agentes de captura, agentes anti-apoptóticos, inhibidores de caspasas, inhibidores de PARP, etc. Para este fin, un "neuroprotector" es algo que puede salvar a las neuronas antes de que mueran por la variedad de accidentes que se les presentan en la fase aguda. Después de 24 a 48 horas, sin embargo, hay pocas esperanzas de proteger a las células de la muerte necrótica y, mientras, la muerte apoptótica continúa durante varios días (véase la Figura 1, la ventana terapéutica para las terapias anti-apoptóticas no ha demostrado ser mucho más amplia que para las terapias de protección agudas) [Schulz et al., 1998, *Cell Death Differ.* 5(10): 847-57; Komjati et al., 2004, *Int J Mol Med.* 13(3): 373-82].

La neuregulina presenta propiedades neuroprotectoras que, al igual que otros agentes descritos anteriormente, han mostrado un beneficio en la reducción de la discapacidad vista si se administra a los animales en cuestión de horas después del accidente cerebrovascular. Véase la solicitud de patente estadounidense con número de serie 09/530.884.

En vista de la prevalencia de las lesiones neuronales, particularmente con respecto a los accidentes cerebrovasculares, hay una necesidad de agentes terapéuticos que se puedan administrar eficazmente a los sujetos para limitar el daño al cerebro, restaurar la función y/o mejorar la recuperación después de una lesión neuronal.

Las neuregulinas (NRG) y los receptores de las NRG comprenden un sistema de tirosina quinasa del receptor del factor de crecimiento para la señalización célula-célula que está implicado en la organogénesis en los nervios, músculos, epitelios, y otros tejidos (Lemke, *Mol. Cell. Neurosci.* 7: 247-262, 1996 y Burden et al, *Neuron* 18: 847-855, 1997). La familia NRG consta de cuatro genes que codifican numerosos ligandos que contienen el factor de crecimiento epidérmico (EGF), la inmunoglobulina (Ig), y otros dominios reconocibles. Numerosas isoformas secretadas y unidas a la membrana funcionan como ligandos en este sistema de señalización. Los receptores para los ligandos de NRG son todos los miembros de la familia del receptor de EGF (EGFR), e incluyen EGFR (o ErbB1), ErbB2, ErbB3, y ErbB4, también conocido como de HER1 a HER4, respectivamente, en los seres humanos (Meyer et al., *Development* 124: 3575-3586, 1997; Orr-Urtreger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1867-1871, 1993; Marchionni et al, *Nature* 362: 312-8, 1993; Chen et al., *J. Comp. Neurol.* 349: 389-400, 1994; Corfas et al, *Neuron* 14: 103- 115, 1995; Meyer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1064-1068, 1994; y Pinkas-Kramarski et al, *Oncogene* 15: 2803-2815, 1997).

Los cuatro genes de NRG, NRG-1, NRG-2, NRG-3, y NRG-4, se asignan a distintos loci cromosómicos (Pinkas-Kramarski et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9387-91, 1994; Carraway et al., *Nature* 387: 512-516, 1997; Chang et al., *Nature* 387: 509-511, 1997; y Zhang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 9562-9567, 1997), y colectivamente codifican un conjunto diverso de proteínas NRG. Los productos de los genes de NRG-1, por ejemplo, comprenden un grupo de aproximadamente 15 isoformas distintas estructuralmente relacionadas (Lemke, *Mol. Cell. Neurosci.* 7: 247-262, 1996 y Peles and Yarden, *BioEssays* 15: 815-824, 1993). Las primeras isoformas identificadas de NRG-1

incluían el factor de diferenciación Neu (NDF; Peles et al., Cell 69, 205-216, 1992 y Wen et al., Cell 69, 559-572, 1992), Heregulina (HRG; Holmes et al, Science 256: 1205-1210, 1992), receptor de acetilcolina que induce actividad (ARIA; Falls et al., Cell 72: 801-815, 1993), y los factores de crecimiento glial GGFL, GGF2, y GGF3 (Marchionni et al., Nature 362: 312-8, 1993).

5 El gen NRG-2 se identificó mediante clonación por homología (Chang et al., Nature 387: 509-512, 1997; Carraway et al, Nature 387: 512-516, 1997; y Higashiyama et al, J. Biochem 122: 675-680, 1997) y por medio de enfoques genómicos (Busfield et al, Mol Cell. Biol. 17: 4007-4014, 1997). Los NRG-2 ADNc también se conocen como activador neural y derivado del timo de ErbB quinasas (NTAK; N° entrada de Genbank AB005060), divergente de neuregulina (Don-1) y el factor de crecimiento derivado de cerebelo (CDGF; solicitud PCT WO 97/09425). La evidencia experimental muestra que las células que expresan ErbB4 o la combinación ErbB2/ErbB4 son propensas a mostrar una respuesta especialmente robusta frente a NRG-2 (Pinkas-Kramarski et al., Mol. Cell. Biol. 18: 6090-6101, 1998). El producto del gen NRG-3 (Zhang et al., Supra) también es conocido por unirse y activar los receptores de ErbB4 (Hijazi et al., Int. J. Oncol. 13: 1061-1067, 1998).

15 Un dominio del tipo EGF está presente en el núcleo de todas las formas de NRG, y es necesario para unirse y activar los receptores de ErbB. Las secuencias de aminoácidos deducidas de los dominios tipo EGF codificados en los tres genes son aproximadamente del 30 al 40% idénticas (comparaciones por parejas). Además, parece que hay al menos dos sub-formas de dominios tipo EGF en NRG-1 y NRG-2 que pueden conferir diferentes actividades biológicas y potencias específicas de tejido.

20 Las respuestas celulares frente a NRG están mediadas por las tirosinas quinasas EGFR del receptor de NRG, ErbB2, ErbB3, y ErbB4 de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico. La unión de alta afinidad de todas las NRG está mediada principalmente ya sea a través de ErbB3 o de ErbB4. La unión de los ligandos de NRG conduce a la dimerización con otras subunidades de ErbB y a la transactivación por fosforilación en residuos de tirosina específicos. En ciertos parámetros experimentales, casi todas las combinaciones de los receptores ErbB parecen ser capaces de formar dímeros en respuesta a la unión de las isoformas de NRG-I. Sin embargo, parece que ErbB2 es una pareja de dimerización preferida que puede desempeñar un papel importante en la estabilización del complejo ligando-receptor. ErbB2 no se une al ligando por sí mismo, sino que debe ser emparejado de forma heteróloga con uno de los otros subtipos de receptores. ErbB3 no posee actividad tirosina quinasa, pero es una diana para la fosforilación por los otros receptores. La expresión de NRG-I, ErbB2, ErbB4 se sabe que es necesaria para la trabeculación del miocardio ventricular durante el desarrollo del ratón.

30 Sumario de la invención

La presente invención proporciona un polipéptido que comprende un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico (tipo EGF) para su uso en el tratamiento de:

35 (i) una lesión neuronal a un mamífero, en donde el polipéptido que comprende un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico (tipo EGF) se administra después de una lesión neuronal en dicho mamífero; y en donde la administración se inicia después de la ventana semi-aguda después de la lesión neuronal;

(ii) una lesión neuronal a un mamífero, en donde el polipéptido que comprende un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico (tipo EGF) se administra después de una lesión neuronal en dicho mamífero; la administración se inicia en menos de seis horas después de la lesión neuronal; y la administración continúa en un periodo de tiempo de más de 72 horas después de la lesión;

40 (iii) una lesión neuronal isquémica del sistema nervioso central en un mamífero, en donde el péptido se administra después de una lesión neuronal en dicho mamífero; y la administración se inicia después de que el mamífero ha alcanzado un volumen completo de muerte celular por lesión isquémica después de la lesión; o

45 (iv) una lesión neuronal a un mamífero, en donde el polipéptido que comprende un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico (tipo EGF) se administra después de una lesión neuronal en dicho mamífero; y en donde la administración se inicia durante la ventana semi-aguda y después todavía continúa, después de la lesión neuronal,

en donde el dominio tipo EGF es codificado por el gen de la neuregulina (NRG)-1, gen (NRG)-2, gen (NRG)-3 o gen (NRG)-4.

También se proporciona el uso de un polipéptido que comprende un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico (tipo EGF) en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de:

50 (i) una lesión neuronal a un mamífero, en donde el polipéptido que comprende un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico (tipo EGF) se administra después de una lesión neuronal en dicho mamífero; y en donde la administración se inicia después de la ventana semi-aguda después de la lesión neuronal;

(ii) una lesión neuronal a un mamífero, en donde el polipéptido que comprende un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico (tipo EGF) se administra después de una lesión neuronal en dicho mamífero; la administración se inicia

en menos de seis horas después de la lesión neuronal; y la administración continúa en un periodo de tiempo de más de 72 horas después de la lesión; o

5 (iii) una lesión neuronal isquémica del sistema nervioso central en un mamífero, en donde el péptido se administra después de una lesión neuronal en dicho mamífero; y la administración se inicia después de que el mamífero ha alcanzado un volumen completo de muerte celular por lesión isquémica después de la lesión; o

(iv) una lesión neuronal a un mamífero, en donde el polipéptido que comprende un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico (tipo EGF) se administra después de una lesión neuronal en dicho mamífero; y en donde la administración se inicia durante la ventana semi-aguda y después todavía continúa, después de la lesión neuronal,

10 en donde el dominio tipo EGF es codificado por el gen de la neuregulina (NRG)-1, gen (NRG)-2, gen (NRG)-3, gen (NRG)-4.

La presente invención se basa en la observación de que los beneficios de la terapia de un polipéptido que contiene un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico (tipo EGF) codificado por el gen de la neuregulina (NRG)-1, gen (NRG)-2, gen (NRG)-3, gen (NRG)-4 se pueden lograr administrando una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido a un mamífero. En una realización de la invención, el tratamiento se inicia después de la ventana semi-aguda después de la lesión. En una realización de la invención, el tratamiento se inicia durante la ventana semi-aguda y después todavía continúa, después de la lesión.

20 De acuerdo con esto, puede administrarse al mamífero un polipéptido (o ácido nucleico que codifica el mismo) que contiene un dominio de tipo EGF codificado por el gen de neuregulina (NRG)-1, gen (NRG)-2, gen (NRG)-3, gen (NRG)-4 a partir del día 1, 2 ó 3, incluso hasta e incluyendo los días 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 días; una semana o más de una semana, dos semanas o más de dos semanas después de la lesión neuronal; tres semanas o más de tres semanas después de la lesión neuronal; cuatro semanas o más de cuatro semanas después de la lesión neuronal; un mes o más de un mes después de la lesión neuronal; dos meses o más de dos meses después de la lesión neural; tres meses o más de tres meses después de la lesión neural; cuatro meses o más de cuatro meses después de la lesión neural; cinco meses o más de cinco meses después de la lesión neural; seis meses o más de seis meses después de la lesión neural.

Véanse las Figuras 6A-6D para las secuencias de aminoácido y ácido nucleico de GGF2 humanas de cadena completa, una isoforma de NRG-1.

En un aspecto de la invención, los mamíferos adecuados incluyen ratones, ratas, conejos, perros, monos o cerdos. En una realización más particular de la invención, el mamífero es un ser humano.

30 Definiciones:

Tal como se utiliza en este documento, el término "aproximadamente" incluye el valor especificado en más o menos el 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15% del valor especificado. En una realización, "aproximadamente" significa el 98-102% del valor especificado. En una realización, "aproximadamente" significa el 95-105% del valor especificado.

35 Después de la lesión, la "fase aguda" oscila desde el momento del inicio de la lesión neuronal (por ejemplo, el accidente cerebrovascular) a aproximadamente seis horas después de la lesión neuronal. La fase aguda es seguida por la "fase semi-aguda", que va de aproximadamente seis horas a dos días después de la lesión neuronal. En una realización, la "fase semi-aguda" varía de unas seis horas a tres días después de la lesión neuronal. El periodo posterior a la fase semi-aguda se conoce como la "fase crónica" después de la lesión neuronal. La fase post-aguda incluye tanto los periodos semi-agudos como crónicos después de la lesión.

40 Por "dominio tipo factor de crecimiento epidérmico" o "dominio tipo EGF" se entiende un motivo de polipéptido codificado por el gen NRG-1, NRG-2, o NRG-3 que se une y activa ErbB2, ErbB3, ErbB4, o combinaciones de los mismos, y tiene una similitud estructural con el dominio de unión al receptor EGF como se describe en Holmes et al, Science 256: 1205-1210, 1992; patente de EE.UU. N° 5.530.109; patente de EE.UU. N° 5.716.930; patente de EE.UU. N° 7.037.888; Hijazi et al., Int. J. Oncol. 13: 1061-1067, 1998; Chang et al., Nature 387: 509-512, 1997; Carraway et al., Nature 387: 512- 516, 1997; Higashiyama et al., J Biochem. 122: 675-680, 1997; y el documento WO 97/09425). Véanse las Figuras 7-12 para las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos correspondientes a los dominios EGFL 1-6 codificados por el gen NRG-1.

50 Por "vector de expresión" se quiere decir un plásmido o virus modificado por ingeniería genética, derivado de, por ejemplo, un bacteriófago, adenovirus, retrovirus, poxvirus, herpesvirus, o cromosoma artificial, que se utiliza para transferir una secuencia de codificación de un polipéptido (por ejemplo, una neuregulina), unido operativamente a un promotor, en una célula huésped, de manera que el péptido codificado o polipéptido se expresa en la célula huésped.

55 Los términos "lesión neuronal" y " lesión" se usan indistintamente en el presente documento, "neurotraumatismo" es una realización de una "lesión neuronal" y puede generalmente ser considerado como un sinónimo. Una "lesión

neuronal" es una lesión que causa cierto grado de destrucción o muerte del tejido neurológico. Una lesión neuronal tiene generalmente como secuelas cierta pérdida, por ejemplo, una disminución de la función mental, sensorial o muscular.

5 Un "neuroprotector" es algo que puede salvar a las neuronas que mueren antes de la variedad de insultos que se presentan en la fase posterior a una lesión aguda o semi-aguda. Después de una oclusión aguda, a menudo hay un área localizada de materia del cerebro destruida que se encuentra rodeada por una zona de penumbra que morirá en unas horas si la circulación no se restaura. El tiempo hasta la muerte de esta zona de penumbra puede extenderse por unas pocas horas en modelos experimentales con "neuroprotectores", tales como los antagonistas de NMDA, antagonistas del calcio, eliminadores de radicales y agentes de captura, anti-apoptóticos, inhibidores de caspasas, inhibidores de PARP, etc. Para este fin, un "neuroprotector" es algo que puede salvar a las neuronas antes que mueran por la variedad de insultos que se les presentan en la fase aguda.

Por "neuregulina" o "NRG" se entiende un polipéptido que está codificado por un gen NRG-1, NRG-2, NRG-3 o NRG-4 o ácido nucleico (por ejemplo, un cDNA), y que se une y activa los receptores EGFR, ErbB1, ErbB2, ErbB3, o ErbB4, o combinaciones de los mismos.

15 Por "neuregulina-1", "NRG-1", "heregulina", "GGF2," o "ligando p185erbB2" se entiende un polipéptido que se une al receptor ErbB2 y está codificado por el gen del ligando p185erbB2 descrito en la patente de EE.UU. N° 5.530.109; patente de EE.UU. N° 5.716.930; y la patente de EE.UU. No. 7.037.888. La unión al receptor erbB2 puede ser indirecta a través del emparejamiento heterólogo del receptor erbB2 a erbB1, erbB3 o erbB4.

20 Por "polipéptido tipo neuregulina" se entiende un polipéptido que posee un dominio tipo EGF codificado por un gen de neuregulina, y que se une y activa EGFR, ErbB1, ErbB-2, ErbB-3, ErbB-4, o una combinación de los mismos. La unión al receptor erbB2 puede ser indirecta, a través del emparejamiento heterólogo del receptor erbB2 a erbB1, erbB3 o erbB4.

25 Tal como se utiliza en este documento, la expresión "recuperación neuronal" se utiliza para referirse al proceso mediante el cual el sistema nervioso restaura su funcionamiento hacia un estado normal después de una lesión, enfermedad, infección u otra interrupción del sistema nervioso, el cerebro, la médula espinal o los nervios periféricos.

30 Por "unido operativamente" se entiende que un ácido nucleico que codifica un polipéptido (por ejemplo, un ADNc) y una o más secuencias reguladoras están conectadas de tal manera que permiten la expresión génica cuando las moléculas apropiadas (por ejemplo, las proteínas activadoras de la transcripción) se unen a las secuencias reguladoras.

Como se usa en la presente memoria, "péptido" comprende, consiste esencialmente, o simplemente consiste en un péptido de aproximadamente: 625, 600, 575, 550, 525, 500, 475, 450, 425, 400, 375, 350, 325, 300, 275, 250, 225, 200, 175, 150, 125, 100, 75, 50 o menos de 50 aminoácidos.

35 Por "promotor" se entiende una secuencia mínima suficiente para dirigir la transcripción. También se incluyen en la invención aquellos elementos promotores que son suficientes para hacer controlable la expresión génica dependiente de promotor para el tipo de célula o el estado fisiológico (por ejemplo, hipoxia frente a condiciones de normoxia), o para hacerla inducible por señales o agentes externos; tales elementos pueden estar situados en los extremos 5' o 3' o en las regiones internas del gen nativo.

40 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" pretende significar aquella cantidad de un fármaco o agente farmacéutico que provoca la respuesta biológica o médica de un tejido, un sistema, animal o ser humano que está siendo buscada por un investigador, veterinario, doctor en medicina u otro clínico. Un cambio terapéutico es un cambio en una característica bioquímica que se mide en una dirección esperada para aliviar la enfermedad o afección que se trata. Más particularmente, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad suficiente para disminuir los síntomas asociados a una afección médica o enfermedad, para normalizar las funciones del cuerpo en la enfermedad o trastornos que resultan en la alteración de las funciones corporales específicas, o para proporcionar una mejora en uno o más de los parámetros medidos clínicamente de una enfermedad.

45 Tal como se utiliza en este documento, el término "tratar" significa obtener una recuperación después de una lesión neuronal donde no habría ninguna otra manera; acelerando la velocidad de recuperación natural después de una lesión neuronal; o promoviendo la recuperación a un nivel de funcionamiento más alto. Sin estar ligado a ninguna teoría, en la ventana de después de la lesión crónica no se contempla que habrá capacidad de disminuir la muerte neurológica más, es decir, se entiende que los nervios han muerto cuando se produce la ventana crónica. Sin embargo, el tratamiento también comprende durante el período crónico, por ejemplo, la disminución de una función de disminución o de viabilidad del tejido (por ejemplo, músculo o hueso) que ocurriría de otra manera en el tejido implicado por los nervios comprometidos. Además, el tratamiento comprende durante el período crónico, por ejemplo, disminuir la atrofia (por ejemplo, de músculos o huesos) que ocurriría de otra manera en el tejido implicado por los nervios comprometidos.

Por "célula transformada" se entiende una célula (o un descendiente de una célula) en la que se ha introducido una molécula de ADN que codifica una neuregulina o polipéptido que tiene un dominio tipo EGF de la neuregulina, por medio de técnicas de ADN recombinante o técnicas de terapia génica conocidas.

- 5 A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por los expertos ordinarios en la técnica a la que pertenece esta invención.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un esquema de las fases progresivas siguientes a un accidente cerebrovascular/isquemia. En la figura "OT" indica terapia ocupacional y "PT" indica terapia física.

- 10 La Figura 2 representa las puntuaciones de comportamiento de la extremidad anterior después de una ligadura permanente de la arteria cerebral media. Las ratas se trataron con GGF2, NRG1, FGF, o vehículo tal como se indica. FGF y GGF2 a 100 µg/kg demostraron mejoras significativas en la prueba de comportamiento el Día 21. (¶, +, ¥, * indican significativamente diferentes del vehículo para bFGF, NRG1, GGF2 a 6,5 µg/kg y GGF2 a 100 µg/kg por ANOVA y post-Tukey).

- 15 La Figura 3 representa las puntuaciones de comportamiento de los miembros posteriores siguientes a una ligadura permanente de la arteria cerebral media. Las ratas se trataron con GGF2, NRG1, FGF, o vehículo tal como se indica. GGF2 a 6,5 µg/kg y NRG a 1,0 µg/kg fueron significativamente mejores que el vehículo en las pruebas de comportamiento del Día 7 y 14, pero no en el punto final del estudio en el Día 21. GGF2 a 100 µg/kg y FGF fueron significativamente mejores que el vehículo en todos los puntos de comportamiento después del tratamiento. (¶, +, ¥, *
- 20 * indican significativamente diferentes del vehículo para bFGF, NRG1, GGF2 a 6,5 µg/kg y GGF2 a 100 µg/kg por ANOVA y post-Tukey).

- La figura 4 muestra las puntuaciones del comportamiento del balanceo del cuerpo después de la ligadura permanente de la arteria cerebral media. Las ratas se trataron con GGF2, NRG1, FGF, o vehículo tal como se indica. GGF2 a 100 µg/kg y FGF fueron significativamente mejorados en comparación con el vehículo en el día 21.
- 25 (¶, +, ¥, * indican significativamente diferentes del vehículo para bFGF, NRG1, GGF2 a 6,5 µg/kg y GGF2 a 100 µg/kg por ANOVA de medidas repetidas y post-hoc de Tukey).

- La Figura 5A muestra las puntuaciones del comportamiento de las extremidades anteriores siguientes a una ligadura permanente de la arteria cerebral media. Las ratas se trataron con GGF2 comenzando 1, 3 ó 7 días después de la ligadura. GGF2 fue administrado a 0,1 mg/kg, IV al día durante 10 días. Las puntuaciones del comportamiento de la
- 30 extremidad anterior fueron significativamente mejores que el vehículo con todos los paradigmas de tratamiento en el punto de tiempo día 21. (*, ¥, + indican significativamente diferentes de la del vehículo para los grupos de tratamiento del día 1, 3 y 7, respectivamente por ANOVA de medidas repetidas y post-hoc Tukey).

- La Figura 5B muestra las puntuaciones de comportamiento de los miembros posteriores siguientes a una ligadura permanente de la arteria cerebral media. Las ratas se trataron con GGF2 de partida 1, 3 o 7 días después de la
- 35 ligadura. GGF2 fue administrado a 0,1 mg/kg, IV al día durante 10 días. Las puntuaciones del comportamiento de los miembros posteriores fueron significativamente mejores que el vehículo cuando el tratamiento se inició a 1 o 7 días después de la ligadura, y se mejoraron en comparación con el vehículo con el tratamiento iniciado 3 días después de la ligadura en el punto de tiempo del día 21. (*, ¥, + indican significativamente diferentes del vehículo para los grupos de tratamiento del día 1, 3 y 7, respectivamente, por ANOVA de medidas repetidas y post-hoc de Tukey).

- La figura 5C muestra las puntuaciones del comportamiento del balanceo del cuerpo después de la ligadura permanente de la arteria cerebral media. Las ratas se trataron con GGF2 comenzando 1, 3 ó 7 días después de la
- 40 ligadura. GGF2 fue administrado a 0,1 mg/kg, IV al día durante 10 días. Las puntuaciones del balanceo del cuerpo fueron significativamente mejores que el vehículo cuando se inicia el tratamiento 1 día después de la ligadura, y se mejoraron en comparación con el vehículo con el tratamiento iniciado 3 o 7 días después de la ligadura. (*, ¥, +
- 45 indican significativamente diferentes del vehículo para los grupos de tratamiento del día 1, 3 y 7, respectivamente por ANOVA de medidas repetidas y post-hoc de Tukey).

Las figuras 6A-D muestran las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de longitud completa GGF2.

Las figuras 7-12 muestran las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de los dominios 1-6 tipo factor de crecimiento epidérmico (EGFL).

- 50 La Figura 13 muestra las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos de un péptido tipo factor de crecimiento epidérmico del gen NRG-1.

La Figura 14 muestra las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos del fragmento beta tipo factor de crecimiento epidérmico (EGFL) de NRG-1.

La Figura 15 muestra las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos del fragmento alfa tipo factor de crecimiento epidérmico (EGFL) de NRG-1.

La Figura 16 muestra las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos del fragmento alfa tipo factor de crecimiento epidérmico (EGFL) de NRG-2 alfa.

- 5 La Figura 17 muestra las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos del fragmento alfa tipo factor de crecimiento epidérmico (EGFL) de NRG-2 beta.

La figura 18 muestra las alineaciones de la secuencia de aminoácidos de diversos péptidos tipo EGF. El dominio tipo EGF se puede definir como subdominios de NRG para los que la alineación de secuencias revela al menos 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 o 45% de homología en la secuencia de aminoácidos en comparación con la molécula de EGF humana (secuencia P01133971-1023, en la parte inferior de la alineación en la figura). Los aminoácidos homólogos tienen propiedades estructurales físico-químicas idénticas, conservadas o semi-conservadas y, como se indica mediante los símbolos "*", ":", y ".", respectivamente.

Descripción detallada de la invención

15 Como se indica en el presente documento, el tratamiento no paliativo del accidente cerebrovascular isquémico hasta ahora se ha limitado a productos terapéuticos administrados en la fase aguda después de la apoplejía.

La muerte inmediata celular debido, al menos en parte, a la falta de oxígeno se observa durante la fase aguda. Además, como se muestra en la Figura 1, la oclusión del flujo de sangre da como resultado la liberación de almacenamientos intracelulares de radicales libres, glutamato y de calcio y sodio que se entiende que destruyen el tejido cerebral y amplían el área de la lesión.

20 La fase semi-aguda, de aproximadamente seis horas a dos días (o tres días por algunas definiciones) post-lesión neuronal, se caracteriza por la continua liberación de radicales libres, descarga de glutamato, liberación de calcio y de sodio, privación de oxígeno de la región ocluida, e inmediata muerte celular localizada. Hasta la fecha, no hay agentes clínicamente aprobados conocidos para uso en seres humanos durante la fase semi-aguda después de un accidente cerebrovascular.

25 Como se muestra en la Figura 1, la ventana limitada para la terapia post-lesión neuronal farmacéutica se explica al menos parcialmente por la patofisiología y la progresión temporal de la lesión. En cuestión de minutos, por ejemplo, de una oclusión, las neuronas en el núcleo del infarto se destruyen. A las horas después de la oclusión, los radicales libres, los agentes excitotóxicos e inflamatorios son liberados/producidos y estas moléculas continúan destruyendo el tejido cerebral y ampliando el área de la lesión. La extensión de la lesión puede ser limitada, como se describe anteriormente, mediante la restauración de flujo sanguíneo (utilizando un destructor de coágulos clínicamente aprobado, es decir, tPA) que logra así la re-oxigenación de la zona afectada.

30 Como se indica en la literatura científica, diversos compuestos parecen exhibir eficacia en los períodos agudos y semi-agudos. Sin embargo, después de las marcas a las 24, 36 ó 48 horas posteriores a una lesión neuronal del SNC, las potenciales terapias pierden progresivamente la capacidad de tratar la lesión. De hecho, algunas de las modalidades terapéuticas, tales como tPA, que tienen un efecto en el período agudo, empiezan a tener contraindicaciones graves y potencialmente mortales según pasa el tiempo después de la lesión.

35 Días, semanas o meses después de un evento isquémico, durante la fase crónica después de un accidente cerebrovascular, las terapias deben estar dirigidas a promover la recuperación neuronal. La promoción de la recuperación neuronal después de un evento traumático, tal como un accidente cerebrovascular, en el sistema nervioso central implica claramente diferentes fenómenos fisiológicos y estrategias terapéuticas que se emplean en la ventana pre-crónica. Los tratamientos pre-crónicos generalmente implican agentes que tienen como objetivo restablecer el flujo sanguíneo y reducir la muerte celular aguda. En contraste, un agente terapéutico que puede ser administrado eficazmente a las 48 horas o más, o 72 horas o más después de la lesión se diferencia de la terapéutica de la fase aguda por su capacidad para restaurar la función sin alterar el tamaño de la lesión isquémica.

40 En una realización, el tratamiento comienza esencialmente después de la muerte completa después de la lesión de una lesión isquémica del SNC; por "esencialmente muerte completa después de la lesión de una lesión isquémica del SNC" se pretende la muerte de las células del SNC que son directamente resultantes del evento isquémico; otra muerte celular debido a la edad o a terapias (tanto si la terapia está diseñada para abordar la isquemia, como no) no está dentro del alcance de esta definición.

45 Como se muestra en el presente documento, los presentes inventores demostraron que las neuregulinas son eficaces en la restauración de la función neurológica durante la fase crónica de una lesión neurotraumática. En una realización, la lesión neurotraumática es un accidente cerebrovascular isquémico. Como se describe en el presente documento, los presentes inventores han hecho el sorprendente descubrimiento de que la neuregulina es eficaz cuando se inicia la dosificación durante la fase crónica después de un evento isquémico. Aún más sorprendente es el descubrimiento de que la neuregulina sea eficaz incluso cuando se inicia la dosificación inclusive 7 días después del evento isquémico.

Los presentes datos muestran que los resultados favorables obtenidos no han ocurrido por los mismos mecanismos que se encuentran que son eficaces en el tratamiento post-isquémico inmediato. El tratamiento con neuregulina durante la fase crónica después del accidente cerebrovascular no altera el tamaño de la lesión isquémica (véase la Tabla 1). Esto demuestra claramente que las fases aguda y semi-aguda de la fisiopatología están completas en estas fases, y que la neuregulina que se administra durante la fase crónica está promoviendo la recuperación neuronal, en lugar de establecer la reperfusión y proteger las neuronas.

Tabla 1 Infarto volumen (%)

	bFGF	21,3 ± 3,3
	NRG 1,0 µg/kg	26,8 ± 3,0
5	GGF2 6,5 µg/kg	27,1 ± 3,7
	GGF2 100 µg/kg	26,3 ± 3,5
	Vehículo	25,0 ± 3,5

Composiciones de la invención:

Como se indicó anteriormente, las neuregulinas son polipéptidos codificados por los genes NRG-1, NRG-2, NRG-3 o NRG-4 y poseen dominios tipo EGF que les permiten unirse y activar los receptores ErbB. Holmes et al. (Science 256: 1205-1210, 1992) han demostrado que el dominio tipo EGF solo es suficiente para unirse y activar el receptor p185erbB2. En consecuencia, cualquier producto polipéptido codificado por el gen NRG-1, NRG-2, NRG-3 o NRG-4, o cualquier polipéptido tipo neuregulina, por ejemplo, un polipéptido que tiene un dominio tipo EGF codificado por un gen de neuregulina o ADNc (por ejemplo, un dominio tipo EGF que contiene los subdominios del péptido NRG-1 CC/D o CC/D', como se describe en la patente de EE.UU. Nº 5.530.109, patente de EE.UU. Nº 5.716.930, y patente de EE.UU. Nº 7.037.888; o un dominio tipo EGF como se describe en el documento WO 97/09425) se puede utilizar en los métodos descritos. Una composición de la invención puede estar en forma de dosificación unitaria. Los kits que comprenden las composiciones de la invención y/o las instrucciones de acuerdo con la invención están dentro del alcance de la presente invención también.

Las composiciones de la invención se pueden administrar a los pacientes con un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. La práctica farmacéutica convencional se emplea para proporcionar formulaciones o composiciones para administrar tales composiciones a pacientes o animales de experimentación. Aunque se prefiere la administración intravenosa, se puede emplear cualquier vía de administración apropiada, por ejemplo, parenteral, subcutánea, intramuscular, intracraneal, intraorbital, oftálmica, intraventricular, intracapsular, intraespinal, intracisternal, intraperitoneal, intranasal, aerosol, oral, o transdérmica (por ejemplo, mediante la aplicación de un parche adhesivo que lleve una formulación capaz de atravesar la dermis y entrar en el torrente sanguíneo) o la administración tópica.

Las formulaciones terapéuticas pueden estar en forma de soluciones o suspensiones líquidas; para la administración oral, las formulaciones pueden estar en forma de comprimidos o cápsulas; y para las formulaciones intranasales, en forma de polvos, gotas nasales, o aerosoles. Métodos bien conocidos en la técnica para preparar las formulaciones se encuentran, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences." Las formulaciones para la administración parenteral pueden, por ejemplo, contener excipientes, agua estéril o solución salina, polialquilenglicoles tales como polietilenglicol, aceites de origen vegetal, o naftalenos hidrogenados. Otros sistemas de administración parenteral potencialmente útiles para la administración de moléculas de la invención incluyen partículas de copolímero de etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables, y liposomas. Las formulaciones para inhalación pueden contener excipientes, por ejemplo, lactosa, o pueden ser soluciones acuosas que contienen, por ejemplo, éter de polioxietileno-9-laurilo, glicocolato y desoxicocolato, o pueden ser soluciones oleosas para la administración en forma de gotas nasales, o como un gel.

Con respecto a las inyecciones intravenosas, los niveles de dosis están generalmente en un intervalo de un valor de la lista siguiente a un valor más alto en la lista: aproximadamente 0,001 mg/kg, aproximadamente 0,01 mg/kg, aproximadamente 0,1 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg. La periodicidad de la dosificación está generalmente en intervalos de tiempo regulares de aproximadamente cada 24, 48, 72, o 96 horas. En una realización alternativa, la periodicidad de dosificación está generalmente en intervalos de tiempo regulares de aproximadamente cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, días. En una realización alternativa, la periodicidad de dosificación está generalmente en intervalos de tiempo regulares de aproximadamente cada 1, 2, 3, 4, ó 5 semanas. Después de un período de tal dosificación, puede ser empleada una dosificación menos frecuente, por ejemplo, mensualmente, cada tres meses, cada cuatro meses o al año.

Se seleccionan dosis transdérmicas para proporcionar niveles fisiológicos esencialmente idénticos, similares o inferiores (plasma, tejidos, LCR) que se consiguen utilizando dosis de inyección.

Los polipéptidos se pueden administrar como un único agente activo o pueden administrarse en combinación con otros agentes, incluyendo otros compuestos que se pueden encontrar que muestran la misma actividad terapéutica o similar y que están determinados que son seguros y eficaces para tal administración combinada. Otros tales compuestos contemplados para su uso en el tratamiento de lesiones neuronales agudas o semi-agudas incluyen factores hematopoyéticos (por ejemplo, G-CSF y/o GM-CSF); sustancias que tienen actividades trombolíticas, por ejemplo, tPA, estreptoquinasa, uroquinasa, y/o Ancrod; antiagregantes plaquetarios, tales como el ácido acetilsalicílico (aspirina), clopidogrel (Plavix), aspirina combinada con dipiridamol de liberación prolongada (Aggrenox); anticoagulantes tales como la warfarina (Coumadin) o heparina; y/o sustancias que interfieren con la señalización de la apoptosis (por ejemplo, inhibidores de caspasas) o progesterona. Se entiende, sin embargo, que los compuestos anteriores se administran con propósitos preventivos y de antemano al accidente cerebrovascular (por ejemplo, para los agentes antiplaquetarios o anticoagulantes), o durante la fase aguda después de un accidente cerebrovascular (tPA).

Con el fin de evaluar los déficits motores, sensoriales o cognitivos que son tratados de manera efectiva de acuerdo con la presente invención, hay varias herramientas disponibles en la técnica. Los indicios bien conocidos para la controlar la eficacia del tratamiento incluyen el Mini Examen del Estado Mental (MMSE), el Mini Examen del Estado Mental Modificado (3MS), Medición del deterioro funcional (FIM, Prueba de Barthel, puntuación motora de Fugl-Meyer, Prueba de la función motora de Wolf, Prueba de la función de la mano de Jebsen-Taylor, Parte 1 del perfil de salud de Nottingham y Escala de Evaluación motora (MAS), Escala de Evaluación Motora de Sødring (SMES), la escala de equilibrio de Berg (BBS) y Actividades de la Vida diaria de Barthel (AVD), y otras pruebas clínicas, tales como medidas de afectos, habla, deglución, cognición, coordinación motora, fuerza, sensaciones y función autonómica, así como las tasas de supervivencia y las tasas de hospitalización se pueden utilizar para evaluar la progresión de la enfermedad.

Después de una lesión, enfermedad, infección u otra alteración del sistema nervioso, el cerebro, la médula espinal o los nervios periféricos no funcionan correctamente debido a una combinación cualquiera de destrucción intensa, apoptosis, vías y sinapsis alteradas, inflamación, ambiente químico alterado, cambios en el metabolismo de las células y cambios en la transcripción celular y la traducción. Tal como se utiliza en este documento, la expresión "recuperación neuronal" se utiliza para referirse al proceso mediante el cual el sistema nervioso restaura su funcionamiento hacia un estado normal. Este proceso se puede producir por la corrección, la elusión, la inversión o eliminación de cualquiera de las causas mencionadas anteriormente.

Además, se cree ahora que una recuperación neuronal significativa puede ocurrir a través de un proceso conocido como "plasticidad" mediante el cual el sistema nervioso forma nuevas conexiones para compensar o adaptarse a otros cambios. Las lesiones del sistema nervioso central causan la alteración de las conexiones locales y de larga distancia resultantes de la función alterada y la discapacidad. La plasticidad es un evento donde se forman nuevas conexiones entre las neuronas existentes. La plasticidad se ha demostrado que es un mecanismo de recuperación neuronal en los sistemas del SNC incluyendo el sistema visual (Pizzorusso et al.,) y la médula espinal (Fawcett JW (2009) Brain 132: 1417-1418). En la plasticidad, se forman nuevas sinapsis o las sinapsis existentes se fortalecen, se debilitan o se retiran para dar lugar a estructuras y sistemas existentes que compensen los que se han destruido o alterado en la lesión. Otras formas de plasticidad pueden incluir la alteración de la neuroquímica de las células existentes en cambios de la señalización sináptica directa y la señalización paracrina. La plasticidad también puede tomar la forma de alteración de los niveles de receptores que hacen a las neuronas y a otras células más o menos sensibles a la señalización sináptica directa o paracrina. Estos procesos están bien aceptados como mecanismos de aprendizaje y memoria.

La discusión de documentos, protocolos, materiales, dispositivos, artículos y similares se incluye en esta memoria descriptiva únicamente con el propósito de proporcionar un contexto para la presente invención. No se sugiere o se representa que cualquiera o todos estos materiales formaban parte de la base de la técnica anterior o fueran el conocimiento general común en el campo relevante para la presente invención, antes de la fecha de prioridad de cada reivindicación de la presente solicitud.

Los siguientes ejemplos ayudarán a los expertos en la técnica a comprender mejor la invención y sus principios y ventajas. Se pretende que estos ejemplos sean ilustrativos de la invención y no limiten el alcance de la misma.

50 Ejemplos

Ejemplo 1: Materiales y Métodos:

Preparación de los animales:

Cincuenta (50) Sprague-Dawley machos adultos fueron utilizadas para el estudio (10 animales adicionales fueron pedidos). Todas las ratas fueron alojadas y manipuladas para su evaluación del comportamiento durante siete (7) días antes de la cirugía para los propósitos de aclimatación. Al final del período de tratamiento, las ratas se asignaron al azar y se asignaron a diferentes grupos. A las ratas se les dio un número de identificación único por marcado de la cola. También se trataron diez ratas adicionales.

Preparación quirúrgica:

Oclusión de la arteria cerebral media (MCAO), Modelo Tamura:

5 Este modelo de lesión quirúrgica en la rata es un modelo bien aceptado de accidente cerebrovascular en el campo (Tamura et al, 1981, J Cereb Blood Flow Metab. I (I): 53-60; Tamura et al, 1981, J Cereb Blood Flow Metab. I (I): 61-9). Fueron hechos infartos cerebrales focales por la oclusión permanente de la arteria cerebral media proximal derecha (MCA) usando una modificación del método de Tamura et al. Ratas macho Sprague-Dawley (300-400 g en el momento de la cirugía) se anestesiaron con 2-3% de halotano en la mezcla de N₂O:O₂ (2:1), y se mantuvieron con 1-1,5% de halotano en la mezcla de N₂O:O₂ (2:1). El músculo temporal se dividió y se reflejó a través de una incisión realizada a medio camino entre el ojo y el canal del tímpano. El MCA proximal se expuso a través de una 10 craniectomía subtemporal sin quitar el arco cigomático y sin transección del nervio facial. A continuación, la arteria se ocluye por coagulación microbipolar desde justo el tracto proximal al olfativo a la vena cerebral inferior, y se corta transversalmente. La temperatura corporal se mantuvo a 37,5°C ± 0,5°C durante todo el procedimiento. Se dio por vía intraperitoneal (i.p.) cefazolina (40 mg/kg; Baxter, Lote 06014,1, Exp. Ene 2009) un día antes de MCAO y justo después de MCAO para prevenir las infecciones. Se le dio burprenorfina (NDC 12496-0757-1, Lote N° 700Y02, exp 15 1 enero, 2010) por vía subcutánea (0,05-0,1 mg/kg) antes de la cirugía MCAO como analgesia.

Preparación de compuesto y dosificación:

GGF2 y NRG-1 (NRG-EGF):

Las soluciones madre se prepararon en Acorda Therapeutics y se almacenaron a 0-5°C. Las dosis se realizaron como se describe a continuación:

20 Clonación, expresión y purificación de NRG-1 [dominio NRG1b2 EGF (156Q)]

ADN: el dominio NRG1b2 EGF fue clonado a partir de ADNc de cerebro humano y clonado en el vector pet 15b (Novagen cat N°. 69661-3) usando los sitios de restricción NdeI y BamHI. La proteína resultante es un marcador de 6,92 kDa + ~ 3kDa His (= 9,35 kDa).

Secuencia de ADN del clon NRG1b2 EGF pet 15

25 Las secuencias subrayadas son los sitios de clonación (NdeI y BamHI)

CATATGAGCCA TCTTGTA AAAA TGTGCGGAGA AGGAGAAAAC TTTCTGTGTG
 AATGGAGGGG AGTGCTTCAT GGTGAAAGAC CTTTCAAACC CCTCGAGATA
 CTTGTGCAAG TGCCCAAATG AGTTTACTGG TGATCGCTGC CAAAAC TACG
 TAATGGCCAG CTTCTACAAG GCGGAGGAGC TGTACCAGTA AGGATCC

La proteína traducida final del vector pet15b se muestra más abajo. El dominio EGF está subrayado.

10 20 30 40 50
MGSSHHHHHH SGLVPRGSH MSHLVKCAEK EKTFCVNGGE CFMVKDLSNP
 60 70 80
SRYLCKCPNE FTGDRCQNYV MASFYKAEEL YQ

pl teórico/PM: 7,69/9349,58

30 Expresión de proteínas

El clon se transformó en células B121 para la expresión de proteínas utilizando el Sistema Overnight Express Autoinduction System 1 (Novagen) en medio LB a 25°C durante 24 horas. La expresión es principalmente en cuerpos de inclusión insolubles.

Replegamiento de proteínas: Adaptado del Kit de replegamiento de proteínas de Novagen, 70123-3.

35 Purificación de proteínas: La proteína se carga en una columna de intercambio aniónico DEAE a 2,5 ml/min. El fragmento de NRG-1 se mantiene en el flujo a través, mientras que los contaminantes se unen y se eluyen en una sal más alta. El tampón de carga y lavado es Tris 50 mM pH 7,9 y el tampón de elución es Tris 50 mM pH 7,9 con NaCl 1M. El flujo a través se reúne y se concentra con Centriprep YM-3 de Millipore.

Transferencia Western: La expresión de proteínas se evalúa mediante transferencia Western. La banda resultante sale en torno a 10 kD.

5 Un gel criterio de 4-20% (Biorad) se utiliza para la resolución de proteínas seguido de la transferencia sobre papel de nitrocelulosa Protran (tamaño de poro 0,1 micras de Schleicher y Schull). La transferencia se bloquea en 5% de leche en TBS-T (0,1%). El anticuerpo primario (anticuerpo anti EGF humano NRG1- alfa/HRG1-alfa purificado por afinidad policlonal N°. Cat. AF-296-NA de R&D systems), dilución 1:1000 en 5% de leche en TBS-T 1 hora a temperatura ambiente (también funciona a 4°C durante la noche). Se utilizó anticuerpo secundario anti-cabra de HRP de conejo a dilución 1:10.000 en 5% de leche en TBS-T durante 1 hora a TA. Todos los lavados se realizaron en TBS-T.

10 Protocolo para la purificación de NRG-1

Los cultivos se cultivaron a 25°C en el sistema Overnight Express Autoinduction System 1 de Novagen (N°. de cat 71300-4). Hay NRG-1 muy poco soluble presente. El cultivo se centrifuga y se extraen los peletes, se solubilizan y se vuelven a plegar para adquirir la NRG-1 antes de que la purificación pueda tener lugar.

Materiales para la extracción, solubilización y re-plegue:

15 10 x tampón de lavado: Tris-HCl 200 mM, pH 7,5, EDTA 100 mM, 10% de Triton X-100

10 x tampón de solubilización: CAPS 500 mM, pH 11,0

50 x tampón de diálisis: Tris-HCl 1M, pH 8,5

30% de N-laurilsarcosina - añadir como polvos (Sigma 61739-5G)

TDT 1M

20 Glutati3n reducido (Novagen 3541)

Glutati3n oxidado (Novagen 3542)

A. Lisis celular y preparaci3n de cuerpos de inclusi3n

- Descongelar y volver a suspender el sedimento celular en 30 ml de tamp3n de lavado 1 x. Mezclar seg3n sea necesario para la resuspensi3n completa.

25 - Añadir inhibidores de proteasa (25 µl de 10X por 50 ml), DNasa (200 µl de 1 mg/ml por cada 50 ml) y MgCl₂ (500 µl de 1 M por 50 ml) a la suspensi3n.

-Lisar las células por sonicaci3n.

a. Enfriar las células en hielo a lo largo de este paso.

30 b. Con la punta cuadrada, someter a ultrasonidos durante 30 segundos en el nivel 6, 10 veces hasta que la suspensi3n se vuelva menos viscoso. Dejar que la suspensi3n se enfríe en hielo durante 60 segundos entre cada tratamiento con ultrasonidos. Mantener el volumen no superior a los 40 ml en un tubo c3nico de 50 ml en el tratamiento con ultrasonidos.

-Cuando esté completo, transferir cada suspensi3n a botellas de centrífuga de cuello en ángulo de 250 ml para su uso con el rotor F- 16/250.

35 - Recoger los cuerpos de inclusi3n por centrifugaci3n a 10.000 x g durante 12 minutos.

- Eliminar el sobrenadante (guardar una muestra para el análisis de la proteina soluble) y volver a suspender completamente el sedimento en 30 ml de tamp3n de lavado 1 x.

- Repetir la centrifugaci3n como en el paso 4 y guardar el precipitado.

- De nuevo, volver a suspender completamente el sedimento en 30 ml del 1 x tamp3n de lavado.

40 - Recoger los cuerpos de inclusi3n por centrifugaci3n a 10.000 x g durante 10 minutos. Decantar el sobrenadante y eliminar los últimos restos de líquido golpeando el tubo invertido sobre una toalla de papel.

B. Solubilizaci3n y replegamiento

45 - A partir del peso húmedo de los cuerpos de inclusi3n a procesar, calcular la cantidad de tamp3n de solubilizaci3n 1 x necesario para volver a suspender los cuerpos de inclusi3n a una concentraci3n de 10-15 mg/ml. Si el volumen calculado es mayor que 250 ml, utilizar 250 ml.

ES 2 609 927 T3

- A la temperatura ambiente, preparar el volumen calculado de tampón de solubilización 1 x suplementado con 0,3% de N-laurilsarcosina (hasta 2% se puede utilizar si es necesario en una mayor optimización) (tampón 300 mg/100 ml) y DTT 1 mM.
- 5
- Añadir la cantidad calculada de tampón de solubilización 1 x de la etapa 2 a los cuerpos de inclusión y mezclar suavemente. Los residuos de gran tamaño pueden ser disueltos mediante pipeteo repetido.
 - Incubar en el agitador refrigerador a 25°C, 50-100 rpm durante 4-5 horas.
 - Aclarar por centrifugación a 10.000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- C. Protocolo de diálisis para el replegamiento de la proteína
- 10
- Preparar el volumen requerido de tampón para la diálisis de la proteína solubilizada. La diálisis se debe realizar con al menos 2 cambios de tampón, mayor de 50 veces el volumen de la muestra.
 - Diluir el tampón de diálisis 50 x a 1 x en el volumen deseado y completar con DTT 0,1 mM.
 - Dializar durante al menos 4 horas a 4°C. Cambiar el tampón y continuar. Dializar durante 4 horas o más.
 - Preparar tampón de diálisis adicional tal como se determina en el paso 1, pero omitiendo TDT.
 - Continuar la diálisis a través de dos cambios adicionales (min. 4 horas cada uno), con tampón de diálisis sin TDT.
- 15
- D. Tampón de replegamiento redox para promover la formación de un enlace disulfuro
- Preparar un tampón de diálisis que contiene glutatión reducido 1 mM (1,2 g/4L) y glutatión oxidado 0,2 mM (0,48 g/4L) en tampón de diálisis 1 x. El volumen debe ser 25 veces mayor que el volumen de la muestra de proteína solubilizada. Enfriar a 4°C.
 - Dializar la proteína replegada desde el paso 1 toda la noche a 4°C.
- 20
- Purificación
- Todos los procedimientos se realizaron a 4°C.
- Productos químicos:
- Hidrocloruro de Trizma (Sigma T5941-500G)
- Solución de cloruro de sodio 5M (Sigma S6546-4L)
- 25
- Hidróxido de sodio 10 N (JT Baker 5674-02)
- E. Purificación en Columna anión DEAE HiPrep 16/10 de 20 ml (GE Healthcare)
- Tampón A: Tris-HCl 50 mM pH 8,0
- Tampón B: Tris-HCl 50 mM con NaCl 1M pH 8,0
- Equilibración de la columna: Tampón A- 5CV, Tampón B- 5CV, Tampón A- 10CV
- 30
- Cargar 50 ml de muestra por cada procesamiento en la columna de 20 ml a 2,0 ml/min (NRG-1 está en el flujo a través).
 - Lavar columna de 20 ml con 5CV de tampón A
- columna de 20 ml con gradiente a 100% de B con 5CV. Esto es para eluir los contaminantes.
- Limpiar con 10CV del 100% de tampón B.
- 35
- Equilibrar con 15CV de Tampón A
 - Analizar las fracciones con un SDS-PAGE tinción de plata
 - Agrupar las fracciones con NRG-1 (10 kDa)
- F. Concentración de NRG-1
- Concentrar con un concentrador Millipore Centriprep 3000 de MWCO de 15 ml (ULTRACEL YM-3, 4320)
- 40
- Utilizar el ensayo de proteínas de Lowry modificado para determinar la concentración.

G. Eliminación de His-Tag

La eliminación de His-Tag se lleva a cabo con un kit de captura de escisión de trombina de Novagen (N° Cat 69022-3). Sobre la base de pruebas anteriores, las mejores condiciones son la temperatura ambiente durante 4 horas con trombina a 0,005U de enzima por μ l para cada 10 μ g de la proteína NRG-1. Después de cuatro horas de incubación, añadir 16 μ l de suspensión de estreptavidina agarosa por unidad de enzima trombina. Agitar la muestra durante 30 minutos a temperatura ambiente. Recuperar el NRG-1 a través de filtración por centrifugación o filtración estéril (dependiendo del volumen). La escisión completa se determina con un EGF y anti-His western.

H. Almacenamiento en tampón final

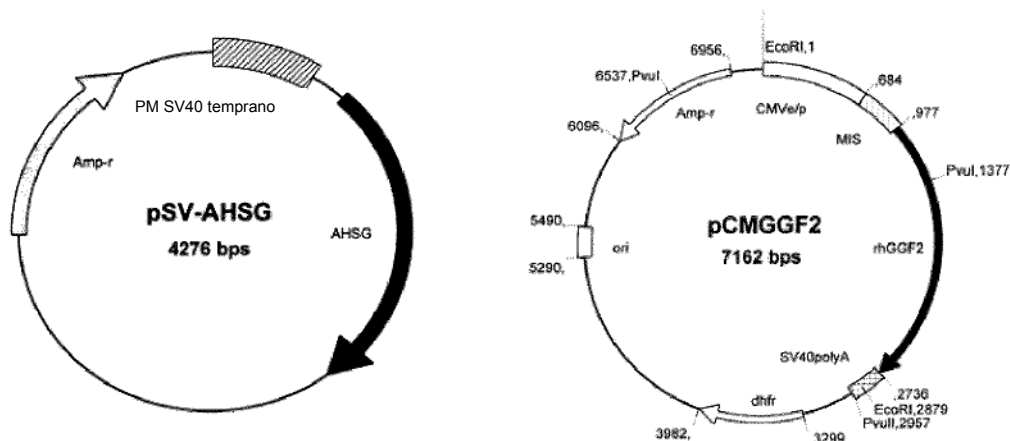
Almacenado en 1 x PBS con BSA al 0,2% a 4°C.

10 Expresión y purificación de GGF2

Para la clonación y para obtener la información de fondo para GGF2, véase el documento de patente de EE.UU. N° 5.530.109. La línea celular se describe en la patente de EE.UU. N° 6.051.401.

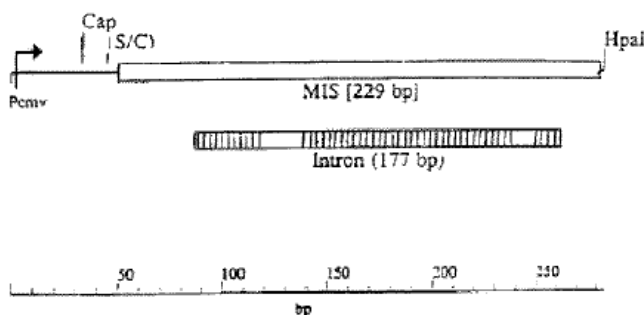
15 Línea celular CHO (Alpha2HSG)-GGF: Esta línea celular fue diseñada para producir cantidades suficientes de fetuina (alpha2HSG humana) para soportar altas velocidades de producción de rhGGF2 en condiciones libres de suero.

20 Las células CHO (dhfr) se transfectaron con el vector de expresión que se muestra a continuación (pSV-AHSG). Las células estables se cultivaron bajo presión de ampicilina. Se designó la línea celular (dhfr/ α 2HSGP). Las células dhfr/ α 2HSGP luego se transfectaron con el vector pCMGGF2 que se muestra a continuación que contiene la secuencia de codificación para GGF2 humano utilizando el reactivo DMRIE-C lípido catiónico (Life Technologies N° 10459-014).



25 Líneas celulares estables y altas productoras se obtuvieron bajo protocolos estándar utilizando metotrexato (100 nM, 200 nM, 400 nM, 1 M) a intervalos de 4-6 semanas. Las células fueron deshabitadas gradualmente del medio que contenía suero. Los clones se aislaron mediante metodologías estándar de dilución limitante. Los detalles de los requisitos de los medios se encuentran en los informes mencionados anteriormente.

Para mejorar la transcripción, la secuencia de codificación de GGF2 fue colocada después de la secuencia intermedia de EBV-I BMLF (MIS). Véanse las figuras siguientes.



ES 2 609 927 T3

Secuencia MIS

CGATIAACTAGCAGCATTTCCTCCAACGAGGATCCCCGAG
(GTAAGAAGCTACACCGGCCAGTGGCCGGGGCC
CGATAACTAGCAGCATTTCCTCCAACGAGGATCCCCGAG(GTAAGAAGCTACACCGGCC
AGTGGCCGGGGCC
GTGGAGCCGGGGGCATCCGGTGCCTGAGACAGAGGTGCTCAAGGCAGTCTCCACCTTTT
GTCTCCCCTCTGCAG) AGAGCCACATTCTGGAA] GTT

secuencia de codificación GGF2 –

atgagatgg cgacgcgcc cgcgccctc cgggcgtccc
301 ggccccggg cccagcgccc eggetccgcc gcccgctcgt egccgccgt gccgctgctg
361 ccontactgc tgetgctggg gaccgcggcc ctggcgccgg gggcgcgcc cggcaacgag
421 gcgctcccc cgggggctc ggtgtgctac tcgtccccgc ccagcgtggg atcggtgag
481 gagctagctc agcgcgccgc ggtggtgatc gagggaaagg tgcaccgca gcggcggcag
541 cagggggcac tcgacaggaa ggcggcgccg gcggcgggcg aggcaggggc gtggggcggc
601 gatcgcgagc cgccagccgc gggcccacgg gcgctggggc cggccgccga ggagccgctg
661 ctgcgcgcca acgggaccgt gccctcttg gccaccgcc cgggtgccag cggcggcgag
721 cccggggagg aggcgccta tctggtgaag gtgcaccagg tgtggcggt gaaagccggg
781 ggcttgaaga aggactcgt gtcaccgtg cgcctgggga cctggggcca cccgcctc
841 cctcctgcg ggaggetcaa ggaggacagc aggtacatct tcttcattga gcccgacgcc
901 aacagcacca gccgcgcgcc ggcgccttc cgagcctct tccccctct ggagacgggc
961 cggaacctca agaaggaggt cagccgggtg ctgtgcaagc ggtgcgcctt gcctcccaa
1021 ttgaaagaga tgaagacca ggaatcggct gcaggtcca aactagtct tcggtgtgaa
1081 accagttctg aatactctc tctcagatc aagtgggtca agaatggaa tgaattgaa
1141 cgaaaaaca aaccacaaa tatcaagata caaaaaagc caggaagtc agaactcgc
1201 attaacaaag catcactggc tgattctgga gagtatatgt gcaaagtgat cagcaaatta
1261 ggaaatgaca gtgcctctgc caatatcacc atcgtggaat caaacgtac atctacatcc
1321 accactggga caagccatct tgtaaaatgt gcggagaagg agaaaacttt ctgtgtgaa
1381 ggaggggagt gcttcattgt gaaagacct tcaaaccct cgagatact gtgcaagtgc
1441 ccaaatgagt ttactggtg tcgctgcaa aactacgtaa tggccagct ctacagtacg
1501 tccactcct ttctgtctt gcctgaatag

ES 2 609 927 T3

Secuencias de proteínas GGF2 -

MRWRRAPRRSGRPGPRAQRPGSAARSSPPLPLLPLLLLLGTAAL
 AFGAAAGNEAAPAGASVCYSSPPSVGVSQELAQRAAVVIEGKVHPQRRQOGALDRKAA
 AAAGEAGAWGGDREPPAAGPRALGPPAEPELLAANGTVPSWPTAPVPSAGEPGEEAPY
 LVKVHQVWAVKAGGLKKDSSLTVRLGTWGHFAFPSCGRLKEDSRYIFFMEPDANSTSR
 APAAFRASFPPLETGRNLKKEVSRVLCRKCALPPQLKEMKSQESAAGSKLVLRCEISS
 EYSSLRFKWFKNGNELNRKNKPQNIKIQQKPGKSELRINKASLADSGEYMCKKVISKLG
 NDSASANITIVESNATSTSTTGTSHLVKCAEKEKTFVNGGECFMVKDLSNPSRYLCK
 CPNEFTGDRCQNYVMASFYSTSTPFLSLPE

- 5 Producción de GGF2: Un vial de GGF2 a $2,2 \times 10^6$ células/ml se descongeló en 100 ml de Medio Acorda 1 (véase la Tabla 2) y se expandió hasta alcanzar un número suficiente para sembrar recipientes de producción. Las células se inocularon en los medios de producción Medio Acorda 2 (véase la Tabla 3) a $1,0 \times 10^5$ células/ml en dos botellas con ruedas de litro ventilados. Las botellas con ruedas se mantienen a 37°C durante 5 días y después se reducen a 27°C durante 26 días. Las botellas con ruedas se controlan para el recuento de células y el aspecto general, pero no se alimentan. Una vez que la viabilidad está por debajo del 10% de las células se centrifugan y los medios condicionados se recogen y se filtran estériles.

10 Tabla 2: Medio 1

Elemento	Proveedor	Número de catálogo	Concentración final
CD-CHO	Invitrogen	10743-029	- eliminar 50ml, después añadir los componentes de más abajo
FeSO ₄ .EDTA	Sigma	F-0518	1x (10 ml/L)
L-Glutamina	Cellgro	25-005-CI	4 mM (20 ml/L)
Insulina Humana Recombinante	Sigma	I-9278	290 U/L (1 ml/L)
Aminoácido no esencial	Cellgro	25-025-CI	1x (10 ml/L)
Soja-HySoy Peptona Tipo 4	Sigma	P0521	Polvo - hecho 20X en CD-CHO (50ml/L)
Gentamicina	Invitrogen	15750-078	100 µg (2ml/L)

Tabla 3: Medio 2

Elemento	Proveedor	Número de Catálogo	Concentración final
CD-CHO	Invitrogen	10743-029	50% (-50 ml primero)
HyQ SFX-CHO	HyClone	SH30187.02	50% (-50 ml primero)
FeSO ₄ .EDTA	Sigma	F-0518	1x (10 ml/L)
L-Glutamina	Cellgro	25-005-CI	4 mM (20 ml/L)
Insulina Humana Recombinante	Sigma	I-9278	290 U/L (1 ml/L)
Aminoácido no esencial	Cellgro	25-025-CI	1x (10 ml/L)
Soja-HySoy Peptona Tipo 4	Sigma	P0521	Polvo - hecho 20X en CD-CHO (50 ml/L)
Gentamicina	Invitrogen	15750-078	100pg (2 ml/L)

Protocolo de purificación para GGF2

Todos los procedimientos se realizaron a 4°C.

5 Productos químicos:

Acetato de sodio

Ácido acético glacial (para ajuste de pH)

NaOH 10 N (para ajuste del pH)

NaCl

10

Sulfato de sodio

L-arginina (JT Baker N° cat: 2066-06)

Manitol (JT Baker N° cat: 2553-01)

Material de partida: sobrenadante del medio acondicionado. Ajustar el pH a 6,5.

Paso 1:

15 Cromatografía de captura-intercambio catiónico

HiPrep SP 16/10 (Amersham Biosciences)

Equilibrado de la columna: Tampón A - 5CV, tampón B - 5CV, tampón 15% B - 5CV

Tampón A: acetato sódico 20 mM, pH 6,0

Tampón B: acetato sódico 20 mM, pH 6,0, NaCl 1M

20 Cargar la muestra a 2 ml/min con una carga continua durante la noche si es posible. La unión es mejor con carga continua.

ES 2 609 927 T3

Capacidad máxima de una muestra de partida: 5 mg de GGF2/ml medio

Caudal: 3 ml/min

Primer lavado: 15% de B, 10CV

Segundo lavado: 35% de B, 10CV

5 Elución GGF2: 60% de B, 8CV

Lavado de la columna: 100% de B, 8CV

Tampones:	Composición	Conductividad	Uso
15% B	acetato de Na 20 mM, pH 6,0, NaCl 150 mM		
Preequilibrado			
10			primer lavado
35% B	acetato de Na 20 mM, pH 6,0, 350 mM NaCl		segundo lavado
60% B	acetato de Na 20 mM, pH 6,0, 600 mM NaCl		GGF2 elución
100% B	acetato sódico 20 mM, pH 6,0, NaCl 100 mM	88 mS/cm	Columna de lavado

15 Paso 2:

Refinamiento - Cromatografía de filtración en gel

Sephacryl S200 26/60

Tampón de elución: acetato de Na 20 mM, sulfato de sodio 100 mM, 1% de manitol, L-arginina 10 mM, pH 6,5

20 Conductividad del tampón:

Muestra: combinación de elución SP GGF2 concentrada hasta ~ AU280 1.0

Caudal: 1,3 ml/min

Elución de pico: a ~ 0,36CV del comienzo de la inyección

Paso 3: Eliminación de ADN y endotoxina - filtración a través de la membrana de Intercept Q.

25 Tampón de preequilibrado: acetato de Na 20 mM, sulfato de sodio 100 mM, 1% de manitol,

L-arginina 10 mM, pH 6,5

Recoger el flujo a través

Etapa 4: formulación final y preparación de muestras

Añadir L-arginina 90 mM adicional a la muestra

30 Concentrar

Filtrar estéril

El artículo vehículo/control que se utiliza en el presente documento es albúmina de suero bovino al 0,2% (BSA), fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,6 o fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,6, como se indica.

FGF básica:

35 El bFGF (PeproTech Inc., 100-18B, Lote 1206CY08 G2407) se reconstituyó según las indicaciones de PeproTech a una solución madre de 0,1 mg/ml y se almacenó a -20°C antes de su uso. En el día de la inyección, 100 µg/ml de solución de BSA (Roche Diagnostics, Lote 12403328 exp. 31 de Mar, 2008) se hizo como diluyente, para hacer una concentración final de bFGF de 20 µg/ml (1 µg/50 µl). Este material fue utilizado solamente en el estudio 1.

Aleatorio y ciego: Cinco animales fueron operados por día. El investigador que realizaba la cirugía y las evaluaciones de comportamiento no conocía la asignación del tratamiento de cada animal (excepto el grupo tratado con bFGF) hasta que todos los datos fueron recogidos.

Pruebas de comportamiento:

- 5 Las actividades funcionales sensoriomotoras fueron evaluadas utilizando la colocación de las extremidades anteriores y las extremidades posteriores, y las pruebas de comportamiento del balanceo del cuerpo. Estas pruebas se llevaron a cabo un (1) día antes de la cirugía, un (1) día después de la cirugía y a los tres (3), siete (7), catorce (14) y veintiún (21) días después de MCAO.

1. Colocación de las extremidades

- 10 Los ensayos de colocación de las extremidades se dividieron en dos pruebas de las extremidades anteriores y las extremidades posteriores. Para la prueba de colocación de la extremidad anterior, el examinador sostuvo a la rata cerca de una mesa y puntuó la capacidad de la rata para colocar el miembro anterior en la mesa en respuesta a una estimulación de bigotes, visual, táctil o propioceptiva. De manera similar, para la prueba de colocación de las extremidades posteriores, el examinador evaluó la capacidad de la rata para colocar el miembro posterior en la mesa en respuesta a una estimulación táctil y propioceptiva. Se obtuvieron sub-puntuaciones por separado para cada modo de entrada sensorial (designaciones de medio punto posibles), y se añadieron para dar puntuaciones totales (para la prueba de colocación de la extremidad anterior: 0 = normal, 12 = deteriorado al máximo, para la prueba de colocación de la extremidad posterior: 0 = normal; 6 = deteriorado al máximo).

2. Prueba del balanceo del cuerpo

- 20 La rata se sujetó aproximadamente una pulgada (0,0254 m) desde la base de la cola. A continuación, se elevó a una pulgada (0,0254 m) por encima de la superficie de la mesa. La rata se sujetó en el eje vertical, que se define como no más de 10° a la izquierda o la derecha. Un balanceo se registraba cuando la rata movía su cabeza fuera del eje vertical a cada lado. La rata debe volver a la posición vertical para que el siguiente balanceo sea contado. Se contaron treinta (30) balanceos totales. Una rata normal tiene típicamente un número igual de balanceos a cada lado. Después de la isquemia focal, la rata tiende a girar hacia el lado contralateral (izquierda).

En todos los días de las pruebas de comportamiento, los animales fueron probados antes de la administración del fármaco. Los puntos del tiempo se designan con el día de la cirugía (día 0) como referencia.

Sacrificio y volumen de infarto:

- 30 Tras las evaluaciones conductuales de veintiún (21) días después de MCAO, las ratas fueron profundamente anestesiadas con mezcla de ketamina (50-100 mg/kg) y xilazina (5-10 mg/kg), por vía intraperitoneal. Los animales fueron perfundidos transcardialmente con solución salina normal (con heparina, 2 unidades/ml) seguido de 10% de formalina. Los cerebros se retiraron a continuación y se almacenaron en 10% de formalina. Los cerebros fijados fueron embebidos en parafina y se cortaron secciones coronales de 5 micras usando un micrótopo. Las secciones fueron teñidas con hematoxilina y eosina (H & E). Siete secciones (+4,7, +2,7, +0,7, -1,3, -3,3, -5,3 y -7,3, respectivamente, en comparación con el bregma) de cada cerebro fueron fotografiadas con una cámara digital, y el área infartada en cada sección se determinó por imagen NIH (imagen J) usando el "método indirecto" (área del hemisferio contralateral intacto [izquierda] - área de regiones intactas del hemisferio ipsilateral [derecha]) para corregir el edema cerebral. Las áreas infartadas se suman entonces entre las secciones y se multiplican por el grosor del corte para dar el volumen del infarto total, que se expresa como un porcentaje del volumen hemisférico contralateral intacto.

Ejemplo 2: Efecto de GGF2 (un NRG-1) en la mejora de la recuperación neurológica en un modelo de oclusión de arteria cerebral media permanente (MCAO) en ratas - Tratamiento iniciado durante la fase aguda y de ahí en adelante.

Efectos de GGF2 y NRG-1: Recuperación funcional tras oclusión de MCA (MCAO) en ratas

- 45 Estudio 1 Grupos experimentales (n= 10):

NRG-1, 1,0 µg/kg, 1 ml/kg por vía intravenosa; 1 h después, y una vez por día (q24) durante 10 días después de MCAO

GGF2, 6,5 µg/kg, 1 ml/kg por vía intravenosa; 1 h después, y q24 durante 10 días después de MCAO

GGF2, 100 µg/kg, 1 ml/kg por vía intravenosa; 1 h después, y q24 durante 10 días después de MCAO

- 50 bFGF, intracisternal, 1 µg/50 µl; días 1 y 3 (control positivo) después de MCAO

Vehículo, 1 ml/kg por vía intravenosa; 1 h después, y q24 durante 10 días después de MCAO (vehículo = 0,2% BSA/0,1 M de fosfato de sodio pH 7,6)

Todos los datos se expresan como media \pm S.E.M. Los datos de comportamiento y de peso corporal fueron analizados por ANOVA de medidas repetidas (tratamiento x tiempo), a menos que se especifique lo contrario. F- valores positivos para los ANOVA generales incluidos todos los grupos habilitados ANOVA pares entre los grupos. Los datos del volumen del infarto fueron analizados por ANOVA de una vía.

5 Resultados:

Prueba de colocación de la extremidad anterior:

Recuperación en el GGF2, 100 μ g/kg grupo fue superior al del grupo de vehículo ($P < 0,001$). La recuperación en el grupo de bFGF fue superior al grupo de vehículo ($p < 0,05$). No hubo diferencia significativa en la recuperación del GGF2, 6,5 μ g/kg o NRG, grupos de 1,0 μ g/kg en comparación con el grupo de vehículo. Véase la Figura 2.

10 Prueba de la colocación de las extremidades posteriores:

La recuperación en bFGF y GGF2, 100 μ g/kg grupo fue significativamente mejor que el grupo del vehículo ($p < 0,001$) en todos los días de las pruebas de comportamiento. La recuperación en GGF2, 6,5 μ g/kg grupo y NRG, 1,0 μ g/kg grupo se mejoró significativamente en comparación con el vehículo en los días de la prueba de comportamiento 7 y 14, pero este efecto no se mantuvo hasta el punto final de 21 días. Véase la Figura 3.

15 Prueba del balanceo del cuerpo:

La recuperación en el grupo bFGF y GGF2, 100 μ g/kg grupo fue significativamente mejorada en comparación con el vehículo ($p < 0,05$) en la prueba de comportamiento del punto final del día 21. No hubo diferencia significativa en la recuperación de NRG, grupo 1,0 μ g/kg, o GGF2, 6,5 μ g/kg grupo en comparación con el grupo de vehículo. Véase la Figura 4.

20 Cambios de peso:

No hubo diferencias significativas entre los grupos.

Volumen de Infarto: No hubo diferencias significativas entre los grupos. Véase la Tabla 1 anterior.

Resumen:

25 Estos resultados demuestran que GGF2 está actuando de una manera sensible a la dosis y promueve la recuperación funcional en este modelo de derrame cerebral permanente. Los datos de los miembros posteriores utilizando la dosis más baja de neuregulina muestran que el tratamiento continuado puede conducir a mejoras continuas.

30 Ejemplo 3: Efecto del momento de la administración (retraso después de la lesión) de la dosificación de GGF2 en la mejora de la recuperación neurológica en una oclusión permanente de la arteria cerebral media (MCAO) en ratas, incluyendo la dosificación del periodo crónico.

Efectos de GGF2 en la recuperación funcional después de MCAO en ratas

Grupos experimentales (n= 10):

GGF2, 0,1 mg/kg, (1 ml/kg) por vía intravenosa; 10 inyecciones diarias, comenzando el día 1 después de MCAO

GGF2, 0,1 mg/kg, (1 ml/kg) por vía intravenosa; 10 inyecciones diarias, comenzando el día 3 después de MCAO

35 GGF2, 0,1 mg/kg, (1 ml/kg) por vía intravenosa; 10 inyecciones diarias, comenzando el día 7 después de MCAO

Vehículo, 1 ml/kg por vía intravenosa; 10 inyecciones diarias, comenzando el día 1 después de MCAO

(Vehículo = fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,6)

Los animales comienzan a recibir GGF2 o vehículo por vía intravenosa en el día 1, el día 3 o el día 7 durante 10 días después de MCAO. Todas las soluciones fueron recién preparadas todos los días.

40 Resultados:

Colocación de la extremidad anterior:

45 La recuperación en el grupo de tratamiento GGF2 del Día 1 mejoró significativamente en comparación con el grupo del vehículo en todos los puntos de tiempo de la prueba después del tratamiento (en el día 3 ($p < 0,0001$), en el día 7 ($p < 0,005$), en el día 14 ($p < 0,0001$) y en el día 21 ($p < 0,0001$)). El grupo de tratamiento GGF2 del día 3 mostró mejoras significativas en comparación con el vehículo en el día 7 ($p < 0,05$) y el día 21 ($p < 0,05$). El grupo de tratamiento GGF2 del Día 7 mostró una clara desviación de la pendiente de recuperación en comparación con el

vehículo desde el día 7 (inicio del tratamiento) hasta el día 14, esta diferencia se hizo significativa para el día 21 ($p < 0,05$). Estos datos indicaron que el tratamiento tan tarde como tres y hasta 7 días después de la lesión puede producir mejoras significativas en la función neurológica. El tratamiento más prolongado puede ser beneficioso y dar lugar a efectos mayores y más sostenidos. Véase la Figura 5A.

5 Colocación de las extremidades posteriores:

La recuperación en el grupo de tratamiento GGF2 Día 1 se mejoró significativamente en comparación con el grupo de vehículo en todos los puntos de tiempo de prueba después del tratamiento (en el día 3 ($p < 0,05$) y en los días 7, 14 y 21 ($p < 0,0001$)). El grupo de tratamiento GGF2 día 3 mostró mejoras que fueron significativamente mejores que el vehículo en el día de la prueba 7 ($p < 0,001$) y el día 14 ($p < 0,05$, día después de terminado el tratamiento), y fueron una tendencia hacia la significación en el día 21 ($p < 0,065$). El grupo de tratamiento GGF2 Día 7 fue significativamente mejorado en comparación con el vehículo en el punto extremo de prueba del día 21 del estudio ($p < 0,05$). Figura 5B.

Balanceo del cuerpo: La recuperación en el grupo de tratamiento GGF2 Día 1 fue significativamente mejor que el grupo de vehículo ($p < 0,001$). Hubo una tendencia hacia la recuperación en el grupo de GGF2 Día 3 y grupo GGF2 Día 7, en comparación con el grupo de vehículo, Figura 5C.

No hubo diferencias significativas en los pesos corporales entre los grupos.

Volumen de infarto: No hubo diferencias significativas entre todos los grupos, como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4:

Grupo	% Volumen de infarto
Vehículo Día 1	32,89 \pm 2,63
GGF2 Día 1	27,62 \pm 2,48
GGF2 Día 3	33,31 \pm 3,84
GGF2 Día 7	27,30 \pm 2,87

20 Resumen: En el punto final del estudio del día 21 se encontró que el tratamiento iniciado el Día 1, Día 3 o el Día 7 después de MCAO dio como resultado mejoras significativas en la función de la extremidad anterior en comparación con los animales tratados con vehículo. El tratamiento iniciado el día 1, el día 3 o el día 7 después de MCAO dio lugar a mejoras significativas en la función de las extremidades posteriores en comparación con el tratamiento con vehículo durante los puntos de prueba de comportamiento específico que se correlacionan con el tiempo de tratamiento, lo que indica que el tratamiento continuado puede resultar beneficioso. La recuperación funcional con las intervenciones presentadas a estos puntos de tiempo tardíos después de la lesión elimina la posibilidad de que el efecto sea debido a la neuroprotección aguda. De hecho, estos datos junto con la falta de un cambio significativo en el volumen del infarto demuestran que las mejoras se deben a la promoción de la recuperación neuronal con el tratamiento de GGF2. Esto demuestra que existe una ventana temporal a largo plazo (post-aguda y post-semi aguda) durante cuyo tiempo se puede administrar GGF2 como un agente terapéutico eficaz para la fase crónica del accidente cerebrovascular.

35 Cabe destacar que las mejoras significativas (bajo las estadísticas de ANOVA) observadas tras la administración de GGF2 a los 3 y 7 días después de MCAO representan una drástica expansión en el margen terapéutico ofrecido por las estrategias previamente disponibles para el tratamiento del accidente cerebrovascular en fase aguda. Por primera vez en la técnica, los datos presentados en la presente memoria demostraron que la administración de GGF2 era eficaz incluso durante la fase crónica del accidente cerebrovascular. Los datos presentados en este documento sugieren que GGF2 contribuye a la recuperación neuronal después de una lesión neurológica.

Ejemplo 4: Tratamiento del accidente cerebrovascular isquémico

40 Un paciente se presenta a un centro médico con signos y síntomas de un accidente cerebrovascular isquémico. El paciente se revasculariza con tPA u otra terapia para restaurar el flujo de sangre. Aunque el flujo de sangre se restauró, se produjo un cierto nivel de lesión cerebral. Tres días después de la lesión el paciente se evalúa neurológicamente y se muestra que tiene déficits sensoriales y/o motores medibles. A partir del cuarto día, después de dos días y después de 3 días, este paciente se trata con neuregulina en una dosis de entre 0,01 y 1,0 mg/kg por dosis, por vía intravenosa durante 10 días a 3 meses. El paciente recupera satisfactoriamente la función sensorial y motora sin el uso concomitante de terapia ocupacional o física. Esta recuperación es mejor que se habría predicho clínicamente sin terapia con neuregulina. Esta recuperación es mejor que se habría predicho clínicamente sin el uso de terapia ocupacional o física.

Ejemplo 5: Tratamiento de accidente cerebrovascular y de la consiguiente paralización de la mano derecha

Un paciente se presenta al servicio de urgencias con una parálisis de la mano derecha. Tras la evaluación y la visualización de la formación de imágenes se determina que el paciente ha sufrido un accidente cerebrovascular isquémico. El paciente recibe tPA de acuerdo con los métodos aprobados, y el flujo sanguíneo se restaura a través de la trombolisis. Sin embargo, una semana después del tratamiento con tPA, el paciente tiene parálisis residual de la mano derecha tal como se mide por medidas neurológicas estándar de la actividad motora de la mano. Este paciente se trata con neuregulina (de 0,01 a 1,0 mg/kg, IV) una vez por semana durante 4 semanas. La mejora de la función de la mano se mide periódicamente por un neurólogo u otro médico con pruebas neurológicas estándar, incluyendo el dinamómetro y otra prueba de fuerza. El paciente recupera satisfactoriamente la función sensorial y motora en la mano derecha sin el uso concomitante de terapia ocupacional o física. Esta recuperación es mejor que se habría predicho clínicamente sin terapia con neuregulina. Esta recuperación es mejor que se habría predicho clínicamente sin el uso de terapia ocupacional o física.

Ejemplo 6: Tratamiento de accidente cerebrovascular isquémico

Un paciente se presenta a un centro médico con signos y síntomas de un accidente cerebrovascular isquémico. Se encontró que tenía parálisis de su lado izquierdo. El paciente no llega a tiempo para la terapia de revascularización. Tras la evaluación clínica se encuentra que se ha producido alguna lesión cerebral. Tres días después de la lesión el paciente es evaluado neurológicamente y se demuestra que tiene déficits sensoriales y motores medibles. Este paciente se trata con neuregulina en una dosis de entre 0,01 y 1,0 mg/kg por dosis, por vía intravenosa cada día durante cuatro semanas; a partir de entonces recibe dosis semanales durante seis meses. También recibe terapia física. La mejoría se notó ya en la segunda semana de tratamiento; la recuperación continúa durante todo el período de la terapia de la neuregulina. El paciente recupera satisfactoriamente la función sensorial y motora de su lado izquierdo. Esta recuperación se ve como excelente; y es mucho mejor que la que se había predicho clínicamente sin el uso de la terapia física por sí sola.

Ejemplo 7 : Tratamiento de accidente cerebrovascular isquémico

Un paciente se presenta al servicio de urgencias con una parálisis de la mano izquierda. El paciente informa de que el problema con su mano comenzó "hace más de una semana". Tras la evaluación y la formación de imágenes se determina que el paciente ha sufrido un accidente cerebrovascular isquémico. El paciente no recibe tPA. En el examen neurológico se encuentra que el paciente tiene parálisis residual de la mano izquierda, como se mide por medidas neurológicas normales de la actividad motora de la mano; el paciente tiene un déficit sensorial también. El paciente se niega a participar en la terapia física u ocupacional. El paciente se trata con neuregulina (de 0,01 a 1,0 mg/kg, IV) una vez por semana durante 12 semanas. La mejora de la función de la mano se mide periódicamente por un neurólogo u otro médico con pruebas neurológicas estándar, incluyendo el dinamómetro y otras pruebas de fuerza. La mejoría se notó ya en la segunda semana de tratamiento; una recuperación continúa durante todo el período de la terapia de la neuregulina. El paciente recupera satisfactoriamente la función motora y sensitiva en su mano izquierda sin el uso concomitante de terapia ocupacional o física. Esta recuperación es mejor que se habría predicho clínicamente sin terapia con neuregulina. Esta recuperación es mejor que se habría predicho clínicamente sin el uso de terapia ocupacional o física.

Ejemplo 8: Lesión cerebral traumática

Un paciente se presenta en un centro médico después de un evento traumático con signos y síntomas de una lesión en la cabeza y lesión cerebral resultante. Un cierto nivel de lesión cerebral se ha producido según la evaluación de imágenes y las pruebas neurológicas incluyendo la Escala de Glasgow Coma y pruebas neurocognitivas más detalladas. Cinco días después de la lesión, el paciente es evaluado neurológicamente y se demuestra que tiene déficits sensoriales y motores medibles. Este paciente se trata con neuregulina a una dosis de entre 0,01 y 1,0 mg/kg por dosis, por vía intravenosa durante 3 meses. Inicialmente, el paciente no está dispuesto a participar en la terapia física. La mejora de la función cerebral se nota ya en la primera semana de tratamiento; la recuperación continúa durante todo el período de la terapia con neuregulina. Esta recuperación es mejor que se habría predicho clínicamente sin terapia con neuregulina. A partir de los tres meses, el paciente comienza a recibir neuregulina una vez por semana, y también comienza a recibir terapia física. Las terapias concomitantes continúan durante hasta un año desde el día de la lesión original. En el aniversario de la lesión del paciente su recuperación es extraordinaria. Clínicamente es mucho mejor que la que habría sido anticipada en ausencia de cualquier terapia y es también mejor que la que se habría esperado con la utilización de la terapia física.

Ejemplo 9: Tratamiento de hemorragia cerebral:

Un paciente se presenta en un centro médico con signos y síntomas compatibles con un accidente cerebrovascular isquémico o hemorragia cerebral. El paciente se estabiliza. Tras la evaluación neurológica se encuentra que se ha producido algún nivel de lesión cerebral. Una semana después de la lesión se evalúa de nuevo al paciente neurológicamente y se demuestra que tiene déficits sensoriales y/o motores medibles. Este paciente se trata con neuregulina a una dosis de entre 0,01 y 1,0 mg/kg al día, por vía intravenosa durante 10 días, seguido de la administración de esta dosis semanalmente durante 2 meses, momento en el que se interrumpe todo el tratamiento.

La mejora de la función cerebral se nota ya en la primera semana de tratamiento; la recuperación continúa durante todo el período de la terapia con neuregulina. Tras el cese de la terapia con neuregulina la recuperación del paciente se considera clínicamente excelente. El paciente vuelve para la evaluación de seis meses y después de 12 meses desde la fecha de la lesión inicial; en cada evaluación la recuperación del paciente se considera clínicamente excelente.

5 Ejemplo 10: Tratamiento con NRG de lesión incluyendo el tratamiento en periodos semi-agudos y crónicos

Para un ensayo integral, los criterios de inclusión incluyen: adultos, hombres y mujeres, con evidencia clínica de lesión neuronal.

Indicaciones exploradas:

- 10 Accidente cerebrovascular isquémico con trombolíticos,
Accidente cerebrovascular isquémico sin trombolíticos,
Accidente cerebrovascular hemorrágico,
Lesión neuronal de traumatismo craneoencefálico cerrado,
Lesión neuronal de traumatismo penetrante

- 15 Intervalos de dosis explorados:
De 0,001 mg/kg a 10,0 mg/kg por dosis

Frecuencias de dosis exploradas:

al día

en días alternos

- 20 cada cuatro días
una vez por semana
una vez cada dos semanas
una vez al mes

Regímenes de periodicidad mixtos:

- 25 - al día durante una o dos semanas y luego semanal, quincenal o mensual para el resto del estudio
- en días alternos durante una o dos semanas y luego semanal, quincenal o mensual, a partir de entonces

Inicio del tratamiento explorado:

Tan pronto como sea posible después de la lesión

Dentro de las 6, 12, 24 y 48 horas después de la lesión

- 30 Después de 72 horas después de la lesión
7, 14, 30, 60, 90, 120 días después de la lesión

Duración del tratamiento explorado:

Tratamiento para 1, 2, 4, 10, 30 semanas.

Tratamiento para 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 meses

- 35 Función explorada:

función motora de la mano, función motora de la cara,
habla

función cognitiva

supervivencia

tiempo para volver al trabajo

La recuperación se mide por medidas neurológicas estándar.

Los eventos adversos son leves y bien tolerados.

5 Resultados: Los pacientes tratados con neuregulina muestran estadísticamente mayor mejora en la función mental, sensorial o muscular medida por metodologías conocidas en la técnica, en comparación con los pacientes tratados con placebo.

En realizaciones alternativas, se exploran combinaciones de menos de la totalidad de los parámetros anteriores.

Ejemplo 11: Tratamiento con NRG de accidente cerebrovascular isquémico con debilidad en las manos unilateral y/o parálisis (sin trombolisis):

10 Los criterios de inclusión son: adultos, hombres y mujeres, evidencia de accidente cerebrovascular basado en la pérdida de la conciencia, desorientación, dificultad para hablar, parálisis facial o de las extremidades. El accidente cerebrovascular isquémico es confirmado con imágenes radiográficas.

15 Los pacientes son seleccionados entre personas con debilidad en las manos unilateral y/o parálisis que no son candidatos para tPA (u otro trombolítico) o que no recibieron tPA previamente por cualquier motivo. Los consentimientos se obtienen de los pacientes y/o de alguna persona con autoridad para firmar por los pacientes.

Los pacientes se asignaron de forma aleatoria para recibir neuregulina o placebo comenzando tan pronto como se presentan a un centro médico, incluyendo hospitales o consultorios médicos; el diagnóstico se obtiene por las imágenes.

20 Para este ensayo, se inicia el tratamiento entre 1 hora y 7 días después de la lesión. El tratamiento se continuó durante 3 meses con la dosificación en días alternos durante 1 semana y luego semanalmente durante el resto del período de tratamiento. Los pacientes se dosifican con de 0,0001 a 1,0 mg por kg, IV, IM o SC.

La recuperación se mide por medidas neurológicas estándar de la actividad motora de la mano cada dos semanas durante la duración del estudio.

Los eventos adversos son leves y bien tolerados.

25 Resultados: Los pacientes tratados con la neuregulina muestran estadísticamente mayor mejoría en la función de la mano como se mide por métodos conocidos en la técnica, en comparación con los pacientes tratados con placebo.

Ejemplo 12: Tratamiento con NRG de parálisis facial periférica sin trombolíticos

30 Los pacientes son seleccionados según aquellas personas con parálisis facial periférica que no reciben trombolíticos o que no pueden recibirlos. La función se evalúa mediante metodologías conocidas en la técnica, en semanas alternas durante el período de dosificación de 3 meses. Los consentimientos son obtenidos de los pacientes y/o de una persona con autoridad para firmar por los pacientes.

35 Los pacientes se asignaron de forma aleatoria a recibir neuregulina o placebo. El tratamiento se inicia entre 1 hora y 7 días después de la lesión. El tratamiento se continuó durante 3 meses con dosificación en días alternos durante 1 semana y luego semanalmente durante el resto del período de tratamiento. Los pacientes se dosifican con de 0,0001 a 1,0 mg por kg, IV, IM o SC.

Los eventos adversos son leves y bien tolerados.

Resultados: Los pacientes tratados con neuregulina muestran estadísticamente una mayor mejoría en el movimiento facial que aquellos pacientes tratados con placebo.

Ejemplo 13: Tratamiento con NRG de afasia o disartria sin trombolíticos.

40 Los pacientes son seleccionados según aquellas personas con afasia o disartria que no reciben trombolíticos o que no pueden recibirlos. Función se evalúa mediante metodologías conocidas en la técnica en semanas alternas durante el periodo de dosificación de 3 meses. Los consentimientos son obtenidos de los pacientes y/o de alguna persona con autoridad para firmar por los pacientes.

45 Los pacientes se asignaron de forma aleatoria a recibir neuregulina o placebo. El tratamiento se inicia entre 1 hora y 7 días después de la lesión. El tratamiento se continúa durante 3 meses con dosificación en días alternos durante 1 semana y luego semanalmente durante el resto del período de tratamiento. Los pacientes se dosifican con de 0,0001 a 1,0 mg por kg, IV, IM o SC.

Los eventos adversos son leves y bien tolerados.

Resultados: Los pacientes tratados con neuregulina muestran estadísticamente una mayor mejoría en la capacidad del habla que los pacientes tratados con placebo.

Ejemplo 14: Tratamiento con NRG de accidente cerebrovascular isquémico (con trombolisis):

5 Los criterios de inclusión son: adultos, hombres y mujeres, evidencia de accidente cerebrovascular basado en pérdida de la conciencia, desorientación, dificultad para hablar, parálisis facial o de las extremidades. El accidente cerebrovascular isquémico se confirma con imágenes radiográficas.

Los pacientes son seleccionados según aquellas personas con debilidad en las manos unilateral y/o parálisis que son tratados con éxito con tPA u otro trombolítico. Los consentimientos son obtenidos de los pacientes y/o de alguna persona con autoridad para firmar por los pacientes

10 Los pacientes se asignan de forma aleatoria a recibir neuregulina o placebo comenzando tan pronto según se presentan a un centro médico, y el diagnóstico se completa por visualización de imágenes.

El tratamiento se inicia entre 1 hora y 7 días después de la lesión. El tratamiento se continuó durante 3 meses con la dosificación en días alternos durante 1 semana y luego semanalmente durante el resto del período de tratamiento. Los pacientes se dosifican con de 0,0001 a 1,0 mg por kg, IV, IM o SC.

15 La recuperación se mide por medidas neurológicas estándar de la actividad motora de la mano cada dos semanas durante la duración del estudio.

Los eventos adversos son generalmente leves y bien tolerados.

Resultados: Los pacientes tratados con neuregulina muestran estadísticamente mayor mejoría en la función de la mano como se mide por métodos conocidos en la técnica, en comparación con los pacientes tratados con placebo.

20 Ejemplo 15: Tratamiento con NRG de pacientes con parálisis periférica facial (con trombolíticos).

Los criterios de inclusión son: adultos, hombres y mujeres, evidencia de accidente cerebrovascular basado en la pérdida de la conciencia, desorientación, dificultad para hablar, parálisis facial o de las extremidades. El accidente cerebrovascular isquémico se confirma con las imágenes radiográficas. Los pacientes son seleccionados según aquellas personas con afasia o disartria y que sí recibieron trombolíticos.

25 El tratamiento se inicia entre 1 hora y 7 días después de la lesión. El tratamiento se continúa durante 3 meses con la dosificación en días alternos durante 1 semana y luego semanalmente durante el resto del período de tratamiento. Los pacientes se dosifican con de 0,0001 a 1,0 mg por kg, IV, IM o SC.

La función se evalúa mediante metodologías conocidas en la técnica, en semanas alternas durante el período de dosificación de 3 meses.

30 Los eventos adversos son leves y bien tolerados.

Resultados: Los pacientes tratados con neuregulina muestran estadísticamente una mayor mejoría en la capacidad del habla que los pacientes tratados con placebo.

Ejemplo 16: Tratamiento con NRG de pacientes con lesión cerebral traumática

35 Los criterios de inclusión son: adultos, hombres y mujeres, evidencia de lesión cerebral traumática con pérdida de conciencia, desorientación, dificultad para hablar, parálisis facial o de extremidades con pruebas o antecedentes de traumatismo. Se excluyeron los pacientes con evidencia de lesión penetrante. Los consentimientos son obtenidos de los pacientes y/o alguna persona con autoridad para firmar por los pacientes.

40 Los pacientes se asignaron de forma aleatoria a recibir neuregulina o placebo comenzando tan pronto como se presentaron en un centro médico, incluyendo hospitales o consultorios médicos; se obtienen el diagnóstico por visualización de imágenes y el consentimiento.

Para este ensayo se inicia el tratamiento entre 1 hora y 7 días después de la lesión. El tratamiento se continúa durante 3 meses con dosificación en días alternos durante 1 semana y luego semanalmente durante el resto del período de tratamiento. Los pacientes se dosifican con de 0,0001 a 1,0 mg por kg, IV, IM o SC.

La recuperación funcional se evalúa mediante metodologías conocidas en la técnica.

45 Los eventos adversos son leves y bien tolerados.

Resultados: Los pacientes tratados con neuregulina muestran estadísticamente una mayor mejoría que los pacientes tratados con placebo.

Ejemplo 17: Tratamiento con NRG de pacientes con lesiones penetrantes del cerebro

5 Los criterios de inclusión son: adultos, hombres y mujeres, evidencia de lesión cerebral traumática con pérdida de conciencia, desorientación, dificultad para hablar, parálisis facial o de extremidades con pruebas o antecedentes de traumatismo. Los consentimientos son obtenidos de los pacientes y/o de alguna persona con autoridad para firmar por los pacientes.

Los pacientes se estabilizan quirúrgicamente o a través de otras medidas. Se obtienen el diagnóstico y las imágenes.

Los pacientes se asignaron de forma aleatoria a recibir neuregulina o placebo comenzando tan pronto como se presentaban a una instalación médica, incluyendo hospitales o consultas médicas.

10 El tratamiento se inicia entre 1 hora y 7 días después de la lesión. El tratamiento se continúa durante 3 meses con dosificación en días alternos durante 1 semana y luego semanalmente durante el resto del período de tratamiento. Los pacientes se dosifican con de 0,0001 a 1,0 mg por kg, IV, IM o SC.

La recuperación funcional se evalúa mediante metodologías conocidas en la técnica.

Los eventos adversos son leves y bien tolerados.

15 Resultados: Los pacientes tratados con neuregulina muestran estadísticamente una mayor mejoría en la capacidad del habla que los pacientes tratados con placebo.

Ejemplo 18: Tratamiento con NRG de pacientes con accidente cerebrovascular hemorrágico:

20 Los criterios de inclusión son: adultos, hombres y mujeres, evidencia de accidente cerebrovascular basado en la pérdida de la conciencia, desorientación, dificultad para hablar, parálisis facial o de las extremidades. El accidente cerebrovascular hemorrágico se confirmó con imágenes radiográficas. Los consentimientos son obtenidos de los pacientes y/o de alguna persona con autoridad para firmar por los pacientes.

Los pacientes son seleccionados según aquellas personas con debilidad en las manos unilateral

25 Los pacientes se asignaron de forma aleatoria a recibir neuregulina o placebo comenzando tan pronto como se presentaban a un centro médico, incluyendo hospitales o consultorios médicos, se obtienen el diagnóstico de las imágenes y el consentimiento.

El tratamiento se inicia entre 1 hora y 7 días después de la lesión. El tratamiento se continúa durante 3 meses con dosificación en días alternos durante 1 semana y luego semanalmente durante el resto del período de tratamiento. Los pacientes se dosifican con de 0,0001 a 1,0 mg por kg, IV, IM o SC.

30 La recuperación se mide por medidas neurológicas estándar de la actividad motora de la mano cada dos semanas durante la duración del estudio.

Los eventos adversos son leves y bien tolerados.

Resultados: Los pacientes tratados con la neuregulina muestran estadísticamente mayor mejoría en la función de la mano como se mide por métodos conocidos en la técnica, en comparación con los pacientes tratados con placebo.

Ejemplo 19 - Kits:

35 Los kits comprenden una realización ejemplar de la invención. El kit puede comprender un receptáculo externo o recipiente configurado para alojar uno o más recipientes interiores/contenedores, utensilios y/o instrucciones. El utensilio puede comprender artículo(s) para administrar el fármaco, tales como parches, aparatos de inhalación, jeringas o agujas. Una composición de la invención puede estar comprendida dentro de un receptáculo de la invención. Un receptáculo de la invención pueden contener una cantidad suficiente de una composición de la invención que sea útil para múltiples dosis, o puede estar en forma de dosis unitaria o única. Los kits de la invención comprenden generalmente instrucciones para la administración de acuerdo con la presente invención. Cualquier modo de administración expuesto en el presente documento, o basado en éste, puede constituir una parte de las instrucciones. En una realización, las instrucciones indican que la composición de la invención debe ser tomada una, o más de una vez, durante el período posterior a la lesión semi-aguda. En una realización, las instrucciones indican que la composición de la invención debe ser tomada una, o más de una vez, durante el período posterior a la lesión crónica. Las instrucciones se pueden fijar a cualquier recipiente/receptáculo de la invención. Alternativamente, las instrucciones se pueden imprimir o grabar o formarse como un componente de un receptáculo de la invención.

40

45

Listado de secuencias

<110> CAGGIANO, ANTHONY IACI, JENNIFER

<120> Composiciones y métodos para tratamientos durante periodos no agudos después de lesiones neurológicas del SNC

5 <130> ACOR.P0041WO

<140> PCT/US2009/004692

<141> 2009-08-17

<150> 61/189,191

<151> 2008-08-15

10 <160> 42

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 198

<212> DNA

15 <213> Homo sapiens

<400> 1

```

catatgagcc atcttgtaaa atgtgctggag aaggagaaaa ctttctgtgt gaatggaggg      60
gagtgttca tgggtgaaaga cctttcaaac ccctcgagat acttgtgcaa gtgcccaaat      120
gagtttactg gtgatcgctg ccaaaactac gtaatggcca gcttctacaa ggcggaggag      180
ctgtaccagt aaggatcc                                     198
    
```

<210> 2

<211> 82

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met Gly Ser Ser His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
1          5          10
Arg Gly Ser His Met Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys
20         25         30
Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser
35         40         45
Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp
50         55         60
Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu
65         70         75         80
Tyr Gln
    
```

25 <210> 3

<211> 236

<212> DNA

<213> Homo sapiens 32.89 ±

ES 2 609 927 T3

```

<400> 3
cgataactag cagcatttcc tccaacgagg atccccgagg taagaagcta caccggccag      60
tggccggggc ccgataacta gcagcatttc ctccaacgag gatccccgag gtaagaagct      120
acaccggcca gtggccgggg ccgtggagcc gggggcatcc ggtgcctgag acagaggtgc      180
tcaaggcagt ctccaccttt tgtctcccct ctgcagagag ccacattctg gaagtt        236

<210> 4
<211> 2000
5 <212> DNA
  <213> Homo sapiens

<220>
<221> carac_misclánea
<222> (31)..(32)
10 <223> n es a, c, g, o t

<220>
<221> CDS
<222> (265)..(1530)

<400> 4
ggaattcctt tttttttttt tttttttctt nttttttttt tgcccttata cctcttcgcc      60
tttctgtggt tccatccact tcttccccct cctcctccca taaacaactc tctaccct      120
gcacccccaa taaataaata aaaggaggag ggcaaggggg caggaggagg agtggtgctc      180
cgaggggaag gaaaaggagg gcagcgcgag aagagccggg cagagtccga accgacagcc      240
agaagcccgc acgcacctcg cacc atg aga tgg cga cgc gcc ccg cgc cgc      291
                Met Arg Trp Arg Arg Ala Pro Arg Arg
                1                    5

tcc ggg cgt ccc ggc ccc cgg gcc cag cgc ccc ggc tcc gcc gcc cgc      339
Ser Gly Arg Pro Gly Pro Arg Ala Gln Arg Pro Gly Ser Ala Ala Arg
10                15                20                25

tcg tcg ccg ccg ctg ccg ctg ctg cca cta ctg ctg ctg ctg ggg acc      387
Ser Ser Pro Pro Leu Pro Leu Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Gly Thr
                30                35                40

gcg gcc ctg gcg ccg ggg gcg gcg gcc ggc aac gag gcg gct ccc gcg      435
Ala Ala Leu Ala Pro Gly Ala Ala Ala Ala Gly Asn Glu Ala Ala Pro Ala
                45                50                55

ggg gcc tcg gtg tgc tac tcg tcc ccg ccc agc gtg gga tcg gtg cag      483
Gly Ala Ser Val Cys Tyr Ser Ser Pro Pro Ser Val Gly Ser Val Gln
                60                65                70

gag cta gct cag cgc gcc gcg gtg gtg atc gag gga aag gtg cac ccg      531
Glu Leu Ala Gln Arg Ala Ala Val Val Ile Glu Gly Lys Val His Pro
                75                80                85

cag cgg ccg cag cag ggg gca ctc gac agg aag gcg gcg gcg gcg gcg      579
Gln Arg Arg Gln Gln Gly Ala Leu Asp Arg Lys Ala Ala Ala Ala Ala
90                95                100                105

ggc gag gca ggg gcg tgg ggc ggc gat cgc gag ccg cca gcc gcg ggc      627
Gly Glu Ala Gly Ala Trp Gly Gly Asp Arg Glu Pro Pro Ala Ala Gly
                110                115                120

15 cca cgg gcg ctg ggg ccg ccc gcc gag gag ccg ctg ctc gcc gcc aac      675

```

ES 2 609 927 T3

Pro	Arg	Ala	Leu	Gly	Pro	Pro	Ala	Glu	Glu	Pro	Leu	Leu	Ala	Ala	Asn	
			125					130					135			
ggg	acc	gtg	ccc	tct	tgg	ccc	acc	gcc	ccg	gtg	ccc	agc	gcc	ggc	gag	723
Gly	Thr	Val	Pro	Ser	Trp	Pro	Thr	Ala	Pro	Val	Pro	Ser	Ala	Gly	Glu	
		140					145					150				
ccc	ggg	gag	gag	gcg	ccc	tat	ctg	gtg	aag	gtg	cac	cag	gtg	tgg	gcg	771
Pro	Gly	Glu	Glu	Ala	Pro	Tyr	Leu	Val	Lys	Val	His	Gln	Val	Trp	Ala	
	155					160					165					
gtg	aaa	gcc	ggg	ggc	tgg	aag	aag	gac	tcg	ctg	ctc	acc	gtg	cgc	ctg	819
Val	Lys	Ala	Gly	Gly	Leu	Lys	Lys	Asp	Ser	Leu	Leu	Thr	Val	Arg	Leu	
	170				175					180					185	
ggg	acc	tgg	ggc	cac	ccc	gcc	ttc	ccc	tcc	tgc	ggg	agg	ctc	aag	gag	867
Gly	Thr	Trp	Gly	His	Pro	Ala	Phe	Pro	Ser	Cys	Gly	Arg	Leu	Lys	Glu	
				190					195					200		
gac	agc	agg	tac	atc	ttc	ttc	atg	gag	ccc	gac	gcc	aac	agc	acc	agc	915
Asp	Ser	Arg	Tyr	Ile	Phe	Phe	Met	Glu	Pro	Asp	Ala	Asn	Ser	Thr	Ser	
			205					210					215			
cgc	gcg	ccg	gcc	gcc	ttc	cga	gcc	tct	ttc	ccc	cct	ctg	gag	acg	ggc	963
Arg	Ala	Pro	Ala	Ala	Phe	Arg	Ala	Ser	Phe	Pro	Pro	Leu	Glu	Thr	Gly	
		220					225					230				
cgg	aac	ctc	aag	aag	gag	gtc	agc	cgg	gtg	ctg	tgc	aag	cgg	tgc	gcc	1011
Arg	Asn	Leu	Lys	Lys	Glu	Val	Ser	Arg	Val	Leu	Cys	Lys	Arg	Cys	Ala	
	235				240						245					
ttg	cct	ccc	caa	ttg	aaa	gag	atg	aaa	agc	cag	gaa	tcg	gct	gca	ggt	1059
Leu	Pro	Pro	Gln	Leu	Lys	Glu	Met	Lys	Ser	Gln	Glu	Ser	Ala	Ala	Gly	
					255					260					265	
tcc	aaa	cta	gtc	ctt	cgg	tgt	gaa	acc	agt	tct	gaa	tac	tcc	tct	ctc	1107
Ser	Lys	Leu	Val	Leu	Arg	Cys	Glu	Thr	Ser	Ser	Glu	Tyr	Ser	Ser	Leu	
				270					275					280		
aga	ttc	aag	tgg	ttc	aag	aat	ggg	aat	gaa	ttg	aat	cga	aaa	aac	aaa	1155
Arg	Phe	Lys	Trp	Phe	Lys	Asn	Gly	Asn	Glu	Leu	Asn	Arg	Lys	Asn	Lys	
			285					290					295			
cca	caa	aat	atc	aag	ata	caa	aaa	aag	cca	ggg	aag	tca	gaa	ctt	cgc	1203
Pro	Gln	Asn	Ile	Lys	Ile	Gln	Lys	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Glu	Leu	Arg	
		300					305					310				
att	aac	aaa	gca	tca	ctg	gct	gat	tct	gga	gag	tat	atg	tgc	aaa	gtg	1251
Ile	Asn	Lys	Ala	Ser	Leu	Ala	Asp	Ser	Gly	Glu	Tyr	Met	Cys	Lys	Val	
	315					320					325					
atc	agc	aaa	tta	gga	aat	gac	agt	gcc	tct	gcc	aat	atc	acc	atc	gtg	1299
Ile	Ser	Lys	Leu	Gly	Asn	Asp	Ser	Ala	Ser	Ala	Asn	Ile	Thr	Ile	Val	
					335					340					345	
gaa	tca	aac	gct	aca	tct	aca	tcc	acc	act	ggg	aca	agc	cat	ctt	gta	1347
Glu	Ser	Asn	Ala	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Thr	Gly	Thr	Ser	His	Leu	Val	
				350					355					360		
aaa	tgt	gcg	gag	aag	gag	aaa	act	ttc	tgt	gtg	aat	gga	ggg	gag	tgc	1395
Lys	Cys	Ala	Glu	Lys	Glu	Lys	Thr	Phe	Cys	Val	Asn	Gly	Gly	Glu	Cys	
			365					370					375			
ttc	atg	gtg	aaa	gac	ctt	tca	aac	ccc	tcg	aga	tac	ttg	tgc	aag	tgc	1443
Phe	Met	Val	Lys	Asp	Leu	Ser	Asn	Pro	Ser	Arg	Tyr	Leu	Cys	Lys	Cys	
		380					385					390				
cca	aat	gag	ttt	act	ggt	gat	cgc	tgc	caa	aac	tac	gta	atg	gcc	agc	1491
Pro	Asn	Glu	Phe	Thr	Gly	Asp	Arg	Cys	Gln	Asn	Tyr	Val	Met	Ala	Ser	

ES 2 609 927 T3

395	400	405'		
ttc tac agt acg tcc act ccc ttt ctg tct ctg cct gaa taggagcatg				1540
Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu				
410	415	420		
ctcagttggt gctgctttct tgttgctgca tctccctca gattccacct agagctagat				1600
gtgtcttacc agatctaata ttgactgcct ctgcctgtcg catgagaaca ttaacaaaag				1660
caattgtatt acttcctctg ttcgcgacta gttggctctg agatactaata aggtgtgtga				1720
ggctccggat gtttctggaa ttgatattga atgatgtgat acaaattgat agtcaatc				1780
aagcagtcaa atatgataat aaaggcattt caaagtctca cttttattga taaaataaaa				1840
atcattctac tgaacagtc cttctcttat acaatgacca catcctgaaa aggggtgttc				1900
taagctgtaa ccgatatgca cttgaaatga tggttaagtta attttgattc agaatgtgtt				1960
atttgtcaca ataacataat aaaaggaaaa aaaaaaaaa				2000

<210> 5

<211> 422

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 5

Met Arg Trp Arg Arg Ala Pro Arg Arg Ser Gly Arg Pro Gly Pro Arg
1 5 10 15

Ala Gln Arg Pro Gly Ser Ala Ala Arg Ser Ser Pro Pro Leu Pro Leu
20 25 30

Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Gly Thr Ala Ala Leu Ala Pro Gly Ala
35 40 45

Ala Ala Gly Asn Glu Ala Ala Pro Ala Gly Ala Ser Val Cys Tyr Ser
50 55 60

Ser Pro Pro Ser Val Gly Ser Val Gln Glu Leu Ala Gln Arg Ala Ala
65 70 75 80

Val Val Ile Glu Gly Lys Val His Pro Gln Arg Arg Gln Gln Gly Ala
85 90 95

Leu Asp Arg Lys Ala Ala Ala Ala Ala Gly Glu Ala Gly Ala Trp Gly
100 105 110

Gly Asp Arg Glu Pro Pro Ala Ala Gly Pro Arg Ala Leu Gly Pro Pro
115 120 125

Ala Glu Glu Pro Leu Leu Ala Ala Asn Gly Thr Val Pro Ser Trp Pro
130 135 140

Thr Ala Pro Val Pro Ser Ala Gly Glu Pro Gly Glu Glu Ala Pro Tyr
145 150 155 160

ES 2 609 927 T3

Leu Val Lys Val His Gln Val Trp Ala Val Lys Ala Gly Gly Leu Lys
 165 170 175

Lys Asp Ser Leu Leu Thr Val Arg Leu Gly Thr Trp Gly His Pro Ala
 180 185 190

Phe Pro Ser Cys Gly Arg Leu Lys Glu Asp Ser Arg Tyr Ile Phe Phe
 195 200 205

Met Glu Pro Asp Ala Asn Ser Thr Ser Arg Ala Pro Ala Ala Phe Arg
 210 215 220

Ala Ser Phe Pro Pro Leu Glu Thr Gly Arg Asn Leu Lys Lys Glu Val
 225 230 235 240

Ser Arg Val Leu Cys Lys Arg Cys Ala Leu Pro Pro Gln Leu Lys Glu
 245 250 255

Met Lys Ser Gln Glu Ser Ala Ala Gly Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys
 260 265 270

Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser Ser Leu Arg Phe Lys Trp Phe Lys Asn
 275 280 285

Gly Asn Glu Leu Asn Arg Lys Asn Lys Pro Gln Asn Ile Lys Ile Gln
 290 295 300

Lys Lys Pro Gly Lys Ser Glu Leu Arg Ile Asn Lys Ala Ser Leu Ala
 305 310 315 320

Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys Lys Val Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp
 325 330 335

Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr Ile Val Glu Ser Asn Ala Thr Ser Thr
 340 345 350

Ser Thr Thr Gly Thr Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys
 355 360 365

Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser
 370 375 380

Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp
 385 390 395 400

Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro
 405 410 415

Phe Leu Ser Leu Pro Glu
 420

<210> 6 32.89 ±
 <211> 198
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(195)

ES 2 609 927 T3

<400> 6
 agc cat ctt gtc aag tgt gca cag aag gag aaa act ttc tgt gtg aat 48
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Gln Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 1 5 10 15
 gga ggc gag tgc ttc atg gtg aaa gac ctt tca aat ccc tca aga tac 96
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 20 25 30
 ttg tgc aag tgc cca aat gag ttt act ggt gat cgc tgc caa aac tac 144
 Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr
 35 40 45
 gta atg gcc agc ttc tac agt acg tcc act ccc ttt ctg tct ctg cct 192
 Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro
 50 55 60
 gaa tag 198
 Glu
 65

<210> 7
 <211> 65
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Gln Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 1 5 10 15
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr
 35 40 45
 Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro
 50 55 60
 Glu
 65

10 <210> 8
 <211> 192
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

15 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(189)

<400> 8 32.89 ±
 agc cat ctt gtc aag tgt gca gag aag gag aaa act ttc tgt gtg aat 48
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 1 5 10 15
 gga ggc cag tgc ttc atg gtg aaa gac ctt tca aat ccc tca aga tac 96
 Gly Gly Gln Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 20 25 30
 ttg tgc aag tgc caa cct gga ttc act gga gcg aga tgt act gag aat 144
 Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn
 35 40 45
 gtg ccc atg aaa gtc caa acc caa gaa aaa gcg gag gag ctc tac taa 192
 Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Ala Glu Glu Leu Tyr
 50 55 60

<210> 9
 <211> 63

ES 2 609 927 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

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

5 <210> 10
<211> 183
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
10 <221> CDS
<222> (1)..(180)

<400> 10

agc cat ctt gtc aag tgt gca gag aag gag aaa act ttc tgt gtg aat	48
Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn	
1 5 10 15	
gga ggc gag tgc ttc atg gtg aaa gac ctt tca aat ccc tca aga tac	96
Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr	
20 25 30	
ttg tgc aag tgc cca aat gag ttt act ggt gat cgc tgc caa aac tac	144
Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr	
35 40 45	
gta atg gcc agc ttc tac aaa gcg gag gag ctc tac taa	183
Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr	
50 55 60	

15 <210> 11 32.89 ±
<211> 60
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

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

20 <210> 12
<211> 210
<212> DNA
<213> Homo sapiens

ES 2 609 927 T3

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(207)

<400> 12
 agc cat ctt gtc aag tgt gca gag aag gag aaa act ttc tgt gtg aat 48
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 1 5 10 15
 gga ggc gag tgc ttc atg gtg aaa gac ctt tca aat ccc tca aga tac 96
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 20 25 30
 ttg tgc aag tgc cca aat gag ttt act ggt gat cgc tgc caa aac tac 144
 Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr
 35 40 45
 gta atg gcc agc ttc tac aag cat ctt ggg att gaa ttt atg gag aaa 192
 Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys His Leu Gly Ile Glu Phe Met Glu Lys
 50 55 60
 gcg gag gag ctc tac taa 210
 Ala Glu Glu Leu Tyr
 65

5

<210> 13
 <211> 69
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 13
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 1 5 10 15
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr
 35 40 45
 Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys His Leu Gly Ile Glu Phe Met Glu Lys
 50 55 60
 Ala Glu Glu Leu Tyr
 65

15 <210> 14
 <211> 267
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 20 <222> (1)..(264)

ES 2 609 927 T3

<400> 14
 agc cat ctt gtc aag tgt gca gag aag gag aaa act ttc tgt gtg aat 48
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 1 5 10 15
 gga ggc gag tgc ttc atg gtg aaa gac ctt tca aat ccc tca aga tac 96
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 20 25 30
 ttg tgc aag tgc caa cct gga ttc act gga gcg aga tgt act gag aat 144
 Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn
 35 40 45
 gtg ccc atg aaa gtc caa acc caa gaa aag tgc cca aat gag ttt act 192
 Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr
 50 55 60
 ggt gat cgc tgc caa aac tac gta atg gcc agc ttc tac agt acg tcc 240
 Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser
 65 70 75 80
 act ccc ttt ctg tct ctg cct gaa tag 267
 Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu
 85

<210> 15
 <211> 88
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 1 5 10 15
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn
 35 40 45
 Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr
 50 55 60
 Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser
 65 70 75 80
 Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu
 85
 10

<210> 16
 <211> 252
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

15 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(249)

ES 2 609 927 T3

<400> 16
 agc cat ctt gtc aag tgt gca gag aag gag aaa act ttc tgt gtg aat 48
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 1 5 10 15
 gga ggc gag tgc ttc atg gtg aaa gac ctt tca aat ccc tca aga tac 96
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 20 25 30
 ttg tgc aag tgc caa cct gga ttc act gga gcg aga tgt act gag aat 144
 Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn
 35 40 45
 gtg ccc atg aaa gtc caa acc caa gaa aag tgc cca aat gag ttt act 192
 Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr
 50 55 60
 ggt gat cgc tgc caa aac tac gta atg gcc agc ttc tac aaa gcg gag 240
 Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu
 65 70 75 80
 gag ctc tac taa 252
 Glu Leu Tyr

<210> 17
 <211> 83
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 1 5 10 15
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn
 35 40 45
 Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr
 50 55 60
 Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu
 65 70 75 80

Glu Leu Tyr

<210> 18
 <211> 183
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(183)

ES 2 609 927 T3

<400> 18
 agc cat ctt gtc aag tgt gca gag aag gag aaa act ttc tgt gtg aat 48
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 1 5 10 15
 gga ggc gag tgc ttc atg gtg aaa gac ctt tca aat ccc tca aga tac 96
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 20 25 30
 ttg tgc aag tgc cca aat gag ttt act ggt gat cgc tgc caa aac tac 144
 Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr
 35 40 45
 gta atg gcc agc ttc tac aaa gcg gag gag ctc tac caa 183
 Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr Gln
 50 55 60

<210> 19
 <211> 61
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 1 5 10 15
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr
 35 40 45
 Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr Gln
 50 55 60

<210> 20
 10 <211> 50
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

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

<210> 21
 <211> 50
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens

ES 2 609 927 T3

<400> 21

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

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

Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn Val Pro Met Lys
35 40 45

Val Gln
50

<210> 22

<211> 330

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Met Arg Arg Asp Pro Ala Pro Gly Phe Ser Met Leu Leu Phe Gly Val
1 5 10 15

Ser Leu Ala Cys Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser Val Gln Asp Gln Ala
20 25 30

Tyr Lys Ala Pro Val Val Val Glu Gly Lys Val Gln Gly Leu Val Pro
35 40 45

Ala Gly Gly Ser Ser Ser Asn Ser Thr Arg Glu Pro Pro Ala Ser Gly
50 55 60

Arg Val Ala Leu Val Lys Val Leu Asp Lys Trp Pro Leu Arg Ser Gly
65 70 75 80

Gly Leu Gln Arg Glu Gln Val Ile Ser Val Gly Ser Cys Val Pro Leu
85 90 95

Glu Arg Asn Gln Arg Tyr Ile Phe Phe Leu Glu Pro Thr Glu Gln Pro

ES 2 609 927 T3

100 105 110

Leu Val Phe Lys Thr Ala Phe Ala Pro Leu Asp Thr Asn Gly Lys Asn
 115 120 125

Leu Lys Lys Glu Val Gly Lys Ile Leu Cys Thr Asp Cys Ala Thr Arg
 130 135 140

Pro Lys Leu Lys Lys Met Lys Ser Gln Thr Gly Gln Val Gly Glu Lys
 145 150 155 160

Gln Ser Leu Lys Cys Glu Ala Ala Ala Gly Asn Pro Gln Pro Ser Tyr
 165 170 175

Arg Trp Phe Lys Asp Gly Lys Glu Leu Asn Arg Ser Arg Asp Ile Arg
 180 185 190

Ile Lys Tyr Gly Asn Gly Arg Lys Asn Ser Arg Leu Gln Phe Asn Lys
 195 200 205

Val Lys Val Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Val Cys Glu Ala Glu Asn Ile
 210 215 220

Leu Gly Lys Asp Thr Val Arg Gly Arg Leu Tyr Val Asn Ser Val Ser
 225 230 235 240

Thr Thr Leu Ser Ser Trp Ser Gly His Ala Arg Lys Cys Asn Glu Thr
 245 250 255

Ala Lys Ser Tyr Cys Val Asn Gly Gly Val Cys Tyr Tyr Ile Glu Gly
 260 265 270

Ile Asn Gln Leu Ser Cys Lys Cys Pro Asn Gly Phe Phe Gly Gln Arg
 275 280 285

Cys Leu Glu Lys Leu Pro Leu Arg Leu Tyr Met Pro Asp Pro Lys Gln
 290 295 300

Ser Val Leu Trp Asp Thr Pro Gly Thr Gly Val Ser Ser Ser Gln Trp
 305 310 315 320

Ser Thr Ser Pro Ser Thr Leu Asp Leu Asn
 325 330

<210> 23
 <211> 298
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 23
 Met Arg Arg Asp Pro Ala Pro Gly Phe Ser Met Leu Leu Phe Gly Val
 1 5 10 15

ES 2 609 927 T3

Ser Leu Ala Cys Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser Val Gln Asp Gln Ala
 20 25 30
 Tyr Lys Ala Pro Val Val Val Glu Gly Lys Val Gln Gly Leu Val Pro
 35 40 45
 Ala Gly Gly Ser Ser Ser Asn Ser Thr Arg Glu Pro Pro Ala Ser Gly
 50 55 60
 Arg Val Ala Leu Val Lys Val Leu Asp Lys Trp Pro Leu Arg Ser Gly
 65 70 75 80
 Gly Leu Gln Arg Glu Gln Val Ile Ser Val Gly Ser Cys Val Pro Leu
 85 90 95
 Glu Arg Asn Gln Arg Tyr Ile Phe Phe Leu Glu Pro Thr Glu Gln Pro
 100 105 110
 Leu Val Phe Lys Thr Ala Phe Ala Pro Leu Asp Thr Asn Gly Lys Asn
 115 120 125
 Leu Lys Lys Glu Val Gly Lys Ile Leu Cys Thr Asp Cys Ala Thr Arg
 130 135 140
 Pro Lys Leu Lys Lys Met Lys Ser Gln Thr Gly Gln Val Gly Glu Lys
 145 150 155 160
 Gln Ser Leu Lys Cys Glu Ala Ala Ala Gly Asn Pro Gln Pro Ser Tyr
 165 170 175
 Arg Trp Phe Lys Asp Gly Lys Glu Leu Asn Arg Ser Arg Asp Ile Arg
 180 185 190
 Ile Lys Tyr Gly Asn Gly Arg Lys Asn Ser Arg Leu Gln Phe Asn Lys
 195 200 205
 Val Lys Val Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Val Cys Glu Ala Glu Asn Ile
 210 215 220
 Leu Gly Lys Asp Thr Val Arg Gly Arg Leu Tyr Val Asn Ser Val Ser
 225 230 235 240
 Thr Thr Leu Ser Ser Trp Ser Gly His Ala Arg Lys Cys Asn Glu Thr
 245 250 255
 Ala Lys Ser Tyr Cys Val Asn Gly Gly Val Cys Tyr Tyr Ile Glu Gly
 260 265 270
 Ile Asn Gln Leu Ser Cys Lys Cys Pro Val Gly Tyr Thr Gly Asp Arg
 275 280 285
 Cys Gln Gln Phe Ala Met Val Asn Phe Ser
 290 295

- 5 <210> 24
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético

ES 2 609 927 T3

<400> 24

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

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

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

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

<210> 25

<211> 61

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 25

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

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

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

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

<210> 26

<211> 60

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Péptido sintético

<400> 26

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

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

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

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

<210> 27

<211> 71

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Péptido sintético

ES 2 609 927 T3

<400> 27

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

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

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

Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys His Leu Gly Ile Glu Phe Met Glu
50 55 60

Ala Glu Glu Leu Tyr Gln Lys
65 70

<210> 28

<211> 50

5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 28

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

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

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

Phe Tyr
50

10

<210> 29

<211> 50

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

15

<400> 29

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

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

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

Phe Tyr
50

20

<210> 30

<211> 69

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 609 927 T3

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 30

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

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

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

Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys His Leu Gly Ile Glu Phe Met Glu Lys
50 55 60

Ala Glu Glu Leu Tyr
65

5

<210> 31

<211> 50

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Péptido sintético

<400> 31

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

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

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

Phe Tyr
50

15

<210> 32

<211> 65

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Péptido sintético

<400> 32

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

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

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

Val Pro Met Lys Val Gln Asn Gln Glu Lys Ala Glu Glu Leu Tyr Gln
50 55 60

Lys
65

ES 2 609 927 T3

<210> 33
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 33
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 1 5 10 15
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn
 35 40 45
 Val Pro Met Lys Val Gln Asn Gln Glu Lys Ala Glu Glu Leu Tyr
 50 55 60

10 <210> 34
 <211> 50
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

15 <400> 34
 Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys
 1 5 10 15
 Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys
 20 25 30
 Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn Val Pro Met Lys
 35 40 45
 Val Gln
 50

20 <210> 35
 <211> 50
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

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

25 <210> 36
 <211> 83

ES 2 609 927 T3

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

5 <400> 36
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 1 5 10 15
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn
 35 40 45
 Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr
 50 55 60
 Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu
 65 70 75 80
 Glu Leu Tyr

10 <210> 37
 <211> 88
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético

15 <400> 37
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 1 5 10 15
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn
 35 40 45
 Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr
 50 55 60
 Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser
 65 70 75 80
 Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu
 85

20 <210> 38
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético

ES 2 609 927 T3

<400> 38

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

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

<210> 39

<211> 61

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 39

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

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

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

10 Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu
 50 55 60

<210> 40

<211> 61

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Péptido sintético

<400> 40

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

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

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

Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu
 50 55 60

20 <210> 41

<211> 65

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

25 <400> 41

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

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

ES 2 609 927 T3

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

Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro
50 55 60

Glu
65

<210> 42

<211> 53

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 42

Asn Ser Asp Ser Glu Cys Pro Leu Ser His Asp Gly Tyr Cys Leu His
1 5 10 15

Asp Gly Val Cys Met Tyr Ile Glu Ala Leu Asp Lys Tyr Ala Cys Asn
20 25 30

Cys Val Val Gly Tyr Ile Gly Glu Arg Cys Gln Tyr Arg Asp Leu Lys
35 40 45

Trp Trp Glu Leu Arg
50

10

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico (tipo EGF) para su uso en el tratamiento de:

5 (i) una lesión neuronal a un mamífero, en donde el polipéptido que comprende un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico (tipo EGF) se administra después de una lesión neuronal en dicho mamífero; y en donde la administración se inicia después de la ventana semi-aguda después de la lesión neuronal;

10 (ii) una lesión neuronal a un mamífero, en donde el polipéptido que comprende un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico (tipo EGF) se administra después de una lesión neuronal en dicho mamífero; la administración se inicia en menos de seis horas después de la lesión neuronal; y la administración continúa en un periodo de tiempo de más de 72 horas después de la lesión;

(iii) una lesión neuronal isquémica del sistema nervioso central en un mamífero, en donde el péptido se administra después de una lesión neuronal en dicho mamífero; y la administración se inicia después de que el mamífero ha alcanzado un volumen completo de muerte celular por lesión isquémica después de la lesión; o

15 (iv) una lesión neuronal a un mamífero, en donde el polipéptido que comprende un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico (tipo EGF) se administra después de una lesión neuronal en dicho mamífero; y en donde la administración se inicia durante la ventana semi-aguda y después todavía continúa, después de la lesión neuronal,

en donde el dominio tipo EGF es codificado por el gen de la neuregulina (NRG)-1, gen (NRG)-2, gen (NRG)-3 o gen (NRG)-4.

20 2. El polipéptido para uso de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico (tipo EGF) para su uso en el tratamiento de una lesión neuronal a un mamífero, en donde el polipéptido que comprende un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico (tipo EGF) se administra después de la lesión neuronal en dicho mamífero; y en donde la administración se inicia después de la ventana semi aguda después de la lesión neuronal.

25 3. El polipéptido para su uso de la reivindicación 2, en donde la administración se inicia al menos tres días después de la lesión neuronal.

4. El polipéptido para su uso de la reivindicación 3, en donde la administración se inicia al menos siete días después de la lesión neuronal.

30 5. El polipéptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico (tipo EGF) para su uso en el tratamiento de una lesión neuronal a un mamífero, en donde el polipéptido que comprende un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico (tipo EGF) se administra después de la lesión neuronal en dicho mamífero; la administración se inicia en menos de seis horas después de la lesión neuronal; y la administración continúa en un periodo de tiempo de más de 72 horas después de la lesión.

6. El polipéptido para uso de tanto la reivindicación 2 como 5, en donde dicho mamífero es un ser humano.

35 7. El polipéptido para uso de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico (tipo EGF) para su uso en el tratamiento de una lesión neuronal isquémica del sistema nervioso central en un mamífero, en donde el péptido se administra después de la lesión neuronal en dicho mamífero; y la administración se inicia después de que el mamífero ha alcanzado un volumen completo de muerte celular por lesión isquémica después de la lesión.

40 8. El polipéptido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2, 5 ó 7, en donde dicho polipéptido es GGF2.

9. El polipéptido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en donde el polipéptido se administra mediante inyección intravenosa a un nivel de dosis en el intervalo de 0,001 mg/kg a 10 mg/kg.

45 10. El polipéptido para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en donde la lesión neuronal es un accidente cerebrovascular isquémico.

50 11. El polipéptido para uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico (tipo EGF) para su uso en el tratamiento de una lesión neuronal a un mamífero, en donde el polipéptido que comprende un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico (tipo EGF) se administra después de la lesión neuronal en dicho mamífero; y en donde la administración se inicia durante la ventana semi aguda y después todavía continúa, después de la lesión neuronal.

12. El uso de un polipéptido que comprende un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico (tipo EGF) en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de:

- (i) una lesión neuronal a un mamífero, en donde el polipéptido que comprende un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico (tipo EGF) se administra después de una lesión neuronal en dicho mamífero; y en donde la administración se inicia después de la ventana semi-aguda después de la lesión neuronal;
- 5 (ii) una lesión neuronal a un mamífero, en donde el polipéptido que comprende un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico (tipo EGF) se administra después de una lesión neuronal en dicho mamífero; la administración se inicia en menos de seis horas después de la lesión neuronal; y la administración continúa en un periodo de tiempo de más de 72 horas después de la lesión; o
- 10 (iii) una lesión neuronal isquémica del sistema nervioso central en un mamífero, en donde el péptido se administra después de una lesión neuronal en dicho mamífero; y la administración se inicia después de que el mamífero ha alcanzado un volumen completo de muerte celular por lesión isquémica después de la lesión; o
- (iv) una lesión neuronal a un mamífero, en donde el polipéptido que comprende un dominio tipo factor de crecimiento epidérmico (tipo EGF) se administra después de una lesión neuronal en dicho mamífero; y en donde la administración se inicia durante la ventana semi-aguda y después todavía continúa, después de la lesión neuronal,
- 15 en donde el dominio tipo EGF es codificado por el gen de la neuregulina (NRG)-1, gen (NRG)-2, gen (NRG)-3 o gen (NRG)-4.

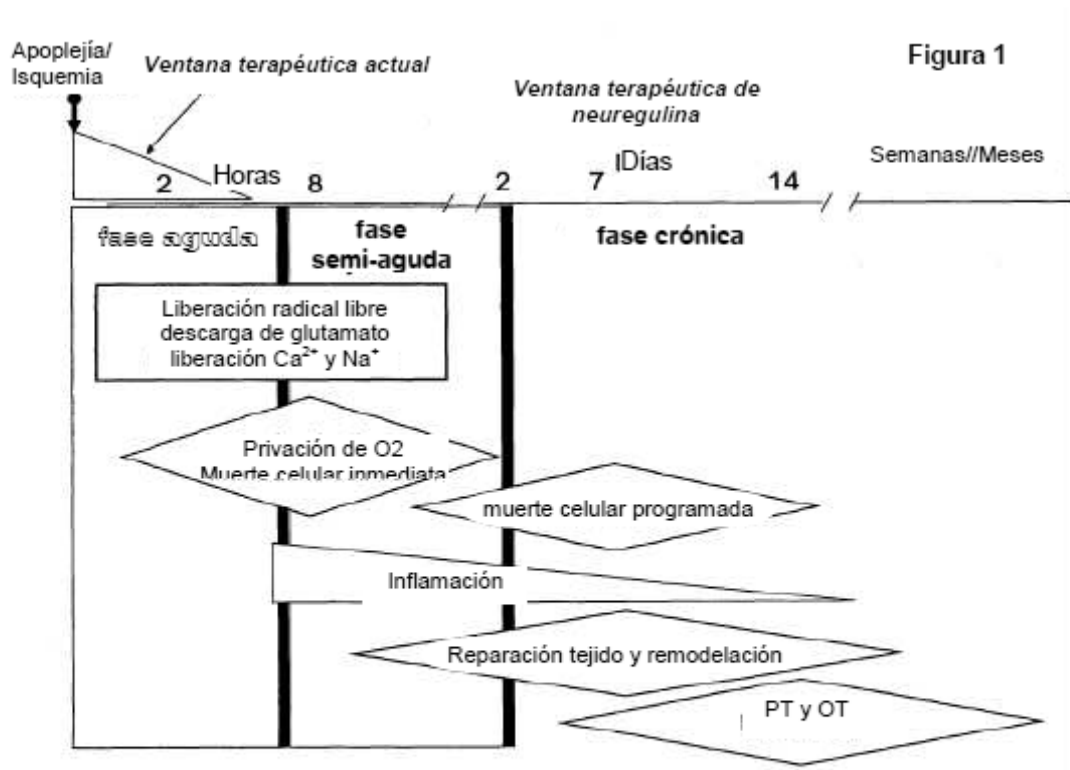
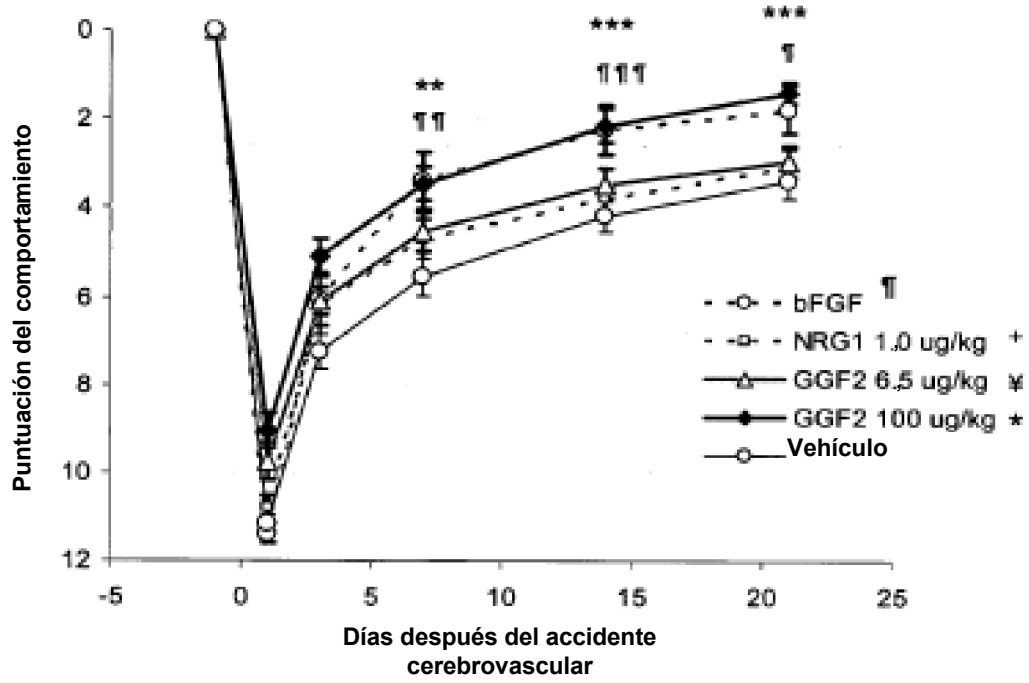


Figura 2



p<0,05
 p<0,01
 p<0,005

Figura 3

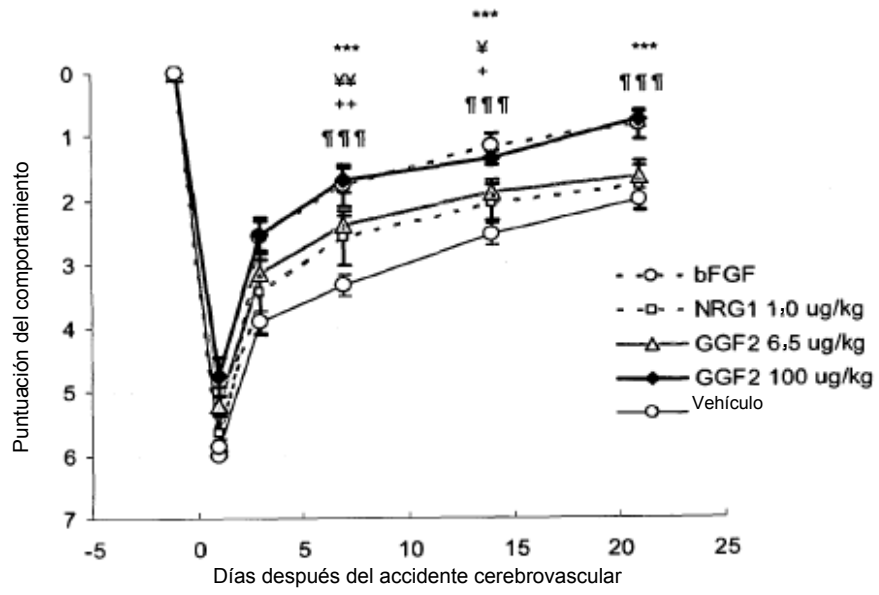


Figura 4

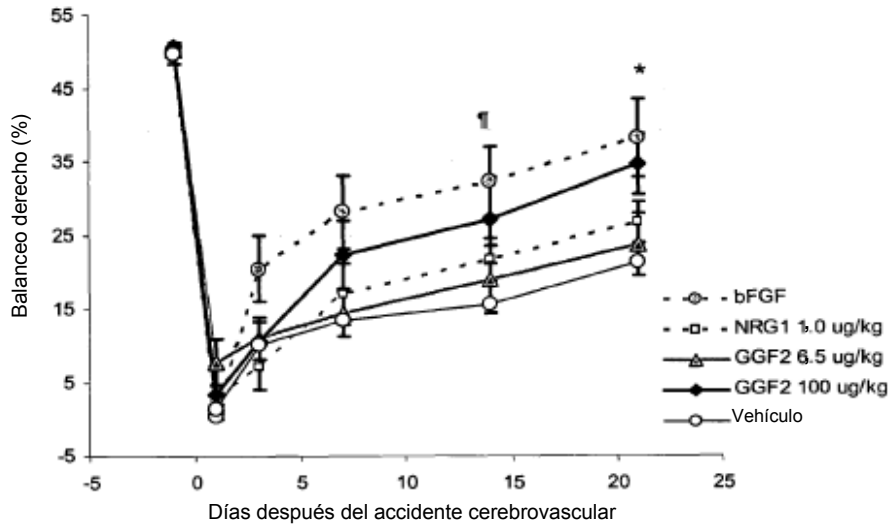
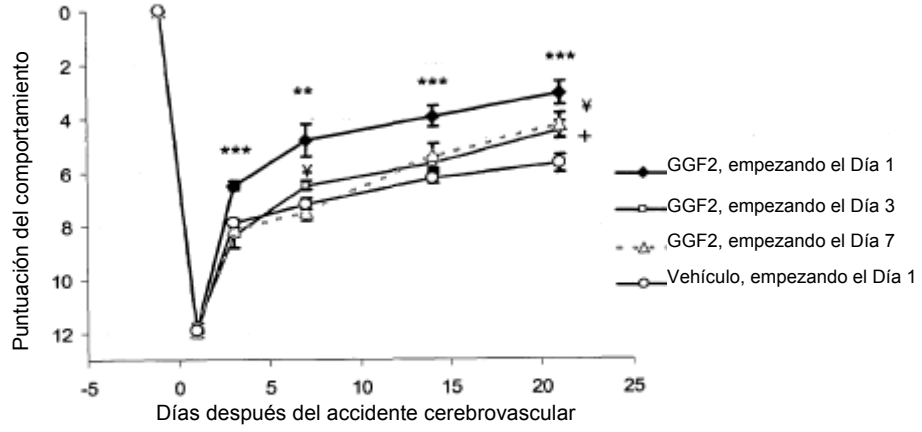


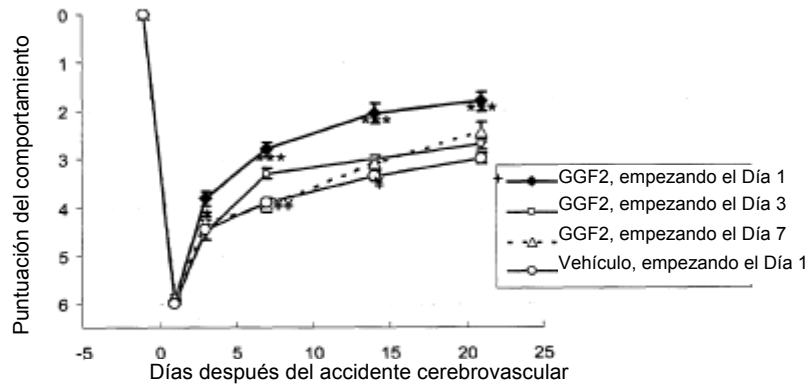
Figura 5A



* -Día 1 tratamiento
 † .Día 3 tratamiento
 + .Día 7 tratamiento

*** p < 0.001
 ** p < 0.01
 * P < 0.05

Figura 5B



* -Día 1 tratamiento * p < 0,05
 ✕ -Día 3 tratamiento ** p < 0,005
 + -Día 7 tratamiento *** p < 0,0001

Figura 5C

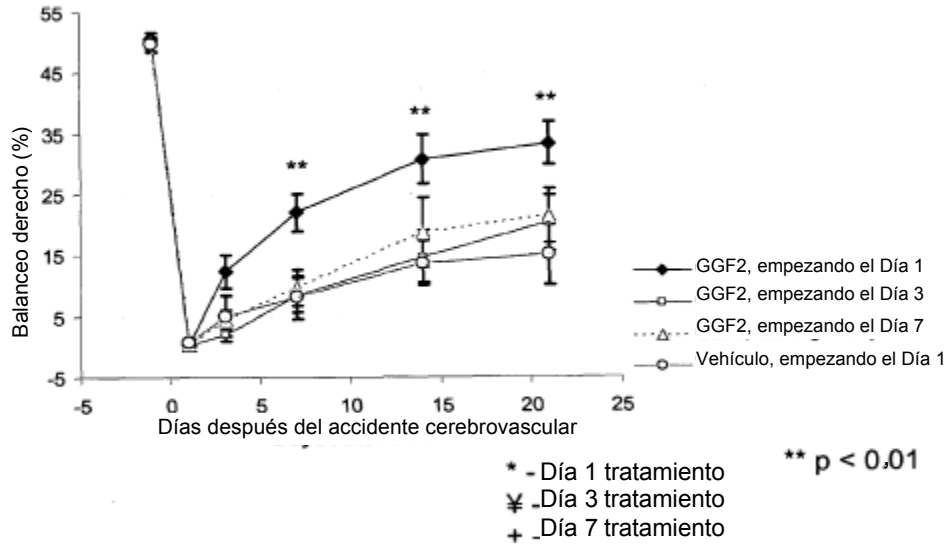


Figura 6A

Secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos deducida de GGF2HBS5

```

GGAAATCCCTT TTTTTTTTTT TTTTTTCTT NTTTTTTTTT TGCCCTTATA CCTCTTCGCC      60
TTTCTGTGGT TCCATCCACT TCTTCCCTCT CCTCTTCCA TAAACAACTC TCCTACCCCT      120
GCACCCCCAA TAATAAATA AAAGGAGGAG GCAAGGGGG GAGGAGGAGG AGTGGTGCTG      180
CGAGGGGAAG GAAAAGGGAG GCAGCGCGAG AAGAGCCGGG CAGAGTCCGA ACCGACAGCC      240
AGAAGCCCGC ACCCACCTCG CACC ATG AGA TGG CGA CGC GCC CCG CGC CGC      291
Met Arg Trp Arg Arg Ala Pro Arg Arg
TCC GGG CGT CCC GGC CCC CGG GCC CAG CGC CCC GGC TCC GCC GCC CGC      339
Ser Gly Arg Pro Gly Pro Arg Ala Gln Arg Pro Gly Ser Ala Ala Arg
TCG TCG CCG CCG CTG CCG CTG CTG CCA CTA CTG CTG CTG CTG GGG ACC      387
Ser Ser Pro Pro Leu Pro Leu Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Gly Thr
Val Cys Leu Leu Thr Val
GGF-II 09
GCG GCC CTG GCG CCG GGG GCG GCG GCC GGC AAC GAG GCG GCT CCC GCG      435
Ala Ala Leu Ala Pro Gly Ala Ala Ala Gly Asn Glu Ala Ala Pro Ala
Ala Ala Leu Pro Pro
GGG GCC TCG GTG TGC TAC TCG TCC CCG CCC AGC GTG GGA TCG GTG CAG      483
Gly Ala Ser Val Cys Tyr Ser Ser Pro Pro Ser Val Gly Ser Val Gln
Ala Ser Pro Val Ser Val Gly Ser Val Gln
GGF-II 08
GAG CTA GCT CAG CGC GCC GCC GTG GTG ATC GAG GGA AAG GTG CAC CCG      531
Glu Leu Ala Gln Arg Ala Ala Val Val Ile Glu Gly Lys Val His Pro
Glu Leu Val Gln Arg Trp Phe Val Val Ile Glu Gly Lys
GGF-II 04

```

Figura 6B

Secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos deducida de GGF2HBS5

CAG CGG CCG CAG CAG GGG GCA CTC GAC AGG AAG GCG GCG GCG GCG GCG	579
Gln Arg Arg Gln Gln Gly Ala Leu Asp Arg Lys Ala Ala Ala Ala Ala	
GGC GAG OCA GGG CCG TGG GGC GGC GAT CCG GAG CCG CCA GCC GCG GGC	627
Gly Glu Ala Gly Ala Trp Gly Gly Asp Arg Glu Pro Pro Ala Ala Gly	
CCA CCG GCG CTG GGG CCG CCC GCC GAG GAG CCG CTG CTC GCC GCC AAC	675
Pro Arg Ala Leu Gly Pro Pro Ala Glu Glu Pro Leu Leu Ala Ala Asn	
GGG ACC GTG CCC TCT TGG CCC ACC GCC CCG GTG CCC AGC GCC GGC GAG	723
Gly Thr Val Pro Ser Trp Pro Thr Ala Pro Val Pro Ser Ala Gly Glu	
CCC GGG GAG GAG GCG CCC TAT CTG GTG AAG GTG CAC CAG GTG TGG GCG	771
Pro Gly Glu Glu Ala Pro Tyr Leu Val Lys Val His Gln Val Trp Ala	
Lys Val His Glu Val Trp Ala	
GGF-II 01 & GGF-II 11	
GTG AAA GCC GGG GGC TTG AAG AAG GAC TCG CTG CTC ACC GTG CCG CTG	819
Val Lys Ala Gly Gly Leu Lys Lys Asp Ser Leu Leu Thr Val Arg Leu	
Ala Lys Asp Leu Leu Leu Xaa Val Leu	
GGF-II 10	
GGG ACC TGG GGC CAC CCC GCC TTC CCC TCC TGC GGG AGG CTC AAG GAG	867
Gly Thr Trp Gly His Pro Ala Phe Pro Ser Cys Gly Arg Leu Lys Glu	
Gly Ala Trp Gly Pro Ala Phe Pro Val Xaa Tyr	
GGF-II 03	
GAC AGC AGG TAC ATC TTC TTC ATG GAG CCC GAC GCC AAC AGC ACC AGC	915
Asp Ser Arg Tyr Ile Phe Phe Met Glu Pro Asp Ala Asn Ser Thr Ser	
Tyr Ile Phe Phe Met Glu Pro Glu Ala Xaa Ser Ser Gly	
GGF-II 02	

Figura 6C

Secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos deducida de GGF2HBS5

CGC GCG CCG GCC GGC TTC CGA GCC TCT TTC CCC CCT CTG GAG ACG GGC	963
Arg Ala Pro Ala Ala Phe Arg Ala Ser Phe Pro Pro Leu Glu Thr Gly	
CGG AAC CTC AAG AAG GAG GTC AGC CGG GTG CTG TGC AAG CGG TGC GCC	1011
Arg Asn Leu Lys Lys Glu Val Ser Arg Val Leu Cys Lys Arg Cys Ala	
TTG CCT CCC CAA TTG AAA GAG ATG AAA AGC CAG GAA TCG GCT GCA GGT	1059
Leu Pro Pro Gln Leu Lys Glu Met Lys Ser Gln Glu Ser Ala Ala Gly	
TCC AAA CTA GTC CTT CGG TGT GAA ACC AGT TCT GAA TAC TCC TCT CTC	1107
Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser Ser Leu	
Leu Val Leu Arg	
GGF-II 06	
AGA TTC AAG TGG TTC AAG AAT GGG AAT GAA TTG AAT CGA AAA AAC AAA	1155
Arg Phe Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu Asn Arg Lys Asn Lys	
CCA CAA AAT ATC AAG ATA CAA AAA AAG CCA GGG AAG TCA GAA CTT CGC	1203
Pro Gln Asn Ile Lys Ile Gln Lys Lys Pro Gly Lys Ser Glu Leu Arg	
ATT AAC AAA GCA TCA CTG GCT GAT TCT GGA GAG TAT ATG TGC AAA GTG	1251
Ile Asn Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys Lys Val	
Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Met Xaa Lyx	
GGF-II 12	
ATC AGC AAA TTA GGA AAT GAC AGT GCC TCT GCC AAT ATC ACC ATC GTG	1299
Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr Ile Val	
GAA TCA AAC GCT ACA TCT ACA TCC ACC ACT GGG ACA AGC CAT CTT GTA	1347
Glu Ser Asn Ala Thr Ser Thr Ser Thr Thr Gly Thr Ser His Leu Val	

ES 2 609 927 T3

Figura 6D

Secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos deducida de GGF2HBS5

AAA TGT GCG GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT GGA GGG GAG TGC	1395
Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys	
TTC ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAC CCC TCG AGA TAC TTG TGC AAG TGC	1443
Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys	
CCA AAT GAG TTT ACT GGT GAT CGC TGC CAA AAC TAC GTA ATG GCC AGC	1491
Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser	
TTC TAC AGT ACG TCC ACT CCC TTT CTG TCT CTG CCT GAA	1530
Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu	
TAGGAGCATG CTCAGTTGGT GCTGCTTCT TGTGCTGCA TCTCCCTCA GATCCACCT	1590
AGAGCTAGAT GTGTCTTACC AGATCTAATA TTGACTGCCT CTGCCTGTCC CATGAGAACA	1650
TTAACAAAAG CAATTGTATT ACTTCCCTCG TTCGGACTA GPTGGCTCTG AGATACTAAT	1710
AGGTGTGTGA GGCTCCGGAT GTTCTCGAA TTGATATTGA ATGATGTGAT ACAAAATTGAT	1770
AGTCAATATC AAGCAGTGAA ATATGATAAT AAAGGCATTT CAAAGTCTCA CTTTATTGA	1830
TAAATAAAA ATCATCTAC TGAACAGTCC ATCTTCTTTA TACAATGACC ACATCCTGAA	1890
AAGGGTGTG CTAAGCTGTA ACCGATATGC ACTTGAATG ATGGTAAGTT AATTTTGATT	1950
CAGAATGTGT TATTTGTCAC AAATTAACAT AATAAAAGGA AAAAAAAAAA AAA	2003

Figura 7

EGFL1

AGC CAT CTT GTC AAG TGT GCA GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT	48
Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn	
GGA GGC GAG TGC TTC ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAT CCC TCA AGA TAC	96
Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr	
TTG TGC AAG TGC CCA AAT GAG TTT ACT GGT GAT CGC TGC CAA AAC TAC	144
Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr	
GTA ATG GCC AGC TTC TAC AGT ACG TCC ACT CCC TTT CTG TCT CTG CCT	192
Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro	
GAA TAG	198
Glu	

Figura 8

EGFL2

AGC	CAT	CTT	GTC	AAG	TGT	GCA	GAG	AAG	GAG	AAA	ACT	TTC	TGT	GTG	AAT	48
Ser	His	Leu	Val	Lys	Cys	Ala	Glu	Lys	Glu	Lys	Thr	Phe	Cys	Val	Asn	
GGA	GGC	GAG	TGC	TTC	ATG	GTG	AAA	GAC	CTT	TCA	AAT	CCC	TCA	AGA	TAC	96
Gly	Gly	Glu	Cys	Phe	Met	Val	Lys	Asp	Leu	Ser	Asn	Pro	Ser	Arg	Tyr	
TTG	TGC	AAG	TGC	CAA	CCT	GGA	TTC	ACT	GGA	GCG	AGA	TGT	ACT	GAG	AAT	144
Leu	Cys	Lys	Cys	Gln	Pro	Gly	Phe	Thr	Gly	Ala	Arg	Cys	Thr	Glu	Asn	
GTG	CCC	ATG	AAA	OTC	CAA	ACC	CAA	GAA	AAA	GCG	GAG	GAG	CTC	TAC	TAA	192
Val	Pro	Met	Lys	Val	Gln	Thr	Gln	Glu	Lys	Ala	Glu	Glu	Leu	Tyr		

Figura 9

EGFL3

AGC	CAT	CTT	GTC	AAG	TGT	GCA	GAG	AAG	GAG	AAA	ACT	TTC	TGT	GTG	AAT	48
Ser	His	Leu	Val	Lys	Cys	Ala	Glu	Lys	Glu	Lys	Thr	Phe	Cys	Val	Asn	
GGA	GGC	GAG	TGC	TTC	ATG	GTG	AAA	GAC	CTT	TCA	AAT	CCC	TCA	AGA	TAC	96
Gly	Gly	Glu	Cys	Phe	Met	Val	Lys	Asp	Leu	Ser	Asn	Pro	Ser	Arg	Tyr	
TTG	TGC	AAG	TGC	CCA	AAT	GAG	TTT	ACT	GGT	GAT	CGC	TGC	CAA	AAC	TAC	144
Leu	Cys	Lys	Cys	Pro	Asn	Glu	Phe	Thr	Gly	Asp	Arg	Cys	Gln	Asn	Tyr	
GTA	ATG	GCC	AGC	TTC	TAC	AAA	GCC	GAG	GAG	CTC	TAC	TAA				183
Val	Met	Ala	Ser	Phe	Tyr	Lys	Ala	Glu	Glu	Leu	Tyr					

Figura 10

EGFL4

AGC CAT CTT GTC AAG TGT GCA GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT	48
Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn	
GGA GGC GAG TGC TTC ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAT CCC TCA AGA TAC	96
Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr	
TTG TGC AAG TGC CCA AAT GAG TTT ACT GGT GAT CGC TGC CAA AAC TAC	144
Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr	
GTA ATG GCC AGC TTC TAC AAG CAT CTT GGG ATT GAA TTT ATG GAG AAA	192
Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys His Leu Gly Ile Glu Phe Met Glu Lys	
GCG GAG GAG CTC TAC TAA	210
Ala Glu Glu Leu Tyr	

Figura 11

EGFL5

AGC CAT CTT GTC AAG TGT GCA GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT	48
Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn	
GGA GGC GAG TGC TTC ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAT CCC TCA AGA TAC	96
Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr	
TTG TGC AAG TGC CAA CCT GGA TTC ACT GGA GCG AGA TGT ACT GAG AAT	144
Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn	
GTG CCC ATG AAA GTC CAA ACC CAA GAA AAG TGC CCA AAT GAG TTT ACT	192
Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr	
GGT GAT CGC TGC CAA AAC TAC GTA ATG GCC AGC TTC TAC AGT ACG TCC	240
Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser	
ACT CCC TTT CTG TCT CTG CCT GAA TAG	267
Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu	

Figura 12

EGFL6

AGC CAT CTT GTC AAG TGT GCA GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT	48
Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn	
GGA GGC GAG TGC TTC ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAT CCC TCA AGA TAC	96
Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr	
TTG TGC AAG TGC CAA CCT GGA TTC ACT GGA GCG AGA TGT ACT GAG AAT	144
Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn	
GTG CCC ATG AAA GTC CAA ACC CAA GAA AAG TGC CCA AAT GAG TTT ACT	192
Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr	
GGT GAT CGC TGC CAA AAC TAC GTA ATG GCC AGC TTC TAC AAA GCG GAG	240
Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu	
GAG CTC TAC TAA	252
Glu Leu Tyr	

Figura 13

```

agc cat ctt gtc aag tgt gca gag aag gag aaa act ttc tgt gtg aat 48
Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn

gga ggc gag tgc ttc atg gtg aaa gac ctt tca aat ccc tca aga tac 96
Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr

ttg tgc aag tgc cca aat gag ttt act ggt gat cgc tgc caa aac tac 144
Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr

gta atg gcc agc ttc tac aaa gcc gag gag ctc tac can 183
Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr Gln
    
```

Figura 14

```

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

Figura 15

```

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

Figura 16 – NGR2 alfa

Met Arg Arg Asp Pro Ala Pro Gly Phe Ser Met Leu Leu Phe Gly Val
 Ser Leu Ala Cys Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser Val Gln Asp Gln Ala
 Tyr Lys Ala Pro Val Val Val Glu Gly Lys Val Gln Gly Leu Val Pro
 Ala Gly Gly Ser Ser Ser Asn Ser Thr Arg Glu Pro Pro Ala Ser Gly
 Arg Val Ala Leu Val Lys Val Leu Asp Lys Trp Pro Leu Arg Ser Gly
 Gly Leu Gln Arg Glu Gln Val Ile Ser Val Gly Ser Cys Val Pro Leu
 Glu Arg Asn Gln Arg Tyr Ile Phe Phe Leu Glu Pro Thr Glu Gln Pro
 Leu Val Phe Lys Thr Ala Phe Ala Pro Leu Asp Thr Asn Gly Lys Asn
 Leu Lys Lys Glu Val Gly Lys Ile Leu Cys Thr Asp Cys Ala Thr Arg
 Pro Lys Leu Lys Lys Met Lys Ser Gln Thr Gly Gln Val Gly Glu Lys
 Gln Ser Leu Lys Cys Glu Ala Ala Ala Gly Asn Pro Gln Pro Ser Tyr
 Arg Trp Phe Lys Asp Gly Lys Glu Leu Asn Arg Ser Arg Asp Ile Arg
 Ile Lys Tyr Gly Asn Gly Arg Lys Asn Ser Arg Leu Gln Phe Asn Lys
 Val Lys Val Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Val Cys Glu Ala Glu Asn Ile
 Leu Gly Lys Asp Thr Val Arg Gly Arg Leu Tyr Val Asn Ser Val Ser
 Thr Thr Leu Ser Ser Trp Ser Gly His Ala Arg Lys Cys Asn Glu Thr
 Ala Lys Ser Tyr Cys Val Asn Gly Gly Val Cys Tyr Tyr Ile Glu Gly
 Ile Asn Gln Leu Ser Cys Lys Cys Pro Asn Gly Phe Phe Gly Gln Arg
 Cys Leu Glu Lys Leu Pro Leu Arg Leu Tyr Met Pro Asp Pro Lys Gln
 Ser Val Leu Trp Asp Thr Pro Gly Thr Gly Val Ser Ser Ser Gln Trp
 Ser Thr Ser Pro Ser Thr Leu Asp Leu Asn

Figura 17 – NGR2 beta

Met Arg Arg Asp Pro Ala Pro Gly Phe Ser Met Leu Leu Phe Gly Val
 Ser Leu Ala Cys Tyr Ser Pro Ser Leu Lys Ser Val Gln Asp Gln Ala
 Tyr Lys Ala Pro Val Val Val Glu Gly Lys Val Gln Gly Leu Val Pro
 Ala Gly Gly Ser Ser Ser Asn Ser Thr Arg Glu Pro Pro Ala Ser Gly
 Arg Val Ala Leu Val Lys Val Leu Asp Lys Trp Pro Leu Arg Ser Gly
 Gly Leu Gln Arg Glu Gln Val Ile Ser Val Gly Ser Cys Val Pro Leu
 Glu Arg Asn Gln Arg Tyr Ile Phe Phe Leu Glu Pro Thr Glu Gln Pro
 Leu Val Phe Lys Thr Ala Phe Ala Pro Leu Asp Thr Asn Gly Lys Asn
 Leu Lys Lys Glu Val Gly Lys Ile Leu Cys Thr Asp Cys Ala Thr Arg
 Pro Lys Leu Lys Lys Met Lys Ser Gln Thr Gly Gln Val Gly Glu Lys
 Gln Ser Leu Lys Cys Glu Ala Ala Ala Gly Asn Pro Gln Pro Ser Tyr
 Arg Trp Phe Lys Asp Gly Lys Glu Leu Asn Arg Ser Arg Asp Ile Arg
 Ile Lys Tyr Gly Asn Gly Arg Lys Asn Ser Arg Leu Gln Phe Asn Lys
 Val Lys Val Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Val Cys Glu Ala Glu Asn Ile
 Leu Gly Lys Asp Thr Val Arg Gly Arg Leu Tyr Val Asn Ser Val Ser
 Thr Thr Leu Ser Ser Trp Ser Gly His Ala Arg Lys Cys Asn Glu Thr
 Ala Lys Ser Tyr Cys Val Asn Gly Gly Val Cys Tyr Tyr Ile Glu Gly
 Ile Asn Gln Leu Ser Cys Lys Cys Pro Val Gly Tyr Thr Gly Asp Arg
 Cys Gln Gln Phe Ala Met Val Asn Phe Ser

Fig 18:

El dominio tipo EGF puede ser definido como sub-dominios de NRGs para el cual el alineamiento de secuencia revela al menos 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 % de homología en la secuencia de aminoácidos como se compara con la molécula EGF humana (secuencia P011331971-1023, en el fondo del alineamiento siguiente). Los aminoácidos homólogos tienen propiedades físico-químicas y estructurales idénticas, conservadas o semi-conservadas, como es representado por los símbolos "*", ".", "y", "." respectivamente.

```

Beta2region          TSHLVKCAEKEKTFQVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCONYVMASFYK-----AEELYQK--- 63
Zensun              -SHLVKCAEKEKTFQVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCONYVMASFYK-----AEELYQ--- 61
156/416             -SHLVKCAEKEKTFQVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCONYVMASFYK-----AEELY--- 60
RnD                 TSHLVKCAEKEKTFQVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCONYVMASFYKHLG-----IEFME-AEELYQK--- 71
151                ----KCAEKEKTFQVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCONYVMASFY-----IEFME-AEELYQK--- 50
EGF-ld_NRGbeta3    -SHLVKCAEKEKTFQVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCONYVMASFYKHLG-----IEFMEKAEELY--- 50
157/417seq         -SHLVKCAEKEKTFQVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCONYVMASFYKHLG-----IEFMEKAEELY--- 69
EGF-ld_GGF         -SHLVKCAEKEKTFQVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCONYVMASFY-----IEFMEKAEELY--- 50
RnD_catno296HR     -SHLVKCAEKEKTFQVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPGFTGARTENVPMKVQNE-----KAEELYQK--- 65
155/415_seqid200_seqid155 -SHLVKCAEKEKTFQVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPGFTGARTENVPMKVQNE-----KAEELY--- 63
EGF-ld_NDF43       -SHLVKCAEKEKTFQVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPGFTGARTENVPMKVQ-----KAEELY--- 50
152                -KCAEKEKTFQVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPGFTGARTENVPMKVQ-----KAEELY--- 50
159/419            -SHLVKCAEKEKTFQVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPGFTGARTENVPMKVQEQECPNEFTGDRCONYVMASFYKAEELY--- 83
158/418            -SHLVKCAEKEKTFQVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPGFTGARTENVPMKVQEQECPNEFTGDRCONYVMASFYSTSTPFSLPE 88
EGF-ld_NRG1gamma  ----KCAEKEKTFQVNGGECFMVKDLSNPSRYLCK-----TPFSLPE-- 61
EGF-ld_GGF2        -KCAEKEKTFQVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCONYVMASFYSTS-----TPFSLPE-- 61
EGF-ld_SMPF        -KCAEKEKTFQVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCONYVMASFYSTS-----TPFSLPE-- 61
154/414            -SHLVKCAEKEKTFQVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCONYVMASFYSTS-----TPFSLPE-- 65
P011331971-1023   -NSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIEALD---RYACNCVVYIGERCQ-YRDLKMWELR----- 53
      !* . . . !*! !* * : ! ! . !* !*
    
```