

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 610 353**

51 Int. Cl.:

C07K 14/475 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2001 E 10180489 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.10.2016 EP 2357004**

54 Título: **Moléculas de ácido nucleico NRG-2, polipéptidos y métodos diagnósticos y terapéuticos**

30 Prioridad:

23.05.2000 US 206495 P

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

27.04.2017

73 Titular/es:

**CENES PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
333 Providence Highway
Norwood, MA 02062, US**

72 Inventor/es:

MARCHIONNI, MARK

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 610 353 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

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

5 Campo de la invención

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

Antecedentes de la invención

10 Las neurregulinas (NRG) y sus receptores constituyen un sistema factor de crecimiento-receptor tirosina quinasa para la señalización célula-célula que ha sido implicado en la organogénesis en tejido nervioso, muscular, epitelial y de otros tejidos (Lemke, Mol. Cell. Neurosci. 7: 247-262, 1996, Burden y colaboradores, Neuron 18: 847-855, 1997).
 15 Los tres genes de NRG conocidos, *NRG-1*, *NRG-2* y *NRG-3*, se mapean para distintos loci cromosómicos distintos (Pinkas-Kramarski y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 9387-91, 1994; Carraway y colaboradores, Nature 387: 512-516, 1997, Chang y colaboradores, Nature 387: 509-512, 1997, y Zhang y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 9562-9567, 1997), y codifican colectivamente una gama diversa de proteínas NRG. La familia de proteínas NRG incluye al menos 20 (y tal vez 50 o más) isoformas secretadas y unidas a la membrana que contienen dominios similares al factor de crecimiento epidérmico (EGFL), inmunoglobulina (Ig) y otros dominios reconocibles.

20 Las proteínas NRG más completamente estudiadas hasta la fecha son los productos génicos de *NRG-1*, que incluyen un grupo de aproximadamente 15 isoformas distintas estructuralmente relacionadas (Lemke, Mol. Cell. Neurosci., 7: 247-262, 1996 y Peles y Yarden, BioEssays 15: 815-824, 1993). Las Isoformas de *NRG-1* incluyen
 25 factor de diferenciación neu (NDF, Peles y colaboradores, Cell 69, 205-216, 1992 y Wen y colaboradores, Cell 69, 559-572, 1992), heregulina (HRG, Holmes y colaboradores, Science 256: 1205-1210, 1992), receptor inductor de actividad de Acetilcolina (ARIA, Falls y colaboradores, Cell 72: 801-815, 1993) y los factores de crecimiento gliales GGF1, GGF2 y GGF3 (Marchionni y colaboradores, Nature 362: 312-8, 1993).

30 El gen de *NRG-2* se identificó por clonación de homología (Chang y colaboradores, Nature 387: 509-512, 1997, Carraway y colaboradores, Nature 387: 512-516, 1997, y Higashiyama y colaboradores, J. Bioclaem, 122: 675-680, 1997) y a través de enfoques genómicos (Busfield y colaboradores, Mol. Cell. Biol. 17: 4007-4014, 1997). Las isoformas *NRG-2* incluyen al activador derivado del sistema nervioso y del timo de erbB quinasa (NTAK, número de acceso del GenBank, AB005060), divergente de neurregulina (Don-1) y factor de crecimiento derivado del cerebelo
 35 (CDGF, solicitud PCT WO 97/09425). Las células que expresan los receptores erbB4 o erbB2/erbB4 pueden mostrar una respuesta particularmente robusta a *NRG-2* (Pinkas-Kramarski y colaboradores, Mol. Cell. Biol. 18: 6090-6101, 1998). También se sabe que el producto del gen *NRG-3* (Zhang y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 9562-9567, 1997) se une y activa los receptores erbB4 (Hijazi y colaboradores, Int. J. Oncol. 13: 1061-1067, 1998).

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

50 Las proteínas NRG tienen diversas propiedades biológicas, haciéndolas potencialmente útiles en el desarrollo de nuevas terapias para una amplia gama de enfermedades y trastornos.

Sumario de la invención

55 La invención proporciona polipéptidos NRG-2, de acuerdo con la reivindicación 1.

La invención también proporciona un método *ex vivo* de acuerdo con la reivindicación 3.

60 En un aspecto, la invención proporciona un método para aumentar la mitogénesis, supervivencia, crecimiento o diferenciación de una célula mediante la administración de un polipéptido NRG-2 a la célula en una cantidad eficaz para aumentar la mitogénesis, la supervivencia, el crecimiento, o diferenciación de la célula, donde la célula expresa un receptor erbB que es selectivo para un polipéptido NRG-2. En realizaciones preferidas de este aspecto, el receptor erbB es un homodímero erbB4, un heterodímero erbB2/erbB4, o un heterodímero erbB1/erbB3. En otras
 65 realizaciones preferidas de este aspecto, la célula es una célula neuronal, una célula progenitora neuronal, una célula neuronal asociada o una célula muscular. En otras realizaciones preferidas de este aspecto, la célula neuronal

asociada es una célula de Schwann, un astrocito, un oligodendrocito, una célula progenitora O-2A, una célula glial, una célula microglial, una célula envolvente del bulbo olfativo o una célula del órgano sensorial y la célula muscular es un mioblasto, una célula satélite, un miocito, una célula del músculo esquelético, una célula del músculo liso o una célula del músculo cardíaco.

5 También se describe un método para estimular la mitogénesis de una célula glial poniendo en contacto la célula glial con un polipéptido recombinante NRG-2. La célula gliales es un oligodendrocito, una célula microglial, una célula glial mielinizante, una célula envolvente del bulbo olfativo o una célula glial en un adulto.

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

15 En otro aspecto, la invención proporciona un método para aumentar la supervivencia de cardiomiocitos, la proliferación de cardiomiocitos, el crecimiento de cardiomiocitos o la diferenciación de cardiomiocitos, en un mamífero que lo necesite, mediante la administración de un polipéptido NRG-2 al mamífero en una cantidad eficaz para aumentar la supervivencia de los cardiomiocitos, la proliferación de cardiomiocitos, el crecimiento de cardiomiocitos o la diferenciación de cardiomiocitos. En realizaciones preferidas, el mamífero es un ser humano. En otras realizaciones preferidas, el mamífero tiene una condición fisiopatológica que afecta al músculo cardíaco, por ejemplo, cardiomiopatía (por ejemplo, una enfermedad congénita degenerativa), traumatismo cardíaco, insuficiencia cardíaca o daño isquémico, o el mamífero tiene una condición fisiopatológica que afecta al músculo liso, por ejemplo, aterosclerosis, lesión vascular, hipertensión vascular o enfermedad vascular congénita degenerativa. En otra realización preferida, el mamífero es un paciente con miastenia grave.

25 También se describe un método para afectar la comunicación celular entre una célula neuronal asociada y una célula neuronal en un mamífero mediante la administración de un polipéptido NRG-2 al mamífero, de manera que la neuregulina interactúa con la célula neuronal asociada, dando como resultado la producción de al menos un agente neurotrófico por la célula neuronal asociada y el agente o agentes neurotróficos afectan a la mitogénesis, supervivencia, crecimiento, diferenciación o excrecencia de neuritas de la célula neuronal. En una realización preferida, el mamífero es un ser humano. En otras realizaciones preferidas, la célula neuronal asociada es una célula de Schwann, un astrocito, un oligodendrocito, una célula progenitora O-2A, una célula glial, una célula de envoltura de bulbo olfativo, una célula microglial, una célula de órgano sensorial, o una célula muscular (por ejemplo, una célula de músculo esquelético, una célula de músculo liso o una célula de músculo cardíaco). En otras realizaciones preferidas, la comunicación celular se ve afectada en el sistema nervioso central o en el sistema nervioso periférico de un mamífero. En otras realizaciones preferidas, la administración incluye administrar una célula productora del polipéptido NRG-2 purificado.

40 También se describe un método para el tratamiento o profilaxis de un estado fisiopatológico del sistema nervioso en un mamífero, mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido NRG-2 recombinante al mamífero. En realizaciones preferidas, la condición fisiopatológica es una condición del sistema nervioso periférico o del sistema nervioso central; la condición fisiopatológica es la desmielinización de las células nerviosas, el daño de las células de Schwann, la pérdida de células de Schwann o un trastorno neurodegenerativo; la condición fisiopatológica es una neuropatía periférica (por ejemplo, una neuropatía de fibras nerviosas sensoriales, una neuropatía de fibras motoras, o ambas); o la condición fisiopatológica es esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, atrofia muscular espinal, lesión nerviosa, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, ataxia cerebelosa o lesión de la médula espinal.

50 El tratamiento o profilaxis requiere regeneración neural o reparación neural. En otra realización preferida, el polipéptido NRG-2 interactúa con células asociadas a células neuronales, y el agente o agentes neurotróficos afectan la actividad mitótica, supervivencia, diferenciación o excreción de neuritas de células neuronales.

55 También se describe que la administración es suficiente para inducir la mielinización de una célula neuronal por una célula glial (por ejemplo, una célula de Schwann o un oligodendrocito). La administración incluye administrar una célula productora de polipéptido NRG-2 purificado al mamífero. La célula productora de polipéptido NRG-2 de la invención puede contener una secuencia de ADN recombinante, en donde la secuencia de ADN incluye una secuencia que codifica un polipéptido NRG-2 y en donde la secuencia de ADN que codifica el polipéptido NRG-2 está enlazada operativamente a un promotor.

60 También se describe un método para el tratamiento de un tumor (por ejemplo, un tumor glial) mediante la inhibición de la proliferación de una célula tumoral por la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo, que inhibe la unión de un polipéptido NRG-2 a un receptor presente en la superficie de la célula tumoral, a un sujeto que necesite dicho tratamiento. Se describe que la célula tumoral expresa un receptor erbB que es selectivo para un polipéptido NRG-2.

65 También se describe, un método para el tratamiento de neurofibromatosis por inhibición de mitogénesis de células gliales mediante la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo, que inhibe la unión de un polipéptido

NRG-2 a un receptor presente en la superficie de un célula tumoral glial en un individuo con neurofibromatosis, a un sujeto que necesite de tal tratamiento.

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

10 En otro aspecto, la invención proporciona un método para estimular la proliferación de una célula mediante la administración de un polipéptido NRG-2 a la célula.

En realizaciones preferidas, la célula es una célula muscular.

15 El polipéptido NRG-2 de cualquiera de los aspectos o realizaciones anteriores de la invención puede incluir o consistir en las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 2, o estar codificado por las secuencias de ácido nucleico expuestas en SEQ ID NO: 1.

20 En un aspecto, la invención proporciona un polipéptido NRG-2 sustancialmente puro que incluye o consiste en las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 2. En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico sustancialmente pura que incluye una secuencia que codifica un polipéptido que incluye las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 2. También se describe un vector (por ejemplo, un vector de terapia génica) que incluye la molécula de ácido nucleico del aspecto previo, operativamente enlazado a un promotor; una célula que contiene un vector de terapia génica que contiene a la molécula de ácido nucleico del aspecto previo; y un animal transgénico no humano que contiene la molécula de ácido nucleico del aspecto previo.

25 En otros aspectos, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico sustancialmente pura que incluye o consiste en, una secuencia de ácido nucleico que es sustancialmente idéntica a las secuencias de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 1. En otro aspecto, la invención proporciona una molécula de ácido nucleico que incluye una secuencia que es antisentido con la secuencia de cadena codificante de la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma.

30 También se describe un animal no humano que tiene una mutación desactivada en uno o ambos alelos que codifican al polipéptido NRG-2 que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NOs: 2 o 4, en donde preferiblemente existe una célula del animal no humano.

35 También se describe un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido NRG-2 que incluye las secuencias de aminoácidos expuestas en las SEQ ID NOs: 2 o 4.

40 También se describe un método para detectar la presencia de un polipéptido NRG-2 en la muestra poniendo en contacto la muestra con el anticuerpo descrito y analizando la unión del anticuerpo con el polipéptido.

También se describe un kit para el análisis de un polipéptido NRG-2 de un sujeto de prueba, en donde el kit incluye el anticuerpo descrito.

45 También se describe un método para diagnosticar una mayor probabilidad de desarrollar una enfermedad o afección relacionada con NRG-2 en un sujeto de prueba (por ejemplo, un humano) mediante el análisis de moléculas de ácido nucleico del sujeto de prueba, para determinar si el sujeto de prueba contiene una mutación en el gen de NRG-2 que codifica un polipéptido NRG-2 que incluye la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NOs: 2 o 4, en donde la presencia de la mutación es una indicación de que el sujeto de prueba tiene una mayor probabilidad de desarrollar una enfermedad relacionada con NRG-2.

50 Por "neurregulina" o "NRG" se entiende un polipéptido que está codificado por un gen NRG-1, NRG-2, o NRG-3 o molécula de ácido nucleico (por ejemplo, un ADNc), y se une y activa un receptor erbB o sus combinaciones. Generalmente, una neurregulina posee dominios reconocibles, tales como un dominio similar al factor de crecimiento epidérmico (EGFL), que se une y activa un receptor erbB o combinaciones de los mismos, y un dominio de inmunoglobulina (Ig). Un dominio EGFL tiene similitud estructural con el dominio de unión al receptor EGF como se describe en Holmes y colaboradores (Science 256: 1205-1210, 1992), la patente estadounidense Nº 5.530.109, la patente estadounidense Nº 5.716.930, la solicitud de patente estadounidense con serie No. 08/461.097, Hijazi y colaboradores (Int. J. Oncol., 13: 1061-1067, 1998), Chang y colaboradores (Nature 387: 509-512, 1997), Carraway y colaboradores (Nature 87: 512-516, 1997), Higashiyama y colaboradores (J. Biochem., 122: 675-680, 1997), y la publicación PCT WO 97/09425.

65 Por "neurregulina 2" o "NRG-2" se entiende un polipéptido codificado por un gen de NRG-2, o una molécula de ácido nucleico NRG-2, y se describe en la presente memoria, y en, por ejemplo, Carraway y colaboradores, Nature 387: 512-516, 1997; Chang y colaboradores, Nature 387: 509-511, 1997; Higashiyama y colaboradores, J. Biochem. 122: 675-680, 1997; y Busfield y colaboradores, Mol. Cell Biol. 17: 4007-4014, 1997. Las isoformas de NRG-2 incluyen al activador derivado del sistema neurológico y del timo de ErbB quinasas (NTAK, Nº de acceso de GenBank

AB005060, Higashiyama y colaboradores, J. Biochem. 122: 675-680, 1997), Divergente de Neurregulina (don-1; publicación PCT WO 98/07736), y factor de crecimiento derivado del cerebelo (CDGF, publicación PCT WO 97/09425; patente estadounidense No. 5.912.326), y las moléculas NRG-2 descritas en la presente memoria. En general, el receptor erbB1 (EGFR) es un compañero de dimerización preferido para un polipéptido NRG-2. Las combinaciones preferidas de receptores para polipéptidos NRG-2 son homodímeros erbB4, heterodímeros erbB2/erbB4, o heterodímeros erbB1/erbB3. Un CDGF, don-1, o polipéptido o NTAK o molécula de ácido nucleico, como se expone en las secuencias de aminoácidos y ácido nucleico descritas en Higashiyama y colaboradores, J. Biochem. 122: 675-680, 1997, WO 98/07736, WO 97/09425 y la patente estadounidense No. 5.912.326, pueden ser excluidas específicamente de ciertos aspectos de la invención. Por ejemplo, uno o más de un CDGF, don-1 o polipéptido NTAK o molécula de ácido nucleico, pueden ser excluidos de los métodos para aumentar la mitogénesis, supervivencia, crecimiento o diferenciación de una célula; para aumentar la supervivencia de los cardiomiocitos, proliferación de cardiomiocitos, hipertrofia de cardiomiocitos o diferenciación de cardiomiocitos en un mamífero; para afectar la comunicación celular entre una célula neuronal asociada y una célula neuronal; para estimular la mitogénesis de una célula glial; para inducir mielinización de una célula neuronal por una célula glial; para el tratamiento o profilaxis de un estado fisiopatológico del sistema nervioso en un mamífero; para el tratamiento de un tumor; para el tratamiento de la neurofibromatosis; para inhibir la proliferación de una célula; o para estimular la proliferación de una célula.

Por "receptor erbB" se entiende erbB1 (EGFR), erbB2, erbB3 y erbB4 (también HER-1, HER-2, HER-3 y HER-4 de humano) que existen como receptores tirosina quinasas monoméricos o multiméricos (por ejemplo, homodiméricos o heterodiméricos) de la superficie de la célula que se unen y/o son activados por una o más neurregulinas (Meyer y colaboradores, Development 124: 3575-3586, 1997; Orr-Urtreger y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 1867-71, 1993, Marchionni y colaboradores, Nature 362: 312-8, 1993, Chen y colaboradores, J. Comp. Neurol. 349: 389-400, 1994; Corfas y colaboradores, Neuron 14: 103-115, 1995, Meyer y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 1064-1068, 1994 y Pinkas-Kramarski y colaboradores, Oncogene 15: 2803-2815, 1997). Preferiblemente, los receptores erbB son homodímeros erbB4, heterodímeros erbB2/erbB4, heterodímeros erbB1/erbB3, o cualquier combinación de receptores que sea selectiva para un polipéptido NRG-2 sobre un polipéptido NRG-1 o un polipéptido NRG-3.

Por "selectivo" se entiende la unión preferencial de un receptor erbB o combinación de los mismos a un polipéptido NRG-2 sobre un polipéptido NRG-1 o NRG-3. Más específicamente, la unión preferencial se define como un aumento en la afinidad de un receptor erbB a un polipéptido NRG-2 de al menos 1,5 veces, más preferiblemente al menos 2 veces, con respecto a la afinidad de un receptor erbB a un polipéptido NRG-1 o NRG-3.

Por "célula neuronal" se entiende una neurona, célula nerviosa; neurocito o célula progenitora neuronal. Una célula neuronal es la unidad morfológica y funcional del sistema nervioso central y el sistema nervioso periférico, e incluye neuronas colinérgicas y neuronas no colinérgicas.

Por "célula neuronal asociada" se entiende cualquier célula no neuronal que sea capaz de afectar la función de una neurona, o cuya función pueda ser afectada por una neurona. Una célula neuronal asociada incluye, pero no se limita a, una célula muscular o una célula de soporte del sistema nervioso, incluyendo una célula de Schwann, un astrocito, un oligodendrocito, una célula progenitora O-2A, una célula glial (por ejemplo, una célula glial radial o una célula glial de Bergmann), una célula microglial, una célula que envuelve el bulbo olfativo o una célula de órgano sensorial (por ejemplo, una célula retiniana).

Por "célula muscular" se entiende cualquier célula que contribuye al tejido muscular. El tejido muscular es un tejido primario, compuesto principalmente de células contráctiles especializadas, y generalmente se clasifica como músculo esquelético, músculo cardíaco o músculo liso. Los mioblastos, células satelitales, miotubos, miocitos (por ejemplo, cardiomiocitos) y tejidos de miofibrilla están todos incluidos en el término "células musculares" y pueden tratarse todos de acuerdo con los métodos de la invención. Los efectos de las células musculares pueden inducirse dentro del músculo esquelético, cardíaco y liso.

Por "agente neurotrófico" o "factor neurotrófico" se entiende una sustancia que provoca un efecto trófico en una o más células neuronales. Estos efectos incluyen, pero no se limitan a, supervivencia, mitosis y diferenciación. Los agentes neurotróficos incluyen, pero no se limitan a, neurotrofinas, factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico ciliar y factor neurotrófico derivado del cerebro.

Por "afectar" se entiende la inducción de un cambio cuantitativo en la respuesta de una célula objetivo, como resultado de una interacción con un polipéptido NRG-2 o molécula de ácido nucleico.

Por "comunicación celular" se entiende la síntesis de una sustancia (por ejemplo, un agente neurotrófico) en un primer tipo de célula (por ejemplo, una célula neuronal asociada) y la interacción de esa sustancia con un segundo tipo de célula (por ejemplo, una célula neuronal), de tal manera que la sustancia provoca un cambio en el primer o segundo tipo de célula. La comunicación celular incluye, pero no se limita a, secreción de la sustancia a partir de una célula. La comunicación celular puede ocurrir recíprocamente o no recíprocamente con uno o más tipos de células.

Por "mitogénesis" se entiende cualquier división celular que da como resultado la producción de nuevas células en el paciente. Más específicamente, mitogénesis *in vitro* se define como un aumento del índice mitótico, con relación a las células no tratadas, del 50%, más preferiblemente del 100%, y lo más preferible del 300%, cuando se exponen las células a un agente marcador durante un tiempo equivalente a dos tiempos de duplicación. El índice mitótico es la fracción de células en cultivo que tiene núcleos marcados cuando crecen en presencia de un trazador que sólo se incorpora durante la fase S (por ejemplo, BrdU), y el tiempo de duplicación se define como el tiempo medio requerido para que el número de células en el cultivo aumente por un factor de dos. Por "inhibición de la mitogénesis" se entiende una disminución del índice mitótico, en relación con las células no tratadas, del 50%, más preferiblemente del 100%, y lo más preferiblemente del 300%, cuando las células se exponen al agente marcador durante un tiempo equivalente a dos tiempos de duplicación. Inhibir la mitogénesis también significa un cese de cualquier aumento en el índice mitótico, en relación con las células de control.

Un efecto sobre la mitogénesis *in vivo* se define como un incremento en la activación celular medido por la aparición de células marcadas en el tejido de un mamífero expuesto a un trazador que sólo se incorpora durante la fase S (por ejemplo, BrdU). Un compuesto terapéutico útil se define *in vivo* como un compuesto que aumenta la activación de células en relación con un mamífero de control en al menos 10%, más preferiblemente en al menos 50% y lo más preferiblemente en más de 200% cuando el mamífero se expone a un agente marcador durante un período mayor a 15 minutos y los tejidos se analizan entre 10 horas y 24 horas después de la administración del mitógeno a la dosis terapéutica. Por ejemplo, en las células musculares, la activación de células satelitales *in vivo* puede detectarse mediante el control de la incorporación de BrdU. Alternativamente, la activación de células satelitales *in vivo* puede detectarse por la aparición de la vimentina de filamento intermedio mediante métodos de análisis inmunológicos o de ARN. Cuando se analiza la vimentina, el mitógeno útil se define como uno que causa la expresión de niveles detectables de vimentina en el tejido muscular cuando se proporciona la dosificación terapéuticamente útil. La mitogénesis puede inducirse, por ejemplo, en células musculares de músculo esquelético, cardíaco y liso, y en células gliales.

Por "supervivencia" se entiende cualquier proceso por el cual una célula evita la muerte. El término supervivencia, tal como se usa en la presente memoria, también se refiere a la prevención de la pérdida celular como se evidencia por necrosis, apoptosis o la prevención de otros mecanismos de pérdida celular. El aumento de la supervivencia tal como se utiliza en la presente memoria indica una disminución en la velocidad de muerte celular en al menos 10%, más preferiblemente en al menos 50% y lo más preferiblemente en al menos 100% con respecto a un control no tratado. La tasa de supervivencia puede medirse contando células capaces de ser teñidas con un colorante específico para células muertas (por ejemplo, yoduro de propidio) en cultivo. La tasa de supervivencia puede medirse contando células que pueden ser teñidas con un colorante específico para células muertas (tales como yoduro de propidio) en cultivo cuando las células son de 8 días después de la diferenciación (es decir, 8 días después de que el medio cambie de 20% a 0,5 % en suero).

Por "crecimiento" se entiende el aumento de tamaño o número de un tipo de célula con relación a una célula de control. La utilidad terapéutica del crecimiento aumenta el tamaño o el número de una célula en tejido enfermo en al menos 10% o más, más preferiblemente en 50% o más y lo más preferiblemente en más de 100% con respecto al tejido equivalente en un animal de control tratado de forma similar. El crecimiento puede medirse, por ejemplo, mediante un aumento del peso neto, del contenido de proteínas o del diámetro celular. El crecimiento muscular puede ocurrir por el aumento en el tamaño de la fibra y/o por el aumento del número de fibras.

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

Por "proliferación" se entiende el crecimiento o reproducción de células similares. Por "inhibición de la proliferación" se entiende la disminución en el número de células similares en al menos 10%, más preferiblemente en al menos 20% y lo más preferiblemente en al menos 50%. Por "estimulación de la proliferación" se entiende un aumento en el número de células similares en al menos 10%, más preferiblemente en al menos 20% y lo más preferiblemente en al menos 50%.

Por "inducción de la mielinización" se entiende la adquisición, desarrollo o formación de envoltura de mielina alrededor de una fibra nerviosa. La terapéutica útil para inducir mielinización confiere un aumento en la densidad de la envoltura de mielina en al menos 10%, más preferiblemente en al menos 20%, y lo más preferiblemente en al menos 50%, con respecto a una fibra nerviosa de control. Por "desmielinización" se entiende la pérdida de la envoltura de mielina alrededor de una fibra nerviosa.

Por "interacción" se entiende el contacto de un polipéptido NRG-2 con un receptor u otra molécula en una célula objetivo.

Por "condición fisiopatológica" se entiende una perturbación de la función y/o estructura de un organismo vivo, resultante de una fuente externa, una predisposición genética, un trauma físico o químico, o una combinación de lo anterior, incluyendo, pero sin limitarse a cualquier enfermedad de mamífero.

5 Por "neuropatía" se entiende cualquier trastorno que afecte al sistema nervioso. Una neuropatía puede ser, por ejemplo, una neuropatía periférica, tal como neuropatía de fibras nerviosas sensoriales o neuropatía de fibras motoras.

10 Por "cardiomiopatía" se entiende una enfermedad que afecta al músculo cardíaco. La miocardiopatía puede ser primaria, es decir, afectar principalmente al músculo cardíaco, o secundaria, es decir, afecta al músculo cardíaco secundario con una enfermedad sistémica, infección o enfermedad metabólica.

15 Por "daño isquémico" se entiende el daño resultante de la disminución de la circulación sanguínea al músculo cardíaco.

Por "enfermedad congénita degenerativa" se entiende una enfermedad que existe al nacer, que puede ser hereditaria o debido a una influencia que se produce durante la gestación, que da lugar a un cambio patológico en células o tejidos.

20 Por "tratamiento" se entiende el tratamiento médico de un paciente con la intención de curar, mejorar, estabilizar o prevenir una enfermedad, estado patológico o trastorno. Este término incluye el tratamiento activo, es decir, el tratamiento dirigido específicamente hacia la mejoría o asociado con la curación de una enfermedad, estado patológico o trastorno, e incluye también el tratamiento causal, es decir, el tratamiento dirigido a la eliminación de la causa de la enfermedad asociada, estado patológico o trastorno. Además, este término incluye el tratamiento paliativo, es decir, el tratamiento diseñado para el alivio de los síntomas más que la cura de la enfermedad, estado patológico o trastorno; tratamiento preventivo, es decir, tratamiento dirigido a minimizar o inhibir parcial o totalmente el desarrollo de la enfermedad asociada, estado patológico o trastorno; y tratamiento de apoyo, es decir, tratamiento empleado para complementar otra terapia específica dirigida hacia la mejora de la enfermedad asociada, estado patológico o trastorno. La frase "tratamiento" también incluye el tratamiento sintomático, es decir, el tratamiento dirigido hacia síntomas constitucionales de la enfermedad asociada, estado patológico o trastorno.

35 Por "cantidad terapéuticamente eficaz" se entiende una cantidad de un polipéptido NRG-2 o molécula de ácido nucleico suficiente para producir un efecto curativo, sanativo, estabilizador o mejorador en el tratamiento de un trastorno.

40 Por "trastorno neurodegenerativo" se entiende cualquier estado fisiopatológico que se caracteriza por la degeneración de células neuronales o células asociadas a células neuronales. La degeneración puede incluir, por ejemplo, una disminución en el número o tamaño de la célula, un aumento de la apoptosis o muerte celular, o una disminución en el crecimiento, la supervivencia o la diferenciación celular.

45 Por "regeneración neural o reparación neural" se entiende el tratamiento de una estado fisiopatológico, por ejemplo, un aumento en el número o tamaño de las células neuronales o asociadas a células neuronales, una disminución en la apoptosis o muerte de las células neuronales o asociadas a células neuronales o un aumento en el crecimiento, la supervivencia o diferenciación de las células neuronales o células asociadas a las células neuronales.

Por "inhibición de la unión" se entiende prevenir o reducir la unión de un polipéptido NRG-2 a un receptor. La unión se reduce preferiblemente en al menos 10%, más preferiblemente en al menos 50% y lo más preferiblemente en al menos 100% con respecto a una muestra de control.

50 Por "polipéptido" o "fragmento polipeptídico" se entiende una cadena de dos o más aminoácidos, independientemente de cualquier modificación postraduccional (por ejemplo, glicosilación o fosforilación), que constituyen todo o parte de un polipéptido de origen natural o no natural. Por "modificación postraduccional" se entiende cualquier cambio en un polipéptido o fragmento de polipéptido durante o después de la síntesis. Las modificaciones postraducionales pueden producirse naturalmente (tal como durante la síntesis dentro de una célula) o generarse artificialmente (tal como por medios recombinantes o químicos). Una "proteína" puede estar constituida por uno o más polipéptidos.

60 El término "idéntica" se usa aquí para describir la relación de la secuencia de una molécula particular de ácido nucleico o polipéptido con la secuencia de una molécula de referencia del mismo tipo. Por ejemplo, si un polipéptido o molécula de ácido nucleico tiene el mismo aminoácido o residuo de nucleótido en una posición dada, en comparación con una molécula de referencia a la que está alineada, se dice que es "idéntica" en esa posición. El nivel de identidad de secuencia de una molécula de ácido nucleico o un polipéptido con una molécula de referencia se mide típicamente usando software de análisis de secuencia con los parámetros por defecto especificados en el mismo, tales como la introducción de espacios para lograr una alineación óptima (por ejemplo, el paquete de software de análisis de secuencia del grupo de informática genética, del Centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705, BLAST, o programas PILEUP/PRETTYBOX). Estos

programas de software comparan secuencias idénticas o similares asignando grados de identidad a diversas sustituciones, supresiones u otras modificaciones. Las sustituciones conservadoras incluyen típicamente sustituciones dentro de los siguientes grupos: glicina, alanina, valina, isoleucina y leucina; ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina y glutamina; serina y treonina; lisina y arginina; y fenilalanina y tirosina.

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

15 Una molécula de ácido nucleico o polipéptido se "analiza" o somete a "análisis" si se lleva a cabo un procedimiento de ensayo que permite determinar su actividad biológica o si es de tipo silvestre o mutada. Por ejemplo, se pueden analizar los genes de un animal (por ejemplo, un ser humano) mediante la amplificación del ADN genómico del animal usando la reacción en cadena de la polimerasa y luego determinando si el ADN amplificado contiene una mutación, por ejemplo, por análisis de secuencia de nucleótidos o de fragmentos de restricción.

20 Por un "polipéptido sustancialmente puro" se entiende un polipéptido (o un fragmento del mismo) que ha sido separado de proteínas y moléculas orgánicas que naturalmente lo acompañan. Típicamente, un polipéptido es sustancialmente puro cuando está al menos en un 60%, en peso, libre de las proteínas y de las moléculas orgánicas naturales con las cuales está naturalmente asociado. Preferiblemente, el polipéptido es un polipéptido NRG-2 que es al menos 75%, más preferiblemente al menos 90%, y lo más preferiblemente al menos 99%, en peso, puro. Un polipéptido NRG-2 sustancialmente puro puede obtenerse, por ejemplo, mediante extracción de una fuente natural (por ejemplo, cerebelo), mediante la expresión de una molécula de ácido nucleico recombinante que codifica un polipéptido NRG-2 o mediante síntesis química. La pureza se puede medir por cualquier método apropiado, por ejemplo, por cromatografía en columna, electroforesis en gel de poliacrilamida o análisis por HPLC.

30 Un polipéptido está sustancialmente libre de componentes naturalmente asociados cuando está separado de aquellas proteínas y moléculas orgánicas que lo acompañan en su estado natural. De este modo, una proteína que se sintetiza químicamente o se produce en un sistema celular diferente de la célula en la que se produce naturalmente está sustancialmente libre de sus componentes naturalmente asociados. Por consiguiente, los polipéptidos sustancialmente puros no sólo incluyen los derivados de organismos eucariotas, sino también los sintetizados en *E. coli* u otros procariontes.

35 Se dice que un anticuerpo "se une específicamente" a un polipéptido si reconoce y se une al polipéptido (por ejemplo, un polipéptido NRG-2), pero no reconoce y se une de manera sustancial a otras moléculas (por ejemplo, polipéptidos no relacionados con NRG-2) en una muestra, por ejemplo, una muestra biológica, que incluye naturalmente al polipéptido.

40 Por un "transgén" se entiende una molécula de ADN que se inserta mediante artificio en una célula (por ejemplo, el genoma nuclear de una célula) y se incorpora en el genoma de un organismo que se desarrolla a partir de la célula. Tal transgén puede ser parcial o totalmente heterólogo (es decir, foráneo) al organismo transgénico, o puede ser un gen que es homólogo a un gen endógeno del organismo. Se puede decir que un organismo o animal (por ejemplo, un mamífero, tal como un ratón, rata o cabra) es "transgénico" si se desarrolla a partir de una célula que tenía un transgén insertado en ella mediante artificio.

45 Por una "mutación desactivada" se entiende una alteración inducida artificialmente en una molécula de ácido nucleico (creada mediante tecnología de ADN recombinante o exposición deliberada a un mutágeno) que reduce la actividad biológica del polipéptido normalmente codificado a partir del mismo en al menos un 80% con relación al gen no mutado. La mutación puede ser, sin limitación, una mutación de inserción, supresión, cambio de marco o una mutación de sentido erróneo. Un "animal que no expresa un gen" es preferiblemente un mamífero, y más preferiblemente un ratón, que contiene una mutación desactivada, como se definió anteriormente.

50 Por "vector" se entiende un plásmido o virus genéticamente modificado, derivado de, por ejemplo, un bacteriófago, adenovirus, retrovirus, poxvirus, herpesvirus o cromosoma artificial, que se utiliza para transferir una secuencia que codifica un polipéptido (por ejemplo, un polipéptido NRG- 2), operativamente enlazado a un promotor, dentro de una célula huésped, de tal manera que el péptido o polipéptido codificado se expresa dentro de la célula huésped.

60 Por "promotor" se entiende una secuencia mínima suficiente para dirigir o controlar la transcripción. También se incluyen aquellos elementos promotores que son suficientes para hacer que la expresión génica dependiente del promotor sea controlable para un tipo de célula o estado fisiológico (por ejemplo, condiciones hipóxicas frente a condiciones normóxicas) o que puede ser inducida por señales o agentes externos; tales elementos pueden estar situados en las regiones 5' o 3' o internas del gen nativo.

Por "operativamente enlazado" 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 se unen las moléculas apropiadas (por ejemplo, proteínas activadoras de la transcripción) a las secuencias reguladoras.

5 Por "célula productora del polipéptido NRG-2" se entiende una célula (o un descendiente de una célula) en la que se ha introducido una molécula de ADN que codifica un polipéptido NRG-2, mediante técnicas de ADN recombinante o técnicas conocidas de terapia génica.

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

15 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un diagrama esquemático de productos génicos NRG-2 y clones de ADNc humanos.

La Figura 2 muestra un diagrama esquemático del vector de expresión de mamífero pRc/CMV2.

20 La Figura 3A muestra un análisis de transferencia tipo Western de medios acondicionados (cm) y lisados celulares (células) a partir de células CHO/S transfectadas de manera simulada-(vector) o con rhNRG-2 α .

La Figura 3B muestra un análisis de transferencia tipo Western de medios acondicionados a partir de células CHO/S transfectadas de manera simulada-(vector) con β RG-2 α (α) o rhNRG-2 β .

La Figura 3C muestra un análisis de transferencia Western de medio condicionado de células CHO que expresan NRG-2 β de rata.

25 Las Figuras 4A-B muestran análisis de transferencia tipo Western de fosforilación del receptor sobre residuos de tirosina en células que responden al tratamiento con polipéptidos NRG-2.

La Figura 5 muestra un análisis por transferencia tipo Western de la expresión de NRG-2 α y NRG-2 β humana recombinantes.

La Figura 6 muestra la secuencia de ácido nucleico para NRG-2 α humana (SEQ ID NO: 1).

30 La Figura 7 muestra la secuencia de aminoácidos para NRG-2 α humana (SEQ ID NO: 2).

La Figura 8 muestra la secuencia de ácido nucleico para NRG-2 β humana (clon 2b7) (SEQ ID NO: 3).

La Figura 9 muestra la secuencia de aminoácidos para NRG-2 β humana (clon 2b7) (SEQ ID NO: 4).

La Figura 10 muestra un análisis de transferencia tipo Western de transfectantes estables usados para la selección con metotrexato.

35 La Figura 11A muestra un gel de poliacrilamida teñido con Coomassie de rhNRG-2 β purificado.

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

La Figura 12 muestra un gel de poliacrilamida teñido con oro de proteína total y rhNRG-2 β purificado.

La Figura 13 muestra un análisis de transferencia tipo Western de la fosforilación del receptores de residuos de tirosina en células que responden a rhNRG-2 β purificada por HPLC.

40 La Figura 14A muestra una fotografía de neuronas dopaminérgicas del cerebro medio pretratadas con rhNRG-2 β y desafiadas con 6-OHDA.

La Figura 14B muestra una fotografía de neuronas dopaminérgicas del cerebro medio no tratadas de control desafiadas con 6-OHDA.

45 La Figura 15A muestra una fotografía que indica la incorporación de BrdU en células neuronales, incluyendo células progenitoras neuronales, cultivadas con rhNRG-2 β .

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

La Figura 16A muestra una fotografía de neuronas de gránulos cerebelosos que migran en un proceso de células gliales.

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

50 La Figura 17 muestra un análisis de transferencia tipo Western de la activación de p42/44 MAPk (Erk) y Akt por proteínas NRG-2.

La Figura 18 muestra un gráfico lineal de incorporación de ³H-Leucina en miocitos ventriculares de rata neonatal tratados con proteínas NRG.

55 Descripción detallada de la invención

La invención proporciona polipéptidos NRG-2 y moléculas de ácido nucleico, anticuerpos que se unen a estos polipéptidos NRG-2, y métodos terapéuticos y de diagnóstico que emplean polipéptidos NRG-2 y moléculas de ácido nucleico.

60 Bioensayos

Los ligandos de NRG-2 y los receptores erbB se expresan en el sistema nervioso, en precursores neuronales y neuronas del cerebro, médula espinal y retina; músculo esquelético y cardíaco; pulmón; timo, riñón; glándulas suprarrenales; piel; epitelio mamario; y otros órganos durante el desarrollo embrionario y en tejidos adultos. Los sitios principales de la expresión de NRG-2 incluyen el cerebelo (células de Purkinje y granulares), bulbo olfatorio,

giro dentado, células piramidales de la corteza occipital, pulmón y timo. Los patrones de expresión de los receptores de NRG-2 en células y tejidos específicos se usan para identificar objetivos celulares de las acciones de NRG-2 y para identificar bioactividades que son relevantes para enfermedades específicas relacionadas con NRG-2, tales como trastornos desmielinizantes de los sistemas periférico y nervioso central; neuropatías; trastornos neurodegenerativos; cardiomiopatías; pérdida de audición, equilibrio o visión; dolor; neurotrauma, cáncer; pérdida auditiva neurosensorial o pérdida de equilibrio neurosensorial por infección viral, envejecimiento o antibióticos (por ejemplo, aminoglicósidos); retinopatía (por ejemplo, degeneración hipertensiva, diabética, oclusiva, macular, retinitis pigmentosa, neuropatía óptica, lesión); enfermedad de Guillaume Barre; accidente cerebrovascular; o lesión cerebral o de la médula espinal. Muchos de los tipos de células sensibles a NRG-2 en tejidos embrionarios, neonatales y adultos expresan combinaciones de los receptores de erbB2/erbB3, erbB2/erbB4 o erbB4 solo. Por ejemplo, tipos de células gliales del sistema nervioso periférico (SNP) y del sistema nervioso central (SNC) expresan erbB2; las células de Schwann también expresan erbB3. En el SNC, se han observado erbB4 y erbB3 en diversos tipos de células gliales, incluyendo astrocitos, progenitores de oligodendrocitos, glía radial en la corteza en desarrollo y glía de Bergmann en el cerebelo. La combinación erbB2/erbB4 se encuentra en los cardiomiocitos ventriculares.

Las utilidades terapéuticas y de diagnóstico para los polipéptidos NRG-2 se identifican, por ejemplo, realizando bioensayos *in vitro*. Se seleccionan sistemas de cultivo que reflejan patrones de expresión de NRG-2, junto con la distribución de receptores particulares, tales como erbB2/erbB4 o erbB4 solo, que son ejemplos de combinaciones de receptores erbB que pueden mostrar una preferencia por NRG-2 sobre NRG-1. Por ejemplo, las bioactividades de NRG-2 se evalúan utilizando glía del SNC, tales como oligodendrocitos y células de envoltura del bulbo olfativo, neuronas dopaminérgicas del cerebro medio, neuronas de gránulos cerebelosos y cardiomiocitos. Estas poblaciones de células expresan receptores NRG, y responden al tratamiento con una o más isoformas de NRG-1 en una variedad de bioensayos cuantitativos. Las actividades de las isoformas de NRG-2 (por ejemplo, rhNRG-2 α , rhNRG-2 β) y NRG-1 (por ejemplo, rhGGF2) se comparan, utilizando cultivos hermanos, en diversos ensayos de dosis-respuesta, incluyendo pero no limitándose a estimulación de proliferación, supervivencia, diferenciación, migración y cambios morfológicos. Las potencias relativas de las isoformas NRG-2 y NRG-1 se determinan sobre la base, por ejemplo, de la concentración de proteína.

Métodos de diagnóstico que emplean moléculas de ácido nucleico, polipéptidos y anticuerpos de NRG-2

Las moléculas de ácido nucleico, polipéptidos y anticuerpos de NRG-2 se usan en métodos para diagnosticar o controlar una variedad de enfermedades y afecciones, incluyendo aquellas que implican mutaciones en, o expresión inadecuada de, genes NRG-2. La expresión de NRG-2 se ha documentado en una variedad de tejidos, como se discutió anteriormente. Por lo tanto, la detección de anomalías en genes NRG-2 o su expresión se utilizan en métodos para diagnosticar, o para controlar el tratamiento o desarrollo de enfermedades de estos tejidos.

Los métodos de diagnóstico se utilizan, por ejemplo, con pacientes que tienen una enfermedad cardiovascular o neurológica, en un esfuerzo por determinar su etiología, y por lo tanto, para facilitar la selección de un curso de tratamiento apropiado. Los métodos diagnósticos también se utilizan con pacientes que aún no han desarrollado una enfermedad cardiovascular o neurológica, pero que pueden estar en riesgo de desarrollar tal enfermedad, o con pacientes que están en una etapa temprana de desarrollar tal enfermedad. Muchas enfermedades cardiovasculares y neurológicas ocurren durante el desarrollo, y por lo tanto, los métodos de diagnóstico también se llevan a cabo en un feto o embrión durante el desarrollo. También, se usan los métodos de diagnóstico en el cribado genético prenatal, por ejemplo, para identificar padres que pueden ser portadores de una mutación recesiva NRG-2.

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

Los niveles de expresión de NRG-2 en una muestra de paciente se determinan usando cualquiera de una serie de técnicas estándar que son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, la expresión de NRG-2 en una muestra biológica (por ejemplo, una muestra de sangre o tejido, o fluido amniótico) de un paciente se controla mediante análisis estándar de transferencia tipo Northern o PCR cuantitativa (véase, por ejemplo, Ausubel y colaboradores, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley y Sons, Nueva York, NY, 1998. PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, HA Ehrlich, Ed., Stockton Press, NY; Yap y colaboradores, *Nucl. Acids Res.* 19: 4294, 1991).

Métodos terapéuticos que emplean moléculas de ácido nucleico, polipéptidos y anticuerpos de NRG-2

La invención incluye métodos para tratar o prevenir enfermedades relacionadas con NRG-2. Las terapias están diseñadas para evitar o superar un defecto del gen de NRG-2, o una expresión del gen de NRG-2 inadecuada o excesiva, y así modular y posiblemente aliviar las condiciones que implican defectos en los genes o proteínas NRG-2. Al considerar diversas terapias, se entiende que tales terapias están, preferiblemente, dirigidas a los órganos afectados o potencialmente afectados, por ejemplo, el corazón o el sistema nervioso. Los reactivos que se usan para modular la actividad biológica de NRG-2 pueden incluir, sin limitación, polipéptidos NRG-2 de longitud completa;

ADNc de NRG-2, ARNm, o ARN antisentido; anticuerpos NRG-2; y cualquier compuesto que module la actividad, expresión o estabilidad biológica de NRG-2.

El tratamiento o prevención de enfermedades resultantes de un gen de NRG-2 mutado se consigue, por ejemplo, sustituyendo un gen de NRG-2 mutante con un gen de NRG-2 normal, administrando un gen de NRG-2 normal, modulando la función de una proteína NRG-2 mutante, que suministra una proteína NRG-2 normal a las células apropiadas, o alterando los niveles de la proteína NRG-2 normal o mutante. También es posible corregir un defecto de NRG-2 para modificar la ruta fisiológica (por ejemplo, una ruta de transducción de señales) en la que participa la proteína NRG-2.

La transferencia génica se consigue usando vectores virales, así como medios no virales que implican transfección *in vitro* por medio de cualquier técnica estándar, incluyendo pero sin limitarse a, fosfato de calcio, dextrano DEAE, electroporación, fusión de protoplastos y liposomas. El trasplante de genes normales en los tejidos afectados de un paciente también puede lograrse transfiriendo un gen de NRG-2 normal a un tipo de célula cultivable *ex vivo*, después de lo cual la célula (o sus descendientes) se inyecta en un tejido objetivo. Otra estrategia para inhibir la función de NRG-2 usando terapia génica implica la expresión intracelular de un anticuerpo anti-NRG-2 o una porción de un anticuerpo NRG-2. Por ejemplo, se coloca el gen (o fragmento del gen) que codifica un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a NRG-2 e inhibe su actividad biológica bajo el control transcripcional de una secuencia reguladora de genes específicos del tejido. Otro enfoque terapéutico implica la administración de polipéptido NRG-2 recombinante, ya sea directamente al sitio de un tejido afectado por una enfermedad potencial o real (por ejemplo, por inyección) o sistémicamente (por ejemplo, mediante cualquier técnica convencional de administración de proteínas recombinantes). La dosis de NRG-2 administrada sistemáticamente depende de una serie de factores, incluyendo el tamaño y la salud del paciente individual, pero, generalmente, se administra entre aproximadamente 0,006 mg/kg y aproximadamente 0,6 mg/kg, inclusive, por día a un adulto en cualquier formulación farmacéuticamente aceptable. Las dosificaciones de NRG-2 suministradas por administración local pueden diferir de la administración sistémica y pueden determinarse usando técnicas estándar conocidas por los expertos en la técnica.

En un paciente diagnosticado por tener una mutación de NRG-2 o una enfermedad relacionada con NRG-2, o como susceptible a mutaciones de NRG-2, expresión aberrante de NRG-2 (incluso si esas mutaciones o patrones de expresión no dan lugar a alteraciones en la expresión de NRG-2 o actividad biológica), o a una enfermedad relacionada con NRG-2, cualquiera de las terapias descritas anteriormente se administran antes de la aparición del fenotipo de la enfermedad. Además, se administran compuestos que demuestran modular la expresión de NRG-2 o la actividad biológica de NRG-2 a pacientes diagnosticados con enfermedades potenciales o reales mediante cualquier dosis estándar y ruta de administración. Alternativamente, se lleva a cabo la terapia génica utilizando un constructo de expresión de ARNm de NRG-2 antisentido para revertir o prevenir el defecto génico antes del desarrollo del curso completo de la enfermedad.

Los métodos terapéuticos están, en algunos casos, dirigidos al tratamiento prenatal. Por ejemplo, se administra a un feto que tiene una mutación de NRG-2, un vector de terapia génica que incluye un gen de NRG-2 normal o una proteína NRG-2 normal. Tal tratamiento puede ser requerido sólo durante un corto período de tiempo, o puede, de alguna forma, ser requerido a lo largo de la vida de dicho paciente. Sin embargo, cualquier necesidad continua de tratamiento se determina usando, por ejemplo, los métodos de diagnóstico descritos anteriormente. También como se discutió anteriormente, las anomalías de NRG-2 pueden estar asociadas con enfermedades en adultos y, por lo tanto, se someten también los adultos a los métodos terapéuticos de la invención.

Identificación de moléculas que modulan la actividad biológica de NRG-2 o cuya actividad biológica se modula mediante NRG-2

El aislamiento de ADNc de NRG-2 (como se describe en el presente documento) también facilita la identificación de moléculas que aumentan o disminuyen la actividad biológica de NRG-2. De forma similar, pueden identificarse moléculas cuya actividad es modulada por la actividad biológica de NRG-2. De acuerdo con un enfoque, se añaden moléculas candidatas en diferentes concentraciones al medio de cultivo de células que expresan ARNm de NRG-2. La actividad biológica de NRG-2 se mide entonces usando técnicas estándar. La medición de la actividad biológica puede incluir, sin limitación, la medición de la proteína NRG-2 y los niveles de moléculas de ácido nucleico, y la fosforilación de NRG-2.

Si se desea, el efecto de los moduladores candidatos sobre la expresión también se puede medir al nivel de la producción de proteína NRG-2 usando el mismo enfoque general y las técnicas estándar de detección inmunológica, tales como transferencia tipo Western o inmunoprecipitación con un anticuerpo específico de NRG-2 (véase más adelante).

Un compuesto de ensayo que se criba en los métodos descritos anteriormente puede ser un compuesto químico, sea de origen natural o derivado artificialmente. Tales compuestos pueden incluir, por ejemplo, polipéptidos, moléculas orgánicas sintetizadas, moléculas orgánicas naturales, moléculas de ácido nucleico y sus componentes. Los moduladores de NRG-2 candidatos incluyen moléculas peptídicas así como moléculas no pépticas (por ejemplo,

moléculas peptídicas o no pépticas encontradas, por ejemplo, en un extracto celular, suero de mamífero o medio de cultivo en el que se han cultivado células de mamífero).

5 Administración de polipéptidos NRG-2, moléculas de ácido nucleico NRG-2 y moduladores de la síntesis o función de NRG-2

10 Se administra una proteína NRG-2, molécula de ácido nucleico, modulador, anticuerpo de NRG-2 neutralizante, o compuesto inhibidor de NRG-2 (por ejemplo, NRG-2 antisentido o un mutante negativo dominante de NRG-2) con un diluyente, portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, en forma de dosificación unitaria a pacientes o animales de experimentación. Además, se emplea la práctica farmacéutica convencional para proporcionar formulaciones o composiciones adecuadas en las que se administran dichas moléculas o compuestos a pacientes que padecen una enfermedad relacionada con NRG-2, tales como trastornos desmielinizantes de los sistemas nervioso periférico y central; neuropatías; trastornos neurodegenerativos; cardiomiopatías; pérdida de audición, equilibrio o visión; dolor; neurotrauma; cáncer; pérdida auditiva neurosensorial o pérdida del equilibrio sensorineural por infección viral, envejecimiento o antibióticos (por ejemplo, aminoglicósidos); retinopatía (por ejemplo, hipertensiva, diabética, oclusiva, degeneración macular, retinitis pigmentosa, neuropatía óptica, lesión); enfermedad de Guillaume Barre; accidente cerebrovascular; o lesión cerebral o de la médula espinal. La administración puede comenzar antes o después de que el paciente sea sintomático.

20 Se puede emplear cualquier ruta de administración apropiada, por ejemplo, la administración puede ser parenteral, intravenosa, intraarterial, subcutánea, intramuscular, intracraneal, intraorbital, oftálmica, intraventricular, intracapsular, intraespinal, intracisternal, intraperitoneal, intranasal, por inhalación hasta lo profundo del pulmón, aerosol, por supositorios, oral o tópica (por ejemplo, mediante la aplicación de un parche adhesivo que porta una formulación capaz de atravesar la dermis y entrar en el torrente sanguíneo). Preferiblemente, la administración es local en el tejido afectado, tal como tejido cardíaco, pulmonar o nervioso. 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 formulaciones intranasales, en forma de polvos, gotas nasales o aerosoles. Cualquiera de las formulaciones anteriores puede ser una formulación de liberación sostenida.

30 Métodos que son bien conocidos en la técnica para preparar formulaciones se encuentran, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, (decimoctava edición), ed. A. Gennaro, 1990, Mack Publishing Company, Easton, PA. Las formulaciones para administración parenteral pueden, por ejemplo, contener excipientes; agua estéril; o solución salina; polialquilén glicoles, tales como polietilenglicol; aceites de origen vegetal; o naftalenos hidrogenados. Se puede usar un polímero de lactida biodegradable, biocompatible, de liberación prolongada, un copolímero de lactida/glicólido o copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno para controlar la liberación de los compuestos. Otros sistemas de administración parenteral potencialmente útiles para compuestos moduladores de NRG-2 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, polioxietileno-9-lauril éter, glicocolato y desoxicolato, o pueden ser soluciones oleosas para administración en forma de gotas nasales, o como un gel.

Síntesis de proteínas, polipéptidos y fragmentos de polipéptidos de NRG-2

45 Los expertos en la técnica de biología molecular comprenderán que se puede usar una amplia variedad de sistemas de expresión para producir las proteínas NRG-2 recombinantes. La célula huésped precisa utilizada no es crítica para la invención. Las proteínas NRG-2 se pueden producir en un huésped procarionta (por ejemplo, *E. coli*) o en un huésped eucariota (por ejemplo, *S. cerevisiae*, células de insecto tales como células Sf9, o células de mamífero tales como células COS, NIH 3T3, CHO, o HeLa). Estas células están comercialmente disponibles, por ejemplo, a través del American Type Culture Collection, Rockville, MD (véase también Ausubel y colaboradores, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley y Sons, New York, NY, 1998). El método de transformación y la elección del vehículo de expresión (por ejemplo, vector de expresión) dependerá del sistema huésped seleccionado. Los métodos de transformación y transfección se describen, por ejemplo, en Ausubel y colaboradores, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Nueva York, NY, 1998, y los vehículos de expresión pueden seleccionarse entre los proporcionados, por ejemplo, en Pouwels y colaboradores, Cloning Vectors: A Laboratory Manual, 1985, Suplemento. 1987).

60 Las características de las moléculas de ácido nucleico de NRG-2 se analizan introduciendo tales genes en diversos tipos de células o utilizando sistemas extracelulares *in vitro*. La función de las proteínas NRG-2 producidas en tales células o sistemas se examinan luego bajo diferentes condiciones fisiológicas. También, se pueden producir líneas celulares que sobreexpresan el producto del gen de NRG-2, permitiendo la purificación de NRG-2 para caracterización bioquímica, producción a gran escala, producción de anticuerpos y terapia de pacientes.

Uso de anticuerpos de NRG-2

65 Los anticuerpos para las proteínas NRG-2 (por ejemplo, las descritas en el presente documento) se usan para detectar proteínas NRG-2 o para inhibir las actividades biológicas de las proteínas NRG-2. Por ejemplo, una

molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o porción de un anticuerpo puede expresarse dentro de una célula para inhibir la función de NRG-2. Además, los anticuerpos pueden acoplarse a compuestos, tales como radionúclidos y liposomas para usos diagnósticos o terapéuticos. Los anticuerpos que inhiben la actividad de un polipéptido NRG-2 también pueden ser útiles para prevenir o retardar el desarrollo de una enfermedad causada por la expresión inadecuada de un gen de NRG-2 mutante o de tipo silvestre.

Construcción de animales transgénicos y animales que no expresan genes específicos

La caracterización de genes NRG-2 proporciona información que permite que los modelos animales que no expresan el gen de NRG-2 se desarrollen mediante recombinación homóloga. Preferiblemente, un animal que no expresa el gen de NRG-2 es un mamífero, lo más preferiblemente un ratón. De manera similar, los modelos animales para sobreproducción de NRG-2 pueden generarse integrando una o más secuencias de NRG-2 en el genoma de un animal, de acuerdo con técnicas transgénicas estándar. Además, se puede estudiar el efecto de mutaciones del gen de NRG-2 (por ejemplo, mutaciones de genes dominantes) usando ratones transgénicos que portan transgenes mutados de NRG-2 o introduciendo tales mutaciones en el gen de NRG-2 endógeno, usando técnicas de recombinación homóloga estándar.

Se puede construir un vector objetivo del tipo del de reemplazo, que puede usarse para crear un modelo que no expresa genes específicos, utilizando un clon genómico isogénico, por ejemplo, de una cepa de ratón tal como 129/Sv (Stratagene Inc., La Jolla, CA). El vector objetivo puede introducirse en una línea derivada adecuadamente de células madre embrionarias (ES) por electroporación para generar líneas celulares ES que portan una forma profundamente truncada de un gen *NRG-2*. Para generar ratones fundadores quiméricos, las líneas celulares objetivo se inyectan en un embrión de ratón en fase de blástula. La descendencia heterocigótica pueden ser entrecruzada hasta homocigosis. Los ratones con desactivación de NRG-2 proporcionan una herramienta para estudiar el papel de NRG-2 en el desarrollo embrionario y en la enfermedad. Además, tales ratones proporcionan los medios, *in vivo*, para ensayar compuestos terapéuticos para la mejoría de enfermedades o afecciones que implican una ruta dependiente de NRG-2 o afectada por NRG-2.

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 su alcance.

EJEMPLO 1

Clonación de ADNc de NRG-2 humana

Se identificó un ADNc de longitud completa que codifica NRG-2 α del cerebelo. Se diseñaron múltiples sondas para diversas regiones de secuencias codificantes de NRG-2 con base en datos de secuencias de roedores y humanos para clonación, mapeo y análisis de secuencias. Antes del cribado de la bibliotecas, se confirmó la especificidad de las sondas mediante el análisis de ARN de cerebelo humano utilizando un enfoque 3' RACE (amplificación rápida de los extremos del ADNc). Se cribaron aproximadamente 400.000 ADNc de dos bibliotecas de ADNc γ t10 del cerebelo humano (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, Catálogo No. HL1128a) con una sonda de oligonucleótido: 5' GCA TCA ACC AGC TCT CCT GC 3' (SEQ ID NO: 5) del dominio EGFL de NRG-2. Se detectaron veinticinco señales de hibridación; veinte de los clones de fago correspondientes a estas señales fueron clonados y analizados posteriormente mediante estudios de hibridación, mapeo físico y secuenciación de ADN. Los resultados de estos análisis fueron consistentes con la existencia de múltiples variantes estructurales (isoformas) entre los clones de NRG-2 humanos que se identificaron. La información estructural preliminar sobre los clones se obtuvo por hibridación de filtros de colonias de fagos y análisis de endonucleasas de restricción de los insertos de ADNc. Los estudios por PCR, utilizando cebadores internos, en pares o en combinación con las secuencias de flanqueo, se utilizaron para obtener datos de mapeo físico (véase la Tabla 1).

Los cebadores utilizados fueron los siguientes:

Cebador 1471: 5' - GCA TCA ACC AGC TCT CCT GC - 3' (SEQ ID NO: 6)
 Cebador 1494: 5' - TGC GAA CTG CTG ACA CCT GT - 3' (SEQ ID NO: 7)
 Cebador 1527: 5' - CCA CCT TTT GAG CAA GTT CAG - 3' (SEQ ID NO: 8)
 Cebador 1528: 5' - GAG GTG GCT TAT GAG TTC TTC - 3' (SEQ ID NO: 9)
 Cebador 1531: 5' - GGC CAC CAC ACA GAC GAT G - 3' (SEQ ID NO: 10)

En primer lugar, se analizaron los tamaños de los insertos, que oscilaban desde 0,8 kb a 3,3 kb (el tamaño promedio fue de aproximadamente 1,7 kb). Los transcritos de NRG-2 contienen un dominio EGFL y secuencias citoplasmáticas que exhiben gran parte de la diversidad estructural de estos polipéptidos, y esta región interna específica se enfocó a continuación en mapear los clones mediante análisis por PCR. Este análisis produjo cuatro grupos de productos, y se identificaron múltiples clones en cada grupo. Por lo tanto, es probable que los cuatro grupos (A-D) representen el grado de diversidad estructural en esta región entre los productos del gen de NRG-2 en el cerebelo humano. Cuatro clones (grupo A) no produjeron ningún producto en este experimento. Este resultado fue consistente con los datos de los experimentos de hibridación, que habían mostrado que estos clones carecían de la

secuencia del cebador en dirección 3' (en el dominio citoplasmático). En el tercer experimento, se determinó la orientación de los clones y se estimó la distancia desde el dominio EGFL hasta los extremos de los clones utilizando cebadores en el dominio EGFL en combinación con cebadores de secuencias de flanqueo en los brazos del fago. Por lo tanto, estos estudios permitieron la segregación de los ADNc de NRG-2 en grupos, y facilitaron la identificación de los ADNc potenciales de longitud completa que codifican isoformas que pueden ser secretadas de NRG-2 humano.

Tabla 1. Mapeo de clones de ADNc cerebelosos de NRG-2 humano

Grupo: clones	Producto interno ¹	Clon más grande: tamaño ²	Extremo 5' hasta EGFL ³	EGFL hasta el extremo 3' ⁴
A: 1, 4, 13, 15	Ninguno	13: 3300	1400	2300
B: 3, 6, 7, 9, 11, 18, 20	170	11: 1050	600	450
C: 10, 12, 14, 16	260	14: 1500	850	650
D: 5, 8, 17, 19	650	8: 1600	800	800

Análisis por PCR de clones de ADNc: los productos se dimensionaron sobre geles de poliacrilamida al 6%; la tabla muestra los tamaños en pares de bases.

- Cebador 1471 en dirección 5' del dominio de EGFL; el cebador 1531 en dirección 3' del dominio citoplasmático.
- Cebadores 1527, 1528 de las secuencias de flanqueo en λ gt10.
- Cebador 1527 en dirección 5' de las secuencias de flanqueo en λ gt10; cebador 1494 en dirección 3' del dominio de EGFL.
- Cebador 1471 en dirección 5' del dominio de EGFL; cebador 1528 en dirección 3' de secuencias de flanqueo en λ gt10.

10 EJEMPLO 2

Análisis de Secuencia del ADN de NRG-2 Humano

15 Para obtener una imagen más completa de las diferentes estructuras, se llevó a cabo la secuenciación del ADN en clones representativos de cada grupo usando un protocolo de secuenciación de ciclos y los mismos cebadores utilizados para el análisis de PCR descrito anteriormente. La comparación de los cóntigos de la secuencia que rodea el dominio de EGFL (de los grupos B-D) entre sí y con secuencias de NRG-2 humanas y de rata condujo a varias conclusiones. En primer lugar, los clones del grupo B coincidían con la estructura de ADNc de NRG-2 β . Estas secuencias conectaron el dominio EGFL con los dominios transmembrana y citoplasmático, y por lo tanto codificaron la proteína NRG-2 unida a la membrana. En segundo lugar, todas las estructuras del grupo C contenían tanto las secuencias α como β , y coincidían con la estructura del ADNc de NRG-2 α . Por lo tanto, los clones del grupo C deben codificar una proteína NRG-2 secretada. El clon 14 parece ser el mejor candidato para una versión completa de esta estructura. En el grupo D, ambas secuencias α y β estaban presentes, pero no eran adyacentes. Se encontró una secuencia de 450 pb que interviene entre estas dos secuencias codificantes conocidas, e inmediatamente adyacentes a las regiones identificadas como secuencias α y β eran secuencias donadoras (GT) yceptoras (AG) de unión de empalme canónico. Por lo tanto, esta estructura probablemente representa un transcrito parcialmente empalmado del gen *NRG-2*.

30 Dada esta información, parece que las formas que pueden ser secretadas de NRG-2 se encontraban más probablemente en los clones de los grupos A y C. El clon 14 sirvió como representante adecuado del grupo C. Dos clones del grupo A avanzaron en paralelo; el clon 13 se seleccionó debido al tamaño de inserto relativamente grande y se siguió el clon 15 debido a la presencia de la secuencia 5' del dominio EGFL que se detectó en experimentos de hibridación. Cuando las secuencias de los clones 13, 14 y 15 se completaron, se hizo evidente que ninguno de ellos solo codificaba una NRG-2 α humana de longitud completa. Sin embargo, dada la superposición sustancial en la estructura de estos clones, estaba claro que partes de cada uno podían unirse entre sí para generar un clon de longitud completa que codifica NRG-2 α . La Figura 1 muestra una representación esquemática de la estructura de estas secuencias; los segmentos de codificación del gen *NRG-2* se muestran en las cajas sombreadas, y las secuencias codificantes (líneas continuas) que están presentes en las isoformas NRG-2 α y NRG-2 β descritas se muestran más arriba; las isoformas de NRG-2 contienen dominios de tipo GGF2, de tipo de inmunoglobulina (Ig), de tipo EGF (EGFL), α , β , transmembrana (M) y citoplasmático (cito); los codones de parada se indican por (*); y las secuencias putativas de intrón se representan por líneas de trazos. Se utilizó un único sitio BsrGI (B) presente en el segmento de codificación α para construir un ADNc de NRG-2 α humana de longitud completa conectando las secuencias 5' del clon 15 con las secuencias 3' del clon 14 y se determinó la secuencia del constructo final. El marco de lectura abierto principal del ADNc de NRG-2 α (figura 6, SEQ ID NO: 1) codifica una proteína de 331 aminoácidos (figura 7, SEQ ID NO: 2).

EJEMPLO 3

Clonación y Construcción de ADNc de NRG-2 β humana

50 El ADNc de NRG-2 β humana se construye parcialmente a partir del ADNc de NRG-2 α humana (el vector y el 5' de

869 pb de la secuencia que codifica el extremo del terminal N de NRG-2 humano, que está presente tanto en las isoformas α como β) y parcialmente de un clon de fago (por ejemplo, se demostró que el clon del fago 11 en estudios de mapeo contiene la secuencia β - véase la Tabla 1, Ejemplo 1 y Ejemplo 2) que contenía un ADNc humano parcial que codifica NRG-2 β humana (dos fragmentos 3': uno contiene la secuencia β y el otro un codón de parada).

El ADNc de NRG-2 α humana (Ejemplo 2) se puede digerir con las enzimas Not I y Xba I (New England Biolabs, Beverly, MA) para generar un vector de 5500 pb y un inserto de 1555 pb que contiene el ADNc. Ambos fragmentos se recuperan de un gel de agarosa al 1% en regulador TAE utilizando el kit y el protocolo de extracción en gel de agarosa de QIAEX II (Qiagen, Inc., Valencia, CA). El fragmento de inserto (1555 pb) se digiere adicionalmente usando Drd I (New England Biolabs, Beverly, MA) para generar un fragmento de 5' de 869 pb y un fragmento 3' de aproximadamente 700 pb. El fragmento de Not I-Drd I de 869 pb se recuperó de un gel de agarosa al 2% en regulador TAE usando el kit y el protocolo de extracción en gel de QIAEX II (Qiagen, Inc., Valencia, CA). Este fragmento de 869 pb contiene el iniciador metionina y codifica la porción del extremo terminal N de NRG-2 β humana. Se liga en el vector de 5550 pb junto con dos fragmentos adicionales, que se derivan de ADNc que tienen secuencias de NRG-2 β humana como se describe a continuación.

La principal diferencia entre las secuencias de NRG-2 α humana y NRG-2 β humana residen entre los sitios Drd I y BsrDI individuales. La isoforma α contiene un segmento de codificación de 77 pb que se empalma en la secuencia de la isoforma β . Para obtener las secuencias que codifican la NRG-2 β humana, se genera un fragmento Drd I-BsrDI de 113 pb, que es 77 pb más corto que la secuencia correspondiente de NRG-2 α humana, a partir del clon 11 del fago como sigue. Cebadores (1551: 5'-GTG-AGC-ACC-ACC-CTG-TCA-TC-3', SEQ ID NO: 11; 1546: 5'-GAG-CTA-GTC-TAG-AGT-GGC-TTA-TGA-GTA-TTT-CTT-C-3', SEQ ID NO: 12) que flanquean los sitios Drd I y BsrDI se usan para amplificar la plantilla de ADN del clon 11 del fago siguiendo los métodos recomendados por el proveedor de Taq Polimerasa (Perkin Elmer/Roche, Branchburg, NJ). El producto de PCR se precipita con etanol, después se digiere secuencialmente usando Drd I y BsrDI para producir un fragmento de 113 pb. De forma similar, el fragmento 3' también se deriva por amplificación por PCR de la plantilla de los clones 11 del fago usando los cebadores 1550 y 1546. El cebador 1550 (5'-CAG-CAG-TTC-GCA-ATG-GTC-AAC-TTC-TCC-TAA-GCA-CC-3', SEQ ID NO: 13) se posiciona para cruzar el sitio BsrDI y contiene una inserción de un solo T que mutará la secuencia objetivo 5'-CAG-CAG-TTC-GCA-ATG-GTC-AAC-TTC-TCC-AAG-CAC-C-3', SEQ ID NO: 14, a 5'-CAG-CAG-TTC-GCA-ATG-GTC-AAC-TTC-TCC-TAA-GCA-CC-3', SEQ ID NO: 15, y por lo tanto, convierte un codón de lisina en un codón de parada TAA. El cebador 1546 se dirige al sitio de clonación del brazo derecho del fago y contiene un sitio Xba I. La digestión del producto usando BsrDI y Xba I genera un fragmento de 425 pb que se convierte en el extremo 3' del ADNc de NRG-2 β humana. Ambos fragmentos de 113 pb y 425 pb se recuperan a partir de geles de agarosa al 2%.

La recuperación de fragmentos se cuantifica mediante electroforesis con respecto a marcadores de ADN bicatenarios de longitud y cantidad conocidas (por ejemplo, digestión con Hind III de fago lambda, New England Biolabs, Beverly, MA, marcadores pGEM, Promega, Madison, WI) y luego cada fragmento purificado se convierte en equivalentes molares. El vector purificado (100 ng) y los tres fragmentos se ligan entre sí (T4 ADN ligasa, New England Biolabs, Beverly, MA) en relaciones equimolares de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el proveedor. Las ligaciones se usan para transformar células bacterianas competentes, tales como XL1 Blue de *E. coli* (Stratagene, La Jolla, CA) de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el proveedor. Las colonias que contienen el vector se seleccionan con base a la resistencia a 50 μ g/ml de ampicilina, y la estructura del ADNc de NRG-2 β humana se analiza por amplificación por PCR y secuenciación de ADN del ADN del plásmido. El marco de lectura abierto principal del ADNc de NRG-2 β humana (Figura 8, SEQ ID NO: 3) codifica una proteína de 298 aminoácidos (Figura 9, SEQ ID NO: 4).

EJEMPLO 4

Expresión de NRG-2 humana

Se construyó un vector para la expresión transitoria y estable de NRG-2 humana en células de mamíferos. El vector pRc/CMV2 (Invitrogen V750-20; véase la Fig. 2) se utilizó para expresar NRG-2 humana. Este vector de 5,5 kb utiliza un promotor de CMV y un sitio de poliadenilación de hormona de crecimiento bovino para dirigir la expresión constitutiva de alto nivel en transfecciones transitorias y estables. La selección de neomicina (G418) puede usarse para seleccionar transformantes estables. La secuencia de ADNc de NRG2- α humana (SEQ ID NO: 1) se clonó direccionalmente en el polienlazador utilizando los sitios Hind III y Xba I. El inserto de ADNc del constructo final se secuenció en ambas cadenas. Los vectores de expresión de NRG-2 humano se expresaron luego en células CHO para proporcionar una fuente confiable de proteína humana recombinante.

Tanto el ADN α como β de NRG-2 humana se transfectaron transitoriamente en células CHO/S (Life Technologies, Inc., Rockville, MD). La expresión heteróloga de los genes transfectados se realizó para garantizar el buen funcionamiento del sistema de células CHO/S. Las transfecciones simuladas se realizaron en paralelo. Las transfecciones se realizaron en placas de 100 mm (por triplicado) por el método de Lipofectamina^{MR} 2000 de acuerdo con protocolos suministrados por el fabricante (Life Technologies, Inc., Rockville, MD). Los lisados celulares y las muestras de medios acondicionados se recogieron 3 o 4 días después de la transfección. Para preparar los

lisados, se lavaron las monocapas de células con PBS, se rasparon de las placas, y se lisaron mediante tres ciclos de congelación-descongelación en 150 μ L de Tris HCl 0,25 M pH 8. Los restos celulares se sedimentaron y se recuperó el sobrenadante. Se recogieron muestras de medio acondicionadas, luego se analizaron directamente o se concentraron y se intercambió el regulador con Tris HCl 10 mM, pH 7,4 usando unidades de Centricon-10 (Ambion).
 5 La secreción de producto del gen NRG-2 humano recombinante biológicamente activo se demostró por la estimulación de la proliferación de células de Schwann después de la transfección transitoria de células CHO/S y de detección de la bioactividad de NRG-2 en el medio acondicionado en comparación con el lisado celular (Marchionni y colaboradores, Nature 362: 312-8, 1993).

10 Las proteínas NRG-2 humanas recombinantes (rhNRG-2) se expresaron eficientemente en los medios acondicionados de las células transfectadas (Figuras 3A y 3B), indicando que estas proteínas pueden ser exitosamente secretadas a partir de células de mamífero. En la Fig. 3A, los medios acondicionados, pero no el lisado celular de las células transfectadas con rhNRG-2 α (y no de células transfectadas en forma simulada) expresaron una banda inmunorreactiva específica que corre a aprox. 56 kD. En la Fig. 3B, tanto las isoformas α como β fueron secretadas en el medio condicionado de células CHO/S transfectadas (observe que la proteína rhNRG-2 β más pequeña (298 aminoácidos) corrió más rápido (aproximadamente 47 kD) que la proteína rhNRG-2 α (331 aminoácidos), como se esperaba).

20 Después de confirmar la bioactividad del constructo de expresión en transfecciones transitorias, se generaron líneas celulares CHO/S estables para expresar rhNRG-2 β . El vector pRc/CMV2 contiene un gen de resistencia a la neomicina, por lo que las células transformadas de forma estable pueden seleccionarse en medios que contienen una concentración eficaz de G418. Después de la transfección de células CHO/S receptoras, se recogieron colonias bien aisladas que sobrevivieron 11 días en los medios selectivos usando anillos de clonación. Se continuaron las líneas celulares que mostraban la expresión de nivel más alto de resistencia a rhNRG-2 β y G418 para una
 25 evaluación posterior. Tres propiedades útiles de las líneas celulares son viabilidad sostenida, adaptación a medios libres de suero (o suero bajo) y nivel de expresión de proteína recombinante. De este modo, varias de las líneas se expandieron en paralelo y se ensayaron para su adaptación a las condiciones de crecimiento libres de suero y la expresión de rhNRG-2 β mediante transferencia tipo Western. El análisis de transferencia tipo Western mostró que el medio esencial modificado de Dulbecco suplementado con suero de ternera fetal al 2% proporcionaba la expresión
 30 óptima de rhNRG-2 β en estos experimentos. La bioactividad se ensayó sobre el material expresado de las líneas candidatas principales. Se clonaron dos aislados por dilución limitante, y se usó una única línea celular aislada para estudios posteriores.

35 Además de generar líneas de células CHO/S estables que expresan proteínas NRG-2, se desarrolló una estrategia basada en la amplificación conjunta de copias integradas de constructos de expresión de rhNRG-2 β y un gen de dihidrofolato reductasa (dhfr) transfectado. Los vectores de expresión de mamíferos se construyeron en pcDNA3.1 (Invitrogen) y pMACSK^k.II (Miltenyi Biotec Ltd.) bajo el control de los promotores de CMV y SV40, respectivamente. Estos vectores se cotransfectaron junto con un vector de expresión de dhfr en células CHO-dhfr y se seleccionaron treinta colonias resistentes a G418, se cultivaron y se analizaron los niveles de expresión mediante transferencia tipo
 40 Western (Figura 10) y RT/PCR. El carril 1 de la Figura 10 muestra la muestra de control rhNRG-2 β , el carril 2 muestra el sobrenadante CHO SD (US) rhNRG2 β a las 48 horas, los carriles 3-5 muestran el clon T3B2 de 24-72 horas, los carriles 6-8 muestran el clon T3B1 de 24-72 horas, el carril 9 muestra los marcadores de peso molecular (Invitrogen cat. # LC5925), los carriles 10-12 muestran el clon T3A6 de 24-72 horas, y los carriles 13-15 muestran el clon T3A5 de 24-72 horas. Los clones T3B2, T3B1, T3A5 se seleccionaron para la clonación por dilución y para
 45 amplificación/selección. La amplificación génica conjunta es inducida por el incremento gradual de las concentraciones de metotrexato y se controlan los clones para aumento en el rendimiento de rhNRG2 β secretado.

EJEMPLO 5

50 Generación y ensayos de antisueros para detectar la proteína NRG-2 expresada

Se generó un antisuero policlonal que detecta específicamente la proteína NRG-2 expresada de la siguiente manera. Se diseñaron péptidos a partir de las secuencias de NRG-2 humanas y de rata deducidas para generar antisueros policlonales de conejo que se utilizan para controlar los niveles de NRG-2 en muestras de expresión y purificación.

55 Los péptidos utilizados fueron los siguientes:

K71983M: APLERNQRYIFFLEPTEQPLVFK (SEQ ID NO: 16)

K71984M: NSRLQFNKVKVEDAGEY (SEQ ID NO: 17)

60 K71985K: NGGVCYYIEGINQLS (SEQ ID NO: 18)

Uno de estos péptidos (K71984M), derivado de la secuencia del dominio de Ig, que es idéntico en las secuencias de NRG-2 de rata y humana deducidas, produjo sueros útiles para NRG-2 β recombinante de rata por transferencia tipo Western en medios acondicionados de células CHO transfectadas (véase la Fig. 3) y no reaccionó de forma cruzada con rhGGF2. Estos antisueros de NRG-2 se purificaron contra el péptido inmovilizado. La Figura 3C muestra un análisis de transferencia tipo Western de medios acondicionado de células CHO que expresan NRG-2 β de rata. Los

carriles contienen ya sea 20 μ L de medio acondicionado concentrado 15 veces de células CHO que expresan rrNRG-2 β (izquierda) o 10 ng de rhGGF2 (derecha). Se usó suero anti-NRG-2 a una concentración de 1 μ g/mL y se detectó específicamente rrNRG-2 β , a 46 kD, pero no rhGGF2, que corre a 80 kD.

- 5 Además, el análisis de medios de cultivo a partir de monocapas transitoriamente transfectadas de células CHO/S, utilizando los plásmidos de expresión rhNRG-2 α y rhNRG-2 β y un anticuerpo policlonal de conejo surgido contra el péptido K71984M, indicó que tanto rhNRG-2 α como rhNRG-2 β se expresaron y migraron a aproximadamente 55 kD y 47 kD, respectivamente (Figura 5).

10 EJEMPLO 6

Bioensayo para la evaluación de la actividad biológica de rhNRG-2 α y rhNRG-2 β expresados

15 Se desarrolló un bioensayo para la detección de rhNRG-2 α biológicamente activo. La señalización de neuregulina ocurre a través del receptor tirosina quinasa erbB pertenecientes a la familia de receptores EGF. La unión del ligando NRG y la activación del receptor pueden detectarse mediante transferencia tipo Western de lisados celulares tratados usando antisueros dirigidos contra residuos de tirosina fosforilados. Este ensayo se usa para estudiar las interacciones de las proteínas NRG-2 y los receptores erbB en una variedad de tipos de células incluyendo, pero sin limitarse a, células de Schwann, progenitores de oligodendrocitos, miotubos esqueléticos, cardiomiocitos y líneas de células tumorales humanas procedentes de adenocarcinomas de mama y próstata. La NRG-2 biológicamente activa (por ejemplo, medio acondicionado de células CHO que expresan NRG-2 β recombinante de rata) se puede detectar usando este ensayo en la línea celular de adenocarcinoma de mama humano MCF-7. Los resultados de un experimento que prueba NRG-2 β de rata (rrNRG-2 β) y rhGGF2 en células MCF-7 mediante una transferencia tipo Western de un receptor fosfotirosina se muestra en la Fig. 4A. Se cultivaron células MCF-7 en placas de 24 pozos (2 $\times 10^5$ células/pozo) y se trataron durante 15 minutos en DMEM-FCS al 0,1% que contiene 10 ng/mL de rhGGF2 o diversas diluciones de medio acondicionadas por células CHO que expresan RhNRG-2 β . Después del tratamiento, se retiraron los medios y se lavaron las células una vez, luego se lisaron los cultivos y se analizaron las muestras mediante transferencia tipo Western (Canoll y colaboradores, Neuron 17, 229-243, 1996). Los receptores ErbB fosforilados se detectan con el anticuerpo fosfotirosina RC20B (Transduction Laboratories, Lexington, KY). Una muestra de control positivo para este análisis es un lisado de células A431 tratadas con EGF (el carril más a la izquierda, Figura 4A). Cuando no se añadieron ni rhGGF2 ni rrNRG-2 β al medio de cultivo, no había proteínas fosforiladas detectables en tirosina. Sin embargo, la adición de diversas concentraciones de NRG-2 β mostró un aumento dependiente de la dosis en la fosforilación a 185 kd. Esta banda coincide con la posición esperada de los receptores ErbB2 y ErbB3, que también fueron fosforilados en respuesta al tratamiento con rhGGF2 (10 ng/mL). Por lo tanto, este bioensayo proporciona un método confiable para verificar la bioactividad de rhNRG-2 α y rhNRG-2 β expresados y purificados. Este ensayo, cuando se aplica a la proteína recombinante purificada, permite la cuantificación de la bioactividad de NRG-2 en curvas de respuesta a la dosis que proporcionan datos comparables a los ensayos de síntesis de ADN. Los bioensayos de receptor tirosina quinasa en células MCF-7 tratadas con medios acondicionados de transfecciones transitorias de células CHO/S o con proteínas NRG recombinantes purificadas se muestran también en la Fig. 4B.

EJEMPLO 7

Purificación de cantidades en miligramos de rhNRG-2 α o β

45 El medio acondicionado recogido de una línea celular productora (que expresa rhNRG-2 α) se ajusta a pH 6,0 con ácido acético y se carga directamente sobre una columna de S-sefarosa equilibrada con acetato de sodio (pH 6,0). El material unido se eluye con NaCl 1M en regulador de acetato, equilibrado en regulador de sulfato de amonio y se pasa sobre una columna de interacción hidrófoba (Butil Sefarosa FF) en el mismo regulador. El material unido se eluye con regulador de baja salinidad (sulfato de amonio 800 mM) y se recoge el pico de rhNRG-2 α . Se cambia el regulador del material recolectado y se concentra hasta 1 mg/ml en regulador de formulación (arginina 100 mM, sulfato de sodio 100 mM, NaAc 20 mM, manitol al 1%, pH 6-7) usando un cartucho en espiral de Amicon. Una etapa final opcional de purificación es una columna Sefacril 200 HR y el pico de rhNRG-2 α eluido se formula en regulador de formulación. Un enfoque alternativo es seguir el esquema de purificación basándose en cromatografías de afinidad con heparina, quelato de Cu y de fase inversa C4 (Higashiyama y colaboradores, J. Biochem. 122: 675-680, 1997).

60 Las fracciones de proteínas de las columnas cromatográficas se controlan mediante transferencia tipo Western (por ejemplo, véanse las Figura 3A-C) para identificar el pico de rhNRG-2 α o β secretados. Las fracciones del pico y las preparaciones finales se analizan mediante fosforilación del receptor en células MCF-7 (véanse las Figs. 4A-B). La pureza se evalúa por electroforesis en gel (tinción con azul de Coomassie) y por HPLC analítica (columna Vydac C8 corrida en un gradiente de acetonitrilo en ácido trifluoroacético al 0,1%). Las concentraciones de proteínas se determinan mediante el ensayo de ácido bicinonínico (BCA) (Pierce) con albúmina de suero bovino utilizado como patrón.

65

Otro plan general para la purificación implica la captura por cromatografía convencional sobre intercambio catiónico seguido por la resolución de contaminar proteínas a través de una o más etapas, por ejemplo, utilizando cromatografía de carboximetil Sefarosa seguido por HPLC de fase inversa.

5 En resumen, se equilibraron columnas de carboximetil-sefarosa (de flujo rápido) de diversos tamaños con NaCl 200 mM, Tris 10 mM a pH 7,4, luego se cargaron muestras en medios acondicionados y se lavó la columna con aproximadamente 3 volúmenes de NaCl 200 mM, Tris 10 mM, pH 7,4 (hasta que la absorbancia había alcanzado la línea de base). La proteína unida se eluyó con NaCl 500 mM, Tris 10 Mm a pH 7,4. Esta elución fue seguida por un lavado de alta salinidad (NaCl 1 M, Tris 10 mM a pH 7,4) por 3 volúmenes de columna. Se recogieron las fracciones y se analizaron mediante tipo Western y geles de proteína teñidos con azul o Coomassie o dorado (4-20% de acrilamida Tris-glicina-SDS). Dependiendo de la escala de la columna y la cantidad de proteína cargada capturada, rhNRG-2 β representó de 10-70% de la proteína eluida en NaCl 0,5 M de la columna. No se detectó rhNRG-2 β detectable en el flujo, ni en las fracciones de NaCl 0,2 M o NaCl 1M, siempre que la columna no estuviera sobrecargada. Se obtuvieron mejoras significativas en la recuperación (> 90%) mediante la inclusión de inhibidores de proteasa y corriendo la columna en frío. Se aumentó la escala de cromatografía de captura, comenzando con columnas de 10 mL, hasta columnas de 40 mL, 100 mL y 200 mL. Los resultados globales fueron consistentes tanto en términos de recuperación como de purificación, lo que indica que la escala de esta etapa se puede ajustar para adaptarse al volumen del material de partida disponible.

20 El método de purificación se desarrolló adicionalmente con HPLC de fase inversa utilizando una columna C4 (Vydac 214 TP 1010, columna de 1 cm x 25 cm) operada en una estación de trabajo de cromatografía de perfusión Biocad. Se realizaron una serie de pruebas piloto sobre fracciones combinadas de varias columnas de carboximetil Sefarosa que contenían rhNRG-2 β en Tris HCl 10 mM pH 7,4, NaCl 0,5 M. La columna se opero a un velocidad de flujo de 1 mL/min y se equilibró en TFA al 0,2%. Después de inyectar la muestra, se lavó la columna durante 10 min. en TFA al 0,2% seguido con una rampa lineal durante 30 min. con acetonitrilo hasta el 90%, TFA al 0,2% y una etapa final de lavado por 10 min con acetonitrilo hasta el 90%, se utilizó TFA al 0,2% para completar el método. Las fracciones se analizaron mediante transferencia tipo Western. Sólo se incluyeron en la combinación final las fracciones que contenían rhNRG-2 β muy puro. Como se evaluó mediante tinción del gel con azul de Coomassie mostrado en la Fig. 11, la preparación de rhNRG-2 β era aproximadamente un 92% pura. Sin embargo, aproximadamente el 60-70% de la inmunoreactividad detectada a través del cromatógrafo de HPLC no se incluyó en la combinación de rhNRG-2 β . Por lo tanto, aunque se ha conseguido una purificación del 90% en 2 etapas, se puede realizar una tercera etapa para permitir una recuperación más completa de rhNRG-2 β . Esta tercera etapa puede incluir heparina sefarosa y/o varias modificaciones de la etapa por HPLC de fase inversa (por ejemplo, variaciones en disolventes).

35 La tinción con oro proporciona otro método sensible para detectar proteínas contaminantes en preparaciones de proteínas, y esta mancha detecta fácilmente cantidades de nanogramos de proteína. Para visualizar el proceso de purificación y analizar más a fondo la pureza de rhNRG-2 β , se compararon muestras de diferentes etapas de purificación (Fig. 12). Las muestras se corrieron en geles de SDS PAGE al 4%-20% (Novex, cat. # EC 6025) en condiciones reducidas. Los geles se transfirieron a membranas de PVDF, y se tiñeron para la proteína total con Gold Stain (Amersham, cat. # RPN490). Para evitar la sobrecarga en el carril, se cargó el material de partida (medios acondicionados libres de suero) al 1% de la cantidad relativa de las muestras de purificación. La observación central de este análisis fue que se había conseguido una purificación muy significativa en dos etapas.

45 El ensayo de fosforilación de tirosina realizado en la línea celular MCF-7 (adenocarcinoma mamario humano) se usó para medir la bioactividad de muestras de NRG-2 purificadas. En resumen, los cultivos se retaron con muestras de ensayo (diluciones de muestras de purificación en medio que contenía FCS al 0,1%) durante 15 min a 37°C, luego se aspiró el medio y se añadieron 50 μ L de regulador de muestra 2X que contenía DTT y ortovanadato de sodio 1 mM. Las muestras se prepararon entonces para electroforesis y transferencia tipo Western. La muestra de control, lisado de células A431 tratadas con factor de crecimiento epidérmico, fue proporcionada por el proveedor (Transduction Laboratories, Lexington, KY). Además de controlar la producción de rhNRG-2 β , se examinó la actividad de muestras purificadas por HPLC de rhNRG-2 β diluidas en vehículos compatibles con procedimientos de purificación tales como 50% de acetonitrilo (AN) o PBS (Figura 13). En las concentraciones utilizadas en este experimento, AN no interfirió dramáticamente con la señalización de NRG.

55 EJEMPLO 8

Actividad de NRG-2 en Progenitores de Oligodendrocitos

60 La evaluación de los efectos de rhNRG-2 α y rhNRG-2 β en la proliferación y supervivencia de progenitores de oligodendrocitos se realiza utilizando rhGGF2 para comparación. Los progenitores de oligodendrocitos se generan a partir de rata de 2 días de edad de acuerdo con el método de McCarthy y DeVellis (J. Cell Biol. 85: 890-902, 1980), y las células se cultivan en medio definido N2 que contiene FBS al 0,5% (DM+) durante uno a tres días para enriquecer las células en el linaje de oligodendrocitos. La pureza de los cultivos se establece por análisis de inmunofluorescencia usando una serie de anticuerpos dirigidos contra GFAP, un marcador para astrocitos; OX42 monoclonal, un marcador para microglia (Harlan Bioproducts for Science); Anti-A2B5 monoclonal (Boehringer Mannheim), un marcador para progenitores O-2A; O4 y O1, que reconoce oligodendrocitos tempranos y maduros

respectivamente (Sommer y colaboradores, Dev. Biol 83: 311-327, 1980); RPTP- β (obsequio de J. Schlessinger, Centro médico de NYU) y anticuerpos de nestina (Developmental Studies Hybridoma Bank) que reconocen preferencialmente células tempranas en el linaje de oligodendrocitos (Canoll y colaboradores, Neuron 17, 229-243, 1996; Gallo y colaboradores J. Neurosci, 15: 394-406, 1995).

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

Para evaluar el efecto NRG-2 en la supervivencia de las células, se cambian las células que crecen en medio acondicionado con B104 por medio DM+ durante tres días. Luego se cambian ya sea medio N2 o DMEM con o sin rhGGF2, rhNRG-2 α o rhNRG-2 β durante 12 o 24 horas y se tiñen con el kit de tinción Live/Dead (Molecular Probes, Inc.) durante 15 minutos siguiendo las instrucciones del fabricante. Los criterios morfológicos para cuantificar la muerte celular, es decir, el control de células picnóticas en microscopía de fase y el ensayo MTT (Sigma), se usan en experimentos separados.

EJEMPLO 9

Actividades de NRG-2 en células envoltantes del bulbo olfatorio

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

Las OBEC se purifican a partir de ratas de 7 días de nacidas mediante clasificación de células activadas por fluorescencia utilizando el anticuerpo 04 (Barnett, En: Culture of Animal Cells, I.R Freshney, 3ª Edición, páginas 337-341) Wiley-Liss, New York, New York, 1993, Barnett y colaboradores, Dev Biol. 155: 337-350, 1993). Después de la clasificación, se siembran las suspensiones de células en cubreobjetos y se incuban en DMEM-BS que contiene medio condicionado con 10% de astrocitos (ACM) durante la noche a 37°C (para promover la supervivencia de las células) antes del tratamiento con factores de crecimiento o ACM. Se ensaya la actividad mitogénica mediante la incorporación de BrdU en células en división, y los ensayos de supervivencia celular y apoptosis se realizan como se describió (Pollock y colaboradores, Eur. J. Neurosci 11: 769-780, 1999).

EJEMPLO 10

Actividades de NRG-2 en neuronas dopaminérgicas del cerebro medio.

El receptor de NRG, erbB4 se expresa en neuronas dopaminérgicas del cerebro medio de la rata, ratón y mono. La administración de proteínas NRG humanas recombinantes al cuerpo estriado es útil en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Los estudios que utilizan los ejemplos de las proteínas, rhNRG-2 α , rhNRG-2 β y rhGGF2 se llevan a cabo para investigar más a fondo la respuesta del sistema nigrastratial dopaminérgico a las NRG. Las dos proteínas NRG se comparan *in vitro* para la actividad promotora de la supervivencia (es decir, protección contra la muerte celular inducida por agentes que inducen estrés oxidativo) en neuronas dopaminérgicas (por ejemplo, de roedores fetales y líneas de células de neuroblastoma humano, por ejemplo, SKNMC). Las células pretratadas con diferentes concentraciones de rhNRG-2 α , rhNRG-2 β o rhGGF2 se someten a un tratamiento durante veinticuatro horas de metadiona 1 μ M o dietilditiocarbamato 100 mM para inducir estrés oxidativo y la muerte celular se cuantifica por métodos estándar. También se puede utilizar un modelo *in vivo* de liberación de dopamina y evaluaciones electroquímicas y de comportamiento de la función dopaminérgica en ratas.

Las proteínas NRG se ensayaron para determinar la actividad promotora de supervivencia en las neuronas dopaminérgicas de rata *in vitro*. Específicamente, se determinó si las proteínas NRG eran neuroprotectoras para neuronas dopaminérgicas que fueron desafiadas en cultivo con 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Las células pretratadas con rhNRG-2 β o rhGGF2 y los cultivos de control sin tratar se expusieron a 6-OHDA 50 μ M durante 24 h, luego se tiñeron los cultivos para la tirosina hidroxilasa (TH) y se examinaron mediante microscopía óptica (Figura 14). La Figura 14 muestra los cultivos primarios mesencefálicos inmunoteñidos para tirosina hidroxilasa (TH) el día 7 *in vitro* (DIV). El panel superior muestra un cultivo tratado con 100 nanogramos de rhNRG-2 β comenzando

diariamente a DIV0 y terminando con DIV3. En DIV4 se trató el cultivo con 6-OHDA 50 μ M. El panel inferior muestra un cultivo que no recibió ningún pretratamiento, pero se trató con 6-OHDA 50 μ M en DIV 4. Ambos cultivos se analizaron para inmunorreactividad TH en DIV 7. La barra de calibración es igual a 50 micrómetros y se aplica a ambos paneles superior e inferior. Se observaron patrones de tinción similares en cada uno de los cultivos. La densidad, el número y la longitud de las neuritas de las neuronas positivas para TH se redujeron mediante el tratamiento con 6-OHDA en el cultivo que no recibió ningún tratamiento previo. Por el contrario, el cultivo pretratado con rhNRG-2 β muestra un desarrollo morfológico normal, que es comparable con los resultados observados con rhGGF2. Este resultado se ha replicado en varios experimentos de cultivo. Los resultados indican que rhNRG-2 β tiene efectos beneficiosos *in vivo*, que se pueden probar, por ejemplo, en un modelo animal de la enfermedad de Parkinson.

EJEMPLO 11

Desarrollo neuronal y migración en el cerebelo

Las isoformas de NRG-1, NRG-2 y el receptor erbB4 se expresan a niveles elevados en el cerebelo (Chen y colaboradores, J Comp Neurol 349: 389-400, 1994, Chang y colaboradores, Nature 387: 509-512, 1997, Lai y colaboradores, Neuron 6: 691-704, 1991). RhNRG-2 α , rhNRG-2 β y rhGGF2 pueden evaluarse en ensayos de cultivo celular de migración y neurogénesis en el cerebelo. RhNRG-2 α , rhNRG-2 β y rhGGF2 se comparan con respecto a su efecto en la velocidad de migración de las neuronas de gránulos cerebelosos en un sustrato de células gliales. Los cultivos de impresión de cerebelo de rata de 5 días de nacida que contiene glia de Bergmann intacta con neuronas migratorias unidas a ellos, se elaboran como se describió (Anton y colaboradores, J. Neurosci., 16: 2283-2293, 1996). Se controla la migración neuronal utilizando un microscopio Zeiss axiovert 135 equipado con un objetivo Zeiss W63, con imágenes registradas en un disco óptico. Los cambios en la velocidad y el patrón de la migración neuronal, las interacciones neurona-gliar y la morfología se controlan en respuesta a rhNRG-2 α , rhNRG-2 β y rhGGF2.

Se estudian los efectos sobre la neurogénesis de gránulos cerebelosos en cultivos disociados de neuronas granulares cerebelosas de rata recién nacida. Se purifican los precursores neurales en división a partir del cerebelo de 5 días de nacido mediante centrifugación en gradiente de densidad de Percoll y se colocan en cultivo celular disociado. Los cultivos se tratan entonces con BrdUrd 10 μ M (para marcar células en división) y con diversas concentraciones de rhNRG-2 α , rhNRG-2 β y rhGGF2. Después de dos a siete días adicionales en cultivo, la diferenciación en linajes de células neuronales y gliales se evalúa mediante inmunotinción usando marcadores específicos de tipo celular, tales como GFAP (glial) y TUJ1 (neuronal). Para cada condición de cultivo, se enumeran el número total de células, las células marcadas con BrdU y las células identificadas con cada marcador. Las células que entraron en un linaje celular particular desde la exposición a estos factores de crecimiento se identifican como aquellas marcadas con BrdU más uno de los marcadores. El porcentaje de células marcadas con BrdU teñidas con cada marcador proporciona así una medida de los efectos de cada factor de crecimiento sobre la génesis y supervivencia de las neuronas y la glia. Se utilizan el análisis del número total de células en diversos puntos de tiempo y el número de células apoptóticas bajo diferentes condiciones para evaluar cualquier efecto potencial de rhNRG-2 α , rhNRG-2 β y rhGGF2 en la supervivencia selectiva de precursores neuronales o sus derivados neuronales o gliales.

Las isoformas de NRG-1, NRG-2 y el receptor erbB4 se expresan a niveles elevados en el cerebelo, haciendo por lo tanto de los estudios *in vitro* en células neurales del cerebelo un componente importante de estos estudios. Tanto rhNRG-2 β y rhGGF2 fueron evaluados en ensayos de cultivo celular de migración y neurogénesis en el cerebelo. Se elaboraron y analizaron cultivos de impresión de cerebelo de rata de 5 días después de nacidas contenían glia de Bergmann intacta con neuronas migratorias unidas a ellas. Se controló la migración neuronal utilizando un microscopio Zeiss axiovert 135 equipado con un objetivo Zeiss W63, con imágenes registradas en un disco óptico. Los cambios en la velocidad y el patrón de migración neuronal, las interacciones neurona-gliar, y la morfología se controlaron en respuesta a rhNRG-2 β y rhGGF2 (Figs. 16A-B). La velocidad de migración neuronal de neuronas de gránulos cerebelosos se midió antes y después de la exposición a rhNRG-2 β (100 ng/mL), rhGGF2 (50 ng/mL), o medios de control no suplementados. La Figura 16A muestra las neuronas que migran en un proceso de células gliales controlado antes de (paneles a la izquierda de la flecha negra) y después de (paneles a la derecha de la flecha negra) la adición de factores de crecimiento (mostrados aquí como rhGGF2). El tiempo transcurrido entre cada panel es de una hora. La Figura 16B muestra que la exposición a rhGGF2 promovió la velocidad de migración de las neuronas en un 45 \pm 2,1%. Por el contrario, ni el medio de control ni rhNRG-2 β alteraron la velocidad de migración. El asterisco indica significancia, P < 0,05. Los datos mostrados son media \pm SEM (n > 16 para cada grupo). Por lo tanto, en contraste con el aumento observado en la velocidad de migración neuronal promovida por rhGGF2, rhNRG-2 β no tuvo un efecto evidente. Sin embargo, cuando se estudiaron los progenitores neurales cerebelosos en cultivo disociado, rhNRG-2 β promovió la proliferación y/o supervivencia de neuronas de gránulos externos (EGL) (Figs. 15A-B). Se disociaron las células de la capa externa de gránulos (EGL) y se cultivaron en medio neurobasal (NB)/N2 o en medio NB/N2 suplementado con rhNRG-2 β 100 ng/mL durante 5 días. Se añadió BrdU 10 μ M a todas los cultivos desde el comienzo. Se fijaron luego las células y se probaron con un anticuerpo específico para neuronas policlonales (Tuj-1, Babco) y con anticuerpos monoclonales anti-BrdU. Se contaron las células que fueron marcadas con Tuj-1 solamente (es decir, neuronas, asterisco [A]), BrdU + Tuj-1 (es decir,

neuronas generadas a partir de neuroblastos en división en cultivo, flecha [A]) y BrdU solamente (es decir, células no neurales, punta de flecha [A]). Comparado con el control, se encontró que más neuronas (flecha, [A]) habían incorporado BrdU (naranja) en sus núcleos cuando se cultivaron en medio que contenía rhNRG-2 β . Se detectó la inmunoreactividad de BrdU con antirratón conjugado con Cy3 (Rojo). Se detectó la inmunoreactividad de Tuj-1 con anti-conejo conjugado con FITC. Se contaron los números de células positivas para Tuj-1 y BrdU. Los recuentos de células del grupo de rhNRG-2 β se normalizaron con respecto al grupo control para obtener un cambio basal en el número de neuronas positivas para BrdU. Este resultado sugiere que la rhNRG-2 β promueve la proliferación de células EGL o la supervivencia selectiva de las neuronas de gránulos cerebelosos recién generadas. Estos datos ejemplifican por lo tanto una bioactividad en las células neurales que es más generalmente aplicable a las poblaciones neuronales que expresan erbB4.

EJEMPLO 12

Actividades de NRG-2 en cardiomiocitos ventriculares.

Para estudiar el papel de los ligandos de NRG y sus receptores en el desarrollo y el miocardio después de nacidos, se estudió la capacidad de las proteínas NRG-2 para promover la proliferación, supervivencia y crecimiento de miocitos cardiacos de ratas neonatales y adultas aisladas. Los tres receptores conocidos para las neuregulinas, erbB2, erbB3 y erbB4, se expresan en el corazón en desarrollo en E14, después de lo cual la expresión de erbB3 disminuye rápidamente mientras que la expresión de erbB2 y erbB4 persiste en los miocitos ventriculares hasta la edad adulta. Las actividades *in vitro* de rhNRG-2 α y rhNRG-2 β en cardiomiocitos se evalúan en comparación con rhGGF2. Específicamente, se comparan los dos factores de crecimiento para determinar los efectos sobre la supervivencia de los cardiomiocitos, la hipertrofia y la expresión de la proteína contráctil, como se describe a continuación. Los cultivos primarios de miocitos ventriculares de ratas neonatales (NRVM) se preparan como se describió anteriormente (Springhorn y colaboradores, J. Biol. Chem. 267: 14360-14365, 1992). Para enriquecer selectivamente en miocitos, las células disociadas se centrifugan dos veces a 500 rpm durante 5 min, se siembran previamente en placa dos veces durante 75 min y finalmente se siembran en placa a baja densidad (0,7-1x10⁴ células/cm²) en medio DME suplementado con FBS al 7%. Se añade citosina arabinósida (AraC, 10M, Sigma) durante las primeras 24-48 h para evitar la proliferación de no miocitos. A menos que se indique lo contrario, todos los experimentos se realizan 36-48 h después de cambiar a un medio libre de suero, DME más ITS (Sigma). Utilizando este método, se obtienen rutinariamente cultivos primarios con > 95% de miocitos, como se evaluó mediante observación microscópica de contracción espontánea y por tinción de inmunofluorescencia con un anticuerpo monoclonal de cadena pesada de antimiosina cardíaca (anti-MHC, Biogénesis, Sandown, NH).

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

Las mediciones de las velocidades de síntesis de proteína (captación de [³H] leucina) se utilizan para controlar los efectos del factor de crecimiento sobre la hipertrofia de cardiomiocitos. Para estos experimentos se añaden de mitosina arabinósida 10 μ M al medio de cultivo. Se cultivan las células en medio libre de suero durante 36 a 48 h y luego se estimulan con diferentes dosis de rhNRG-2 α , rhNRG-2 β o rhGGF2. Después de 40 h, se añade [³H] leucina (5 μ Ci/mL) durante 8 horas y se lavan las células con PBS y se recogen con TCA al 10%. Se determina la radiactividad precipitable por TCA por recuento de centelleo.

Se usa inmunocitoquímica para examinar los cambios en el fenotipo de miocitos con rhNRG-2 α , rhNRG-2 β o rhGGF2. Por ejemplo, después del tratamiento con factores de crecimiento, se fijan las células en paraformaldehído al 4% (p/v) durante 30 min a temperatura ambiente, se enjuagan con PBS, se permeabilizan con Triton X-100 al 0,1% durante 15 min y luego se incuban con FBS al 1% durante otros 15 minutos, seguido por incubación con anticadena pesada de miosina (1:300) y se visualiza con el segundo anticuerpo conjugado con TRITC (NRVM) o conjugado con FITC (ARVM): se examinan los ARVM usando un microscopio confocal MRC 600 con un Láser de Kr/Ar.

Se evaluaron las actividades *in vitro* de rhNRG-2 α y rhNRG-2 β en cardiomiocitos en comparación con rhGGF2. Se realizaron estudios sobre hipertrofia celular (controlados mediante la medición de la síntesis de proteínas) y la activación de vías de señalización que incluyen p42/44 MAPK y Akt (Fig. 17 y Fig. 18). Se sembraron miocitos ventriculares de rata neonatal aislados a partir de un ventrículo de rata neonatal de 1 día de edad en placas de cultivo de tejidos de 24 pozos con 80.000 células/pozo durante 24 horas en FCS al 10%, después se dejaron sin

5 suero durante la noche. Las células se trataron con neuregulinas recombinantes en presencia de ³H-leucina durante 24 horas. Se precipitó la proteína celular con TCA al 5% y se lisó con NaOH 0,4 N. Se midió la incorporación de ³H-leucina con un contador de centelleo y se presentó como el promedio de 4 pozos tratados idénticamente divididos por los recuentos promedio en células no tratadas. Los miocitos ventriculares de rata neonatal se sembraron en placas en p100s ~ 2-3 millones de células/placa durante 24 horas en FCS al 10%, a continuación se dejaron sin suero durante 24 h. Se trataron las células con neuregulinas recombinantes durante 10 min, luego se lisaron con regulador que contenía proteasa e inhibidores de fosfatasa (New England Biolabs). Se corrieron las muestras que representan 70 µg de proteína en un gel al 10% (BioRad) y se transfirieron a una membrana de PVDF para la detección de Erk o Akt fosforilados usando anticuerpos específicos de fosfato de New England Biolabs. Tanto rhGGF2 como rhNRG-2β aumentaron la síntesis de proteínas en aproximadamente un 40% en todas las concentraciones examinadas. Sin embargo, rhNRG-2α no tuvo ningún efecto sobre la síntesis de proteínas sobre la concentración analizada. La mancha mostrada (Figura 17) es representativa de 2 experimentos separados.

15 Estos resultados indican que la señalización de NR2 puede actuar para promover la proliferación, supervivencia y crecimiento de miocitos cardíacos, tanto durante como después de la trabeculación del miocardio. Además, la persistencia de los receptores NRG en el corazón del recién nacido y en el adulto sugiere un papel continuo para las neuregulinas en la adaptación miocárdica al estrés o lesión fisiológica.

20 EJEMPLO 13

Ensayo de supervivencia celular y detección de apoptosis

25 La viabilidad celular se determina mediante el ensayo de respiración de células en bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT, Sigma). Los cultivos primarios de NRVM después de 2 días en medio libre de suero se estimulan con diferentes concentraciones de rhNRG-2α, rhNRG-2β o rhGGF2 durante 4 o 6 días. Los ARVM se mantienen en medio ACCTT o medio ACCTT más diferentes concentraciones de rhNRG-2α, rhNRG-2β o rhGGF2 durante 6 días. El MTT se incuba luego con las células durante 3 h 37°C. Las células vivas transforman el anillo de tetrazolio en cristales de formazán azul oscuro que pueden cuantificarse mediante la lectura de la densidad óptica a 570 nm después de la lisis celular con dimetilsulfóxido.

30 La apoptosis se detecta en los miocitos neonatales y adultos usando el ensayo de marcación de corte en el extremo con dUTP mediado por la deoxinucleotidiltransferasa terminal (TdT) (TUNEL). La marcación en el extremo 3' del ADN con dUTP conjugado con fluoresceína se realiza usando un kit de detección de muerte celular *in situ* (Boehringer Mannheim) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se contrastan con un anticuerpo anti-MHC como se describió anteriormente y también se tiñen los núcleos con Hoescht 33258 (10 µM, Sigma) durante 5 minutos. Se contaron más de 500 miocitos en cada cubreobjetos y se calculó el porcentaje de miocitos positivos para TUNEL.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido NRG-2 recombinante que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2 para uso en el tratamiento o profilaxis de una afección fisiopatológica en un sujeto, en donde el polipéptido NRG-2 recombinante aumenta la mitogénesis, supervivencia, crecimiento o a diferenciación de una célula de músculo, en donde la célula de músculo expresa un receptor erbB que es selectivo para el polipéptido NRG-2, y en donde la afección fisiopatológica se selecciona del grupo que consiste en cardiomiopatía, daño isquémico, trauma cardíaco e insuficiencia cardíaca.
- 10 2. El polipéptido NRG-2 recombinante para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la célula de músculo es una célula de músculo cardíaco.
- 15 3. Un método *ex vivo* para aumentar la mitogénesis, supervivencia o crecimiento de una célula de músculo que comprende poner en contacto la célula de músculo con un polipéptido NRG-2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2.
4. El método *ex vivo* de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la célula de músculo es un cardiomiocito.
- 20 5. El método *ex vivo* de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el polipéptido NRG-2 recombinante es codificado por una molécula de ácido nucleico:
- 25 a) que comprende una secuencia que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2; o
b) que comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 1.

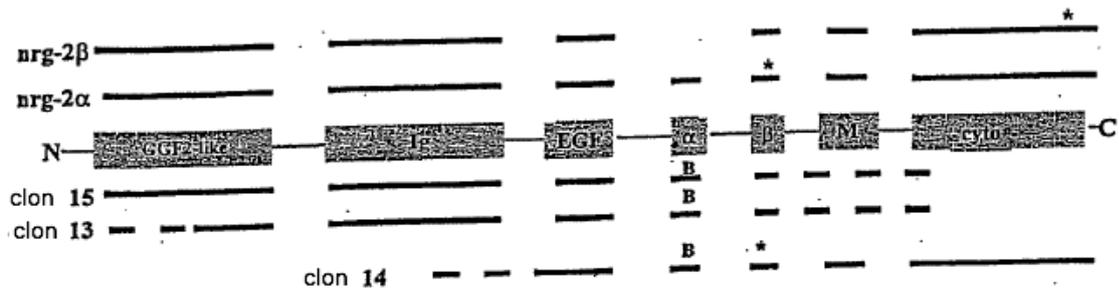
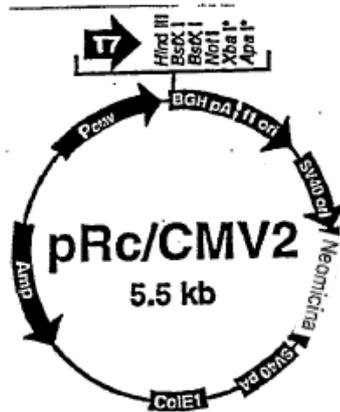


FIG. 1



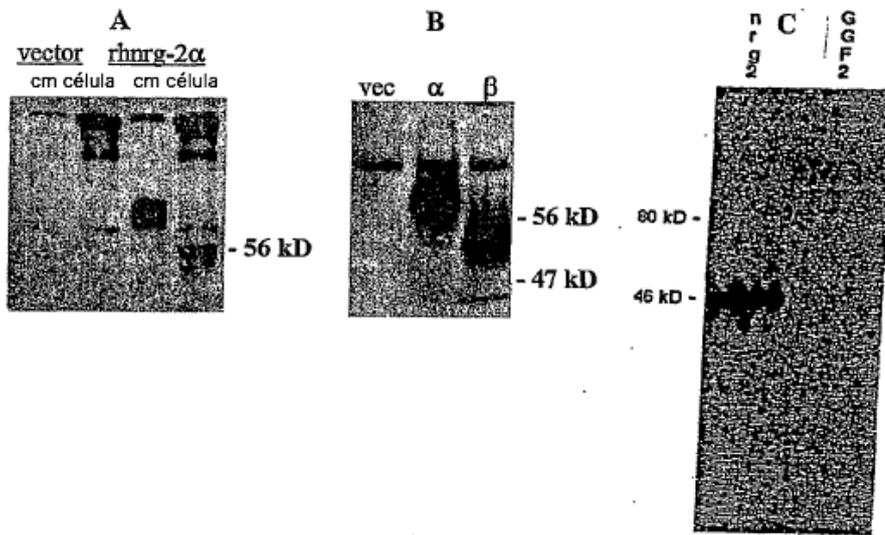


FIG. 3

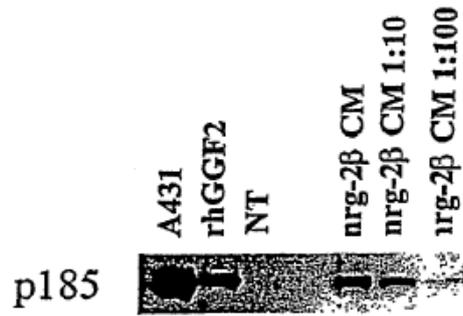


FIG. 4A

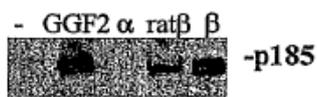


FIG. 4B

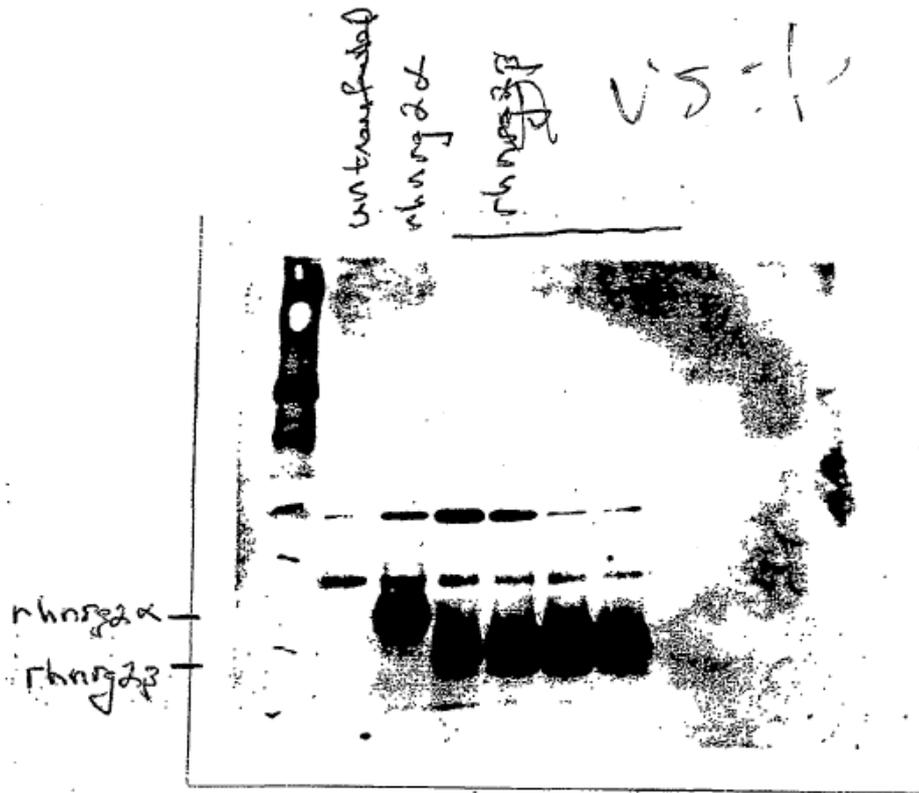


FIG. 5

ATGAGGCGCGACCCGGCCCCGGCTTCTCCATGCTGCTCTTCGGTGTGTCGCTCGCC
TGCTACTCGCCCAGCCTCAAGTCAGTGCAGGACCAGGCGTACAAGGCACCCGTGGT
GGTGGAGGGCAAGGTACAGGGGCTGGTCCCAGCCGGCGGCTCCAGCTCCAACAGCA
CCCGAGAGCCGCCCGCCTCGGGTCGGGTGGCGTTGGTAAAGGTGCTGGACAAGTGG
CCGCTCCGGAGCGGGGGGCTGCAGCGCGAGCAGGTGATCAGCGTGGGCTCCTGTGT
GCCGCTCGAAAGGAACCAGCGCTACATCTTTTTCTGGAGCCCACGGAACAGCCCTT
AGTCTTTAAGACGGCCTTTGCCCCCTCGATACCAACGGCAAAAATCTCAAGAAAGA
GGTGGGCAAGATCCTGTGCACTGACTGCGCCACCCGGCCCAAGTTGAAGAAGATGA
AGAGCCAGACGGGACAGGTGGGTGAGAAGCAATCGCTGAAGTGTGAGGCAGCAGC
CGGTAATCCCCAGCCTTCCTACCGTTGGTTCAAGGATGGCAAGGAGCTCAACCGCAG
CCGAGACATTCGCATCAAATATGGCAACGGCAGAAAGAACTCACGACTACAGTTCA
ACAAGGTGAAGGTGGAGGACGCTGGGGAGTATGTCTGCGAGGCCGAGAACATCCTG
GGGAAGGACACCGTCCGGGGCCGGCTTTACGTCAACAGCGTGAGCACCACCCTGTC
ATCCTGGTCCGGGCACGCCCGGAAGTGCAACGAGACAGCCAAGTCCTATTGCGTCA
ATGGAGGCGTCTGCTACTACATCGAGGGCATCAACCAGCTCTCCTGCAAATGTCCAA
ATGGATTCTTCGGACAGAGATGTTTGGAGAAACTGCCTTTGCGATTGTACATGCCAG
ATCCTAAGCAAAGTGTCTGTGGGATACACCGGGGACAGGTGTCAGCAGTTCGCAA
TGGTCAACTTCTCCAAGCACCTTGGATTTGAATTA (SEQ ID NO: 1)

FIG. 6

MRRDPAPGFSMLLFGVSLACYSPSLKSVQDQAYKAPVVVEGKVQGLVPAGGSSSNSTR
EPPASGRVALVKVLDKWPLRSGGLQREQVISVGSVPLERNQRYIFFLEPTEQPLVFKTA
FAPLDTNGKNLKKKEVGKILCTDCATRPKLKKMKSQTGQVGEKQSLKCEAAAGNPQPSY
RWFKDGKELNRSRDIRIKYGNGRKNRSLQFNKVKVEDAGEYVCEAENILGKDTVGRGL
YVNSVSTLSSWSGHARKCNETAKSYCVNGGVCYYIEGINQLSCKCPNGFFGQRCLEKL
PLRLYMPDPKQSVLWDTPGTGVSSSQWSTSPSTLDLN (SEQ ID NO: 2)

FIG. 7

ATGAGGCGCGACCCGGCCCCCGGCTTCTCCATGCTGCTCTTCGGTGTGTGCTCGCTCGCC
TGCTACTCGCCCAGCCTCAAGTCAGTGCAGGACCAGGCGTACAAGGCACCCGTGGT
GGTGGAGGGCAAGGTACAGGGGCTGGTCCCAGCCGGCGGCTCCAGCTCCAACAGCA
CCCGAGAGCCGCCCGCCTCGGGTCGGGTGGCGTTGGTAAAGGTGCTGGACAAGTGG
CCGCTCCGGAGCGGGGGGCTGCAGCGCGAGCAGGTGATCAGCGTGGGCTCCTGTGT
GCCGCTCGAAAGGAACCAGCGCTACATCTTTTTCTGGAGCCCACGGAACAGCCCTT
AGTCTTTAAGACGGCCTTTGCCCCCTCGATACCAACGGCAAAAATCTCAAGAAAG
AGGTGGGCAAGATCCTGTGCACTGACTGCGCCACCCGGCCCAAGTTGAAGAAGATG
AAGAGCCAGACGGGACAGGTGGGTGAGAAGCAATCGCTGAAGTGTGAGGCAGCAG
CCGGTAATCCCAGCCTTCCTACCGTTGGTTCAAGGATGGCAAGGAGCTCAACCGCA
GCCGAGACATTTCGCATCAAATATGGCAACGGCAGAAAGAACTCACGACTACAGTTC
AACAAGGTGAAGGTGGAGGACGCTGGGGAGTATGTCTGCGAGGCCGAGAACATCCT
GGGGAAGGACACCGTCCGGGGCCGGCTTACGTCAACAGCGTGAGCACCACCCTGT
CATCCTGGTCGGGGCACGCCCGGAAGTGCAACGAGACAGCCAAGTCTATTGCGTC
AATGGAGGCGTCTGCTACTACATCGAGGGCATCAACCAGTCTCCTGCAAGTGTCTC
GTGGGATACACCGGGACAGGTGTCAGCAGTTCGCAATGGTCAACTTCTCCTAA
(SEQ ID NO: 3)

FIG. 8

MRRDPAPGFSMMLFGVSLACYSPSLKSVQDQAYKAPVVVEGKVQGLVPAGGSSSNSTR
EPPASGRVALVKVLDKWPLRSGGLQREQVISVGSCVPLERNQRYIFFLEPTQPLVFKTA
FAPLDTNGKNLKEVGKILCTDCATRPKLKKMKSQTGQVGEKQSLKCEAAAGNPQPSY
RWFKDGKELNRSRDIRIKYGNRKN SRLQFNKVKVEDAGEYVCEAENILGKDTVRGRL
YVNSVSTLSSWSGHARKCNETAKSYCVNGGVCYYIEGINQLSCKCPVGYTGDRCCQF
AMVNFS (SEQ ID NO: 4)

FIG. 9

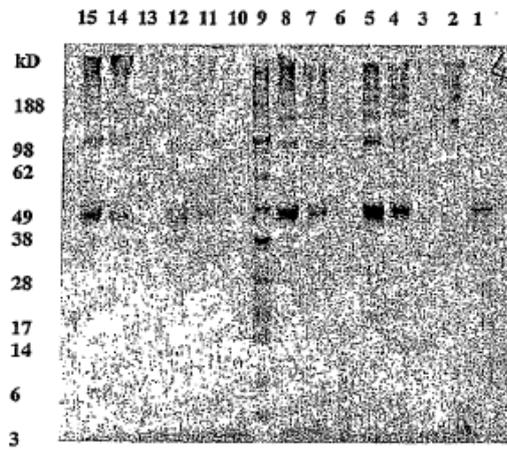


FIG. 10

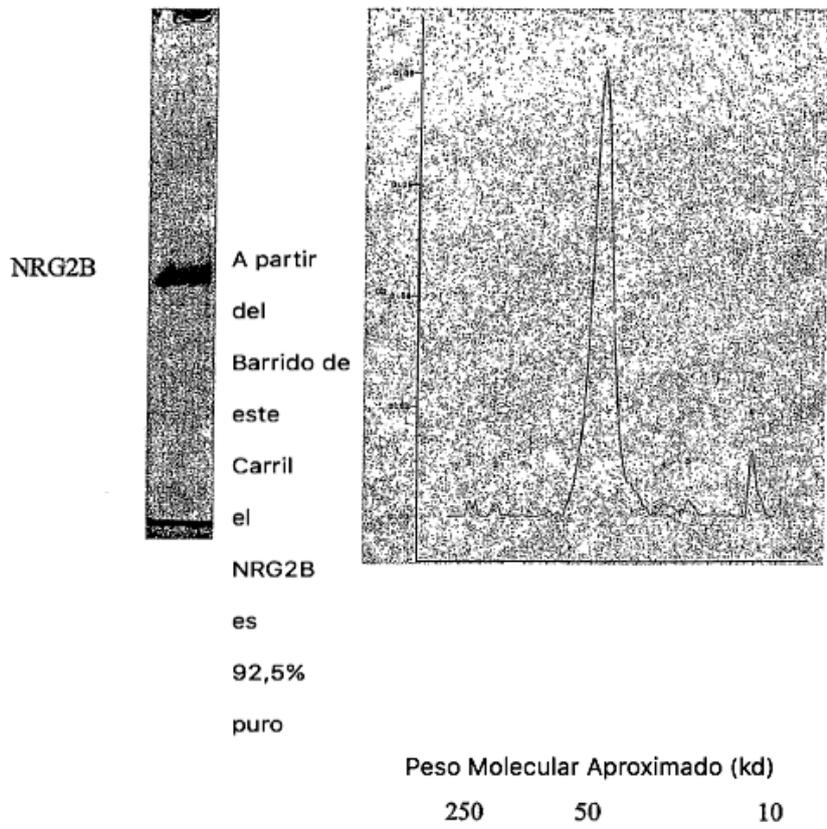


FIG. 11

Medio
PM Acondicionado CM-Sefarosa C4-HPLC

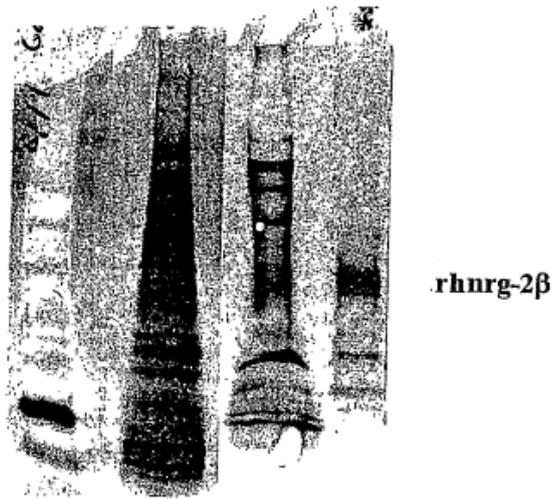


FIG. 12

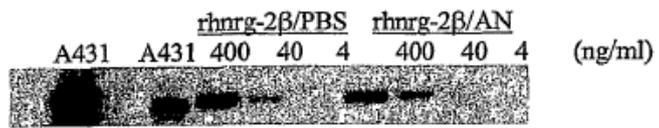


FIG. 13

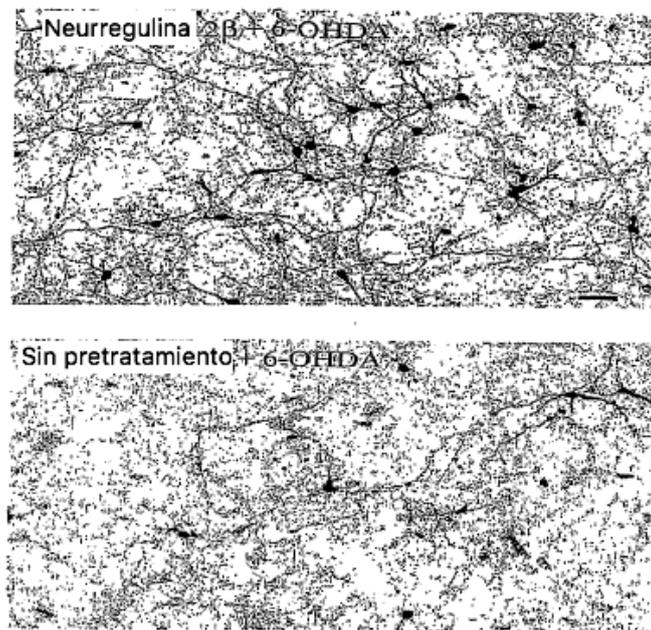


FIG. 14

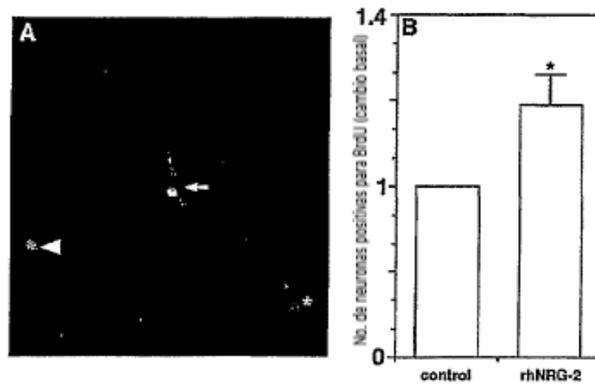


FIG. 15

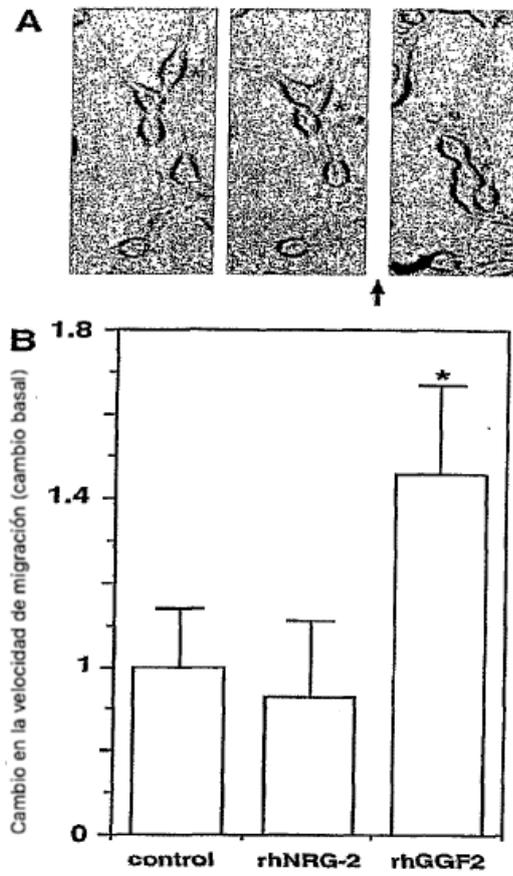


FIG. 16

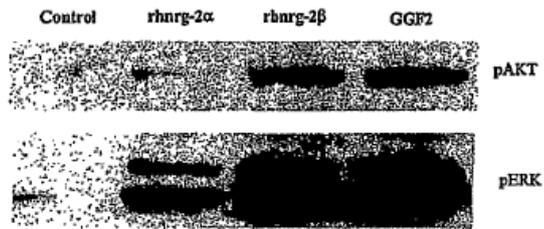


FIG. 17

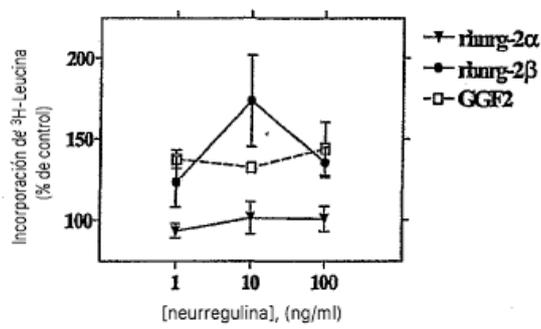


FIG. 18