

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 394**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/18** (2006.01)

**A61P 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.07.2009 PCT/US2009/004130**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.03.2010 WO10030317**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2009 E 09813336 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2017 EP 2320933**

54 Título: **Dosificación terapéutica de una neuregulina o de una subsecuencia de la misma para el tratamiento o la profilaxis de la insuficiencia cardiaca**

30 Prioridad:

**17.07.2008 US 135171 P**

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

**19.04.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**CAGGIANO, ANTHONY;  
GANGULY, ANINDITA;  
IACI, JENNIFER y  
PARRY, TOM**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 664 394 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

Dosificación terapéutica de una neuregulina o de una subsecuencia de la misma para el tratamiento o la profilaxis de la insuficiencia cardíaca

**Campo de la invención**

- 5 El campo de la invención está relacionado con el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. Más específicamente, la invención está dirigida a una posología mejorada mediante la cual se mantienen y/o mejoran los beneficios terapéuticos de la administración de una neuregulina, tal como el factor de crecimiento glial 2 (GGF2) o un fragmento del mismo, mientras se minimiza cualquier efecto secundario potencial.

**Antecedentes de la invención**

- 10 Un reto fundamental asociado con la administración de medicamentos a pacientes necesitados de los mismos es la relación entre tolerabilidad y eficacia. El índice terapéutico es el intervalo entre el cual se puede administrar una dosis eficaz de una sustancia a un paciente y una dosis a la cual se perciben los efectos secundarios no deseados al paciente. Generalmente, cuanto mayor es la diferencia entre la dosis eficaz y la dosis a la cual se inicial los efectos secundarios, más benigna es la sustancia y más probable es que sea tolerada por el paciente.

- 15 La insuficiencia cardíaca, en particular la insuficiencia cardíaca congestiva (CHF), una de las principales causas de muerte en las naciones industrializadas. Los factores que subyacen a la insuficiencia cardíaca congestiva incluyen hipertensión arterial, cardiopatía isquémica, exposición a compuestos cardiotoxicos tales como los antibióticos de antraciclina, exposición a radiaciones, traumatismo físico y defectos genéticos asociados con un mayor riesgo de insuficiencia cardíaca. Así, la CHF es, a menudo, consecuencia de una mayor carga de trabajo para el corazón  
 20 debida a la hipertensión, a la lesión del miocardio consecuencia de la isquemia crónica, al infarto de miocardio, a enfermedades víricas, a la toxicidad química, a la radiación y a otras enfermedades tales como la esclerodermia. Estas afecciones dan como resultado una disminución progresiva en la capacidad de bombeo del corazón. Inicialmente, la mayor carga de trabajo resultante de la hipertensión arterial o de la pérdida de tejido contráctil induce una hipertrofia compensatoria de los cardiomiocitos y un engrosamiento de la pared ventricular izquierda, mejorando  
 25 con ello la contractilidad y manteniendo la función cardíaca. Sin embargo, con el tiempo, la cámara ventricular izquierda se dilata, la función de bombeo sistólico se deteriora, los cardiomiocitos sufren la muerte apoptótica celular, y la función miocárdica se deteriora progresivamente.

- Las neuregulinas (NRG) y los receptores de NRG comprenden un sistema tirosina quinasa de receptores del factor  
 30 de crecimiento para la señalización entre células que está implicado en la organogénesis y en el desarrollo celular en los tejidos nervioso, muscular, epitelial y otros (Lemke, Mol. Cell. Neurosci. 7:247-262, 1996 y Burden et al., Neuron 18:847-855, 1997). La familia de las NRG consiste en cuatro genes que codifican numerosos ligandos que contienen dominios de tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF), inmunoglobulina (Ig), y otros reconocibles. Numerosas formas segregadas y unidas a la membrana funcionan como ligandos en este sistema de señalización. Los receptores para los ligandos de NRG son todos miembros de la familia de receptores EGF (EGFR), e incluyen  
 35 EGFR (o ErbB1), ErbB2, ErbB3 y ErbB4, también denominados HER1 a HER4, respectivamente, en los seres humanos (Meyer et al., Development 124:3575-3586, 1997; Orr-Urtreger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 1867-71, 1993; Marchionni et al., Nature 362:312-8, 1993; Chen et al., J. Comp. Neurol. 349:389-400, 1994; Corfas et al., Neuron 14:103-115, 1995; Meyer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:1064-1068, 1994; y Pinkas-Kramarski et al., Oncogene 15:2803-2815, 1997).

- 40 Los cuatro genes NRG, NRG-1, NRG-2, NRG-3 y NRG-4, se correlacionan con *loci* cromosómicos diferenciados (Pinkas-Kramarski et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9387-91, 1994; Carraway et al., Nature 387:512-516, 1997; Chang et al., Nature 387:509-511, 1997; y Zhang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:9562-9567, 1997), y codifican colectivamente un conjunto diverso de proteínas NRG. Los productos génicos del NRG-1, por ejemplo, comprenden un grupo de aproximadamente 15 isoformas diferenciadas estructuralmente relacionadas (Lemke, Mol. Cell. Neurosci. 7:247-262, 1996 y Peles y Yarden, BioEssays 15:815-824, 1993). Las primeras isoformas identificadas de NRG-1 incluyeron el factor de diferenciación NEU (NDF; Peles et al., Cell 69, 205-216, 1992 y Wen et al., Cell 69, 559-572, 1992), la heregulina (HRG; Holmes et al., Science 256:1205-1210, 1992), la actividad inductora del receptor de acetilcolina (ARIA; Falls et al., Cell 72:801-815, 1993), y los factores de crecimiento glial GGF1, GGF2 y GGF3 (Marchionni et al. Nature 362:312-8, 1993).

- 50 El gen NRG-2 fue identificado por clonación por homología (Chang et al., Nature 387:509-512, 1997; Carraway et al., Nature 387:512-516, 1997; y Higashiyama et al., J. Biochem. 122:675-680, 1997) y a través de planteamientos genómicos (Busfield et al., Mol. Cell. Biol. 17:4007-4014, 1997). También se conocen ADNc de NRG-2 como el activador de derivación neural y del timo de las ErbB quinazas (NTAK; nº de acceso de Genbank AB005060), el divergente de neuregulina (Don-1) y el factor de crecimiento derivado de cerebelo (CDGF; solicitud PCT WO 97/09425). La evidencia experimental demuestra que las células que expresan ErbB4 o la combinación ErbB2/ErbB4  
 55 es probable que presente una respuesta particularmente robusta a NRG-2 (Pinkas-Kramarski et al., Mol. Cell. Biol. 18:6090-6101, 1998). También se sabe que el producto génico NRG-3 (Zhang et al., supra) se une a los receptores ErbB4 y los activa (Hijazi et al., Int. J. Oncol. 13:1061-1067, 1998).

En el núcleo de todas las formas de las NRG hay presente un dominio de tipo EGF, que se requiere para unirse a los receptores ErbB y activarlos. Las secuencias de aminoácidos deducidas de los dominios de tipo EGF codificados en los tres genes son idénticas en aproximadamente un 30-40% (comparaciones por pares). Además, parece haber al menos dos subformas de dominios de tipo EGF en la NRG-1 y la NRG-2, que pueden conferir bioactividades y potencias específicas diferentes a los tejidos.

Las respuestas celulares a las NRG son arbitradas por medio de los receptores tirosina quinasa de NRG EGFR, ErbB2, ErbB3 y ErbB4 de la familia de receptores de factor de crecimiento epidérmico. La unión de gran afinidad de todas las NRG es arbitrada principalmente por ErbB3 o bien por ErbB4. La unión de ligandos NRG conduce a la dimerización de otras subunidades ErbB y a la transactivación por fosforilación en residuos específicos de tirosina. En ciertos contextos experimentales, casi todas las combinaciones de receptores ErbB parecen capaces de formar dímeros en respuesta a la unión de isoformas de NRG-1. Sin embargo, parece que ErbB2 es un socio preferente de dimerización que puede desempeñar un importante papel en la estabilización del complejo ligando-receptor. El ErbB2 no se une al ligando por sí solo, sino que debe ser emparejado de manera heteróloga con uno de los otros subtipos de receptor. El ErbB3 sí posee actividad tirosina quinasa, pero es una diana para la fosforilación para los otros receptores. Es sabido que la expresión de NRG-1, ErbB2 y ErbB4 es necesaria para la trabeculación del miocardio ventricular durante el desarrollo de los ratones.

Las neuregulinas estimulan el crecimiento hipertrofico compensatorio e inhiben la apoptosis de cardiomiocitos sometidos a estrés fisiológico. Según estas observaciones, la administración de una neuregulina es útil para prevenir, minimizar o revertir la cardiopatía congestiva resultante de factores subyacentes tales como la hipertensión, cardiopatía isquémica y cardiotoxicidad. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense número (USPN) 6.635.249, que es incorporada a la presente memoria en su integridad.

En vista de la gran prevalencia de la insuficiencia cardiaca en la población general, sigue existiendo la necesidad no satisfecha de impedir o minimizar el avance de esta enfermedad, tal como inhibiendo la pérdida de la función cardiaca o mejorando la función cardiaca.

### **Compendio de la invención**

La presente invención está definida por las reivindicaciones.

La presente invención comprende el tratamiento o la prevención de la insuficiencia cardiaca en un mamífero. El tratamiento está basado en la sorprendente observación de que pueden lograrse beneficios terapéuticos de un péptido que comprende un dominio de tipo factor de crecimiento epidérmico (de tipo EGF) mediante posologías para la administración de neuregulina que no mantienen un estado estacionario, tal como administrado una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido a un mamífero a intervalos de administración de o durante 48, 72, 96 horas o más. En consecuencia, el presente método demanda una administración intermitente o discontinua (cada entre 48 y 96 horas, o intervalos aun mayores) de un péptido que contiene un dominio de tipo EGF al mamífero, estando codificado el dominio de tipo EGF por un gen de neuregulina, y siendo la administración del péptido en una cantidad efectiva para tratar o prevenir la insuficiencia cardiaca en el mamífero. Las posologías para la administración de neuregulina que no mantienen concentraciones de estado estacionario son igualmente eficaces que posologías más frecuentes; sin embargo, sin la inconveniencia, los costes o los efectos secundarios que pueden resultar de una administración más frecuencia. Según se usa en la presente memoria, la expresión administración intermitente o discontinua incluye una posología para la dosificación a intervalos de al menos 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días 1 semana, 2 semanas, 4 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, o cualquier combinación o incremento de los mismos, siempre y cuando el intervalo o la posología sea de al menos 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días 1 semana, 2 semanas, 4 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses o 4 meses. Según se usa en la presente memoria, la expresión administración intermitente o discontinua incluye una posología para la dosificación a intervalos no menores de 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días 1 semana, 2 semanas, 4 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, o cualquier combinación o incremento de los mismos, siempre y cuando el intervalo o la posología sea no menor de 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días 1 semana, 2 semanas, 4 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses o 4 meses.

Según la presente invención, la administración intermitente o discontinua de un péptido que contiene un dominio de tipo EGF al mamífero, estando codificado el dominio de tipo EGF por un gen de neuregulina, está dirigida a lograr una posología en la que no se mantienen concentraciones estrechas de estado estacionario del péptido administrado, reduciéndose con ello la probabilidad de que el mamífero experimente efectos secundarios adversos que pueden ser consecuencia de mantener niveles suprafisiológicos del péptido administrado en un lapso de duración prolongada.

Por ejemplo, efectos secundarios asociados con niveles suprafisiológicos de NRG administrada de forma exógena incluyen hiperplasia de la vaina nerviosa, hiperplasia mamaria, nefropatía renal, hipospermia, elevación de las enzimas hepáticas, cambios en las válvulas cardiacas y cambios dérmicos en el sitio de la inyección.

En un caso preferente, la presente divulgación, que comprende la invención, está dirigida a una posología intermitente que provoca o permite fluctuaciones en los niveles séricos del péptido que comprende un dominio de tipo EGF codificado por un gen de neuregulina y, así, reduce el potencial de efectos secundarios adversos asociados con una administración más frecuente del péptido. La posología intermitente de la presente invención confiere así una ventaja terapéutica al mamífero, pero no mantiene niveles terapéuticos de estado estacionario del péptido que comprende un dominio de tipo EGF codificado por un gen de neuregulina. Como apreciarán las personas con un dominio normal de la técnica, hay varios casos para obtener la dosificación intermitente; los beneficios de estas realizaciones se pueden expresar de varias maneras; por ejemplo, dicha administración no mantiene niveles terapéuticos de estado estacionario de dicho péptido, la administración reduce el potencial de efectos secundarios adversos asociados con la administración del péptido NRG con mayor frecuencia, y similares.

En casos particulares de la divulgación que comprende la invención, la neuregulina puede ser el gen, producto del gen o la respectiva subsecuencia o un fragmento de la misma, que comprende, consiste esencialmente o consiste en: NRG-1, NRG-2, NRG-3 o NRG-4. En un caso preferente, una subsecuencia o fragmento de NRG de la divulgación comprende un dominio de tipo factor de crecimiento epidérmico (de tipo EGF) o un homólogo del mismo. Según apreciarán personas con un dominio normal de la técnica, se determina un homólogo peptídico para un péptido del dominio de tipo EGF encontrando la homología estructural o al comportarse el homólogo peptídico como lo hace un péptido de tipo EGF en ensayos funcionales tales como uniéndose a los receptores ErbB y activándolos. Preferentemente, el fragmento tiene una longitud de al menos 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85 aminoácidos. Un péptido de neuregulina de la invención puede, a su vez, estar codificado por uno cualquiera de estos genes de neuregulina (o por una subsecuencia de los mismos). En una realización más particular, el péptido usado en el método es el GGF2 humano recombinante. Véanse las Figuras 8A-8D para las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de GGF2 humano de longitud máxima.

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

En otros casos de la invención, la insuficiencia cardíaca puede ser consecuencia de hipertensión, cardiopatía isquémica, exposición a un compuesto cardiotoxico (por ejemplo, cocaína, alcohol, un anticuerpo anti-ErbB2 o anticuerpo anti-HER, tal como HERCEPTIN®, o un antibiótico de antraciclina, como doxorubicina o daunomicina), miocarditis, enfermedad tiroidea, infección viral, gingivitis, drogadicción, alcoholismo, pericarditis, aterosclerosis, enfermedad vascular, miocardiopatía hipertrofica, infarto de miocardio agudo o antecedentes de infarto de miocardio, disfunción sistólica del ventrículo izquierdo, cirugía de derivación coronaria, inanición, exposición a radiaciones, un trastorno alimentario o un defecto genético.

En otro caso de la divulgación, se administra un anticuerpo anti-ErbB2 o anti-HER2, tal como HERCEPTIN®, al mamífero antes, durante o después de la administración de antraciclina.

En otros casos de la invención, el péptido se administra antes de la exposición a un compuesto cardiotoxico, durante la exposición a dicho compuesto cardiotoxico, o después de la exposición a dicho compuesto cardiotoxico; el péptido se administra antes o después del diagnóstico de insuficiencia cardíaca congestiva en dicho mamífero. Un método de la invención puede tener lugar después de que el sujeto mamífero haya experimentado hipertrofia cardíaca compensatoria; un método de la invención comprende que el resultado del método es mantener la hipertrofia ventricular izquierda o impedir el avance del adelgazamiento del miocardio, o inhibir la apoptosis de los cardiomiocitos. En un método de la invención, el péptido puede comprender, consistir esencialmente o consistir en un dominio de tipo EGF codificado por un gen de neuregulina. Un péptido de la invención se administra antes, durante o después de la exposición a un compuesto cardiotoxico. En otra realización, el péptido que contiene el dominio de tipo EGF se administra durante dos de estos periodos, o los tres. Según la presente invención, el péptido que contiene un dominio de tipo EGF codificado por un gen de neuregulina se administra a intervalos de 48 a 96 horas. En una realización de la presente invención, el péptido que contiene un dominio de tipo EGF codificado por un gen de neuregulina es GGF2. En otros casos más de la invención, el péptido se administra antes o después del diagnóstico de insuficiencia cardíaca congestiva en el mamífero. En otro caso más de la invención, el péptido se administra a un mamífero que ha experimentado hipertrofia cardíaca compensatoria. En otros casos particulares de la invención, la administración del péptido mantiene la hipertrofia ventricular izquierda, previene el avance del adelgazamiento del miocardio y/o inhibe la apoptosis de los cardiomiocitos.

Ejemplos de la invención dan a conocer lo siguiente: Tratamiento de la insuficiencia cardíaca en un mamífero, comprendiendo dicho tratamiento la administración de un péptido exógeno que comprende un dominio de tipo factor de crecimiento epidérmico (de tipo EGF) a dicho mamífero, reduciendo dicha administración a dichos intervalos los efectos secundarios adversos asociados con la administración de dicho péptido exógeno en dicho mamífero. Tratamiento de la insuficiencia cardíaca en un mamífero, comprendiendo dicho tratamiento la administración de un péptido exógeno que comprende un dominio de tipo factor de crecimiento epidérmico (de tipo EFG) a dicho mamífero, estando codificado dicho dominio de tipo EGF por el gen neuregulina (NRG)-1, y siendo suministrado dicho péptido exógeno en una cantidad terapéuticamente eficaz para tratar la insuficiencia cardíaca en dicho mamífero a intervalos de al menos 48 horas, no manteniendo dicha administración a dichos intervalos los niveles de

estado estacionario de dicho péptido exógeno en dicho mamífero. Tratamiento de la insuficiencia cardiaca en un mamífero, comprendiendo dicho tratamiento la administración de un péptido exógeno que comprende un dominio de tipo factor de crecimiento epidérmico (de tipo EFG) o un homólogo del mismo a dicho mamífero, y administrándose dicho péptido exógeno en una cantidad terapéuticamente eficaz para tratar la insuficiencia cardiaca en dicho mamífero a intervalos de al menos o no menores de 48 horas, permitiendo dicha administración a dichos intervalos permite la fluctuación intradosis de las concentraciones séricas de dicho péptido exógeno a niveles de referencia o previos a la administración en dicho mamífero.

Según se usa en la presente memoria, la expresión efecto secundario adverso o nocivo se refiere a una consecuencia no deseada y poco deseable de un tratamiento médico. Con respecto a la presente invención, un efecto secundario adverso o nocivo resultante de la administración de un péptido exógeno puede incluir uno o más de los siguientes: hiperplasia de la vaina nerviosa, hiperplasia mamaria, nefropatía renal y cambios dérmicos en el sitio de la inyección.

Según se usa en la presente memoria, la expresión "fluctuación intradosis de las concentraciones séricas de dicho péptido exógeno a niveles previos a la administración en dicho mamífero" se refiere a la diferencia entre los niveles de concentración sérica antes de la administración de una dosis de un péptido exógeno.

Según se usa en la presente memoria, la expresión "niveles de estado estacionario" se refiere a uno o varios niveles de un agente exógeno (por ejemplo, un péptido) que es suficiente para lograr el equilibrio (dentro de un intervalo de fluctuación entre dosis sucesivas) entre administración y eliminación. "Mantener niveles terapéuticos en estado estacionario" se refiere a mantener la concentración de un agente exógeno a un nivel suficiente para conferir un beneficio terapéutico a un sujeto o paciente.

#### **Breve descripción de los dibujos**

La **Figura 1** muestra un histograma que representa la función cardiaca ejemplificada por los cambios en la fracción de eyección y el acortamiento fraccionario. Según se indica, las ratas fueron tratadas con GGF2 a 0,625 mg/kg o una cantidad equimolar de un fragmento de tipo EGF (fragmento; EGF-Id) por vía intravenosa (iv) todos los días (cada día).

La **Figura 2** muestra un gráfico de líneas que representa la función cardiaca revelada por cambios en la fracción de eyección y el acortamiento fraccionario. Según se indica, las ratas fueron tratadas con GGF2 a 0,625 mg/kg o 3,25 mg/kg iv cada día.

La **Figura 3** muestra un gráfico de líneas que representa la función cardiaca revelada por una mejora significativa en el volumen sistólico final durante el periodo de tratamiento. Según se indica, las ratas fueron tratadas con GGF2 a 0,625 mg/kg o 3,25 mg/kg iv cada día.

La **Figura 4** muestra un gráfico de líneas que muestra la función cardiaca revelada por cambios en la fracción de eyección y el acortamiento fraccionario. Según se indica, las ratas fueron tratadas con GGF2 a 3,25 mg/kg por vía intravenosa (iv) cada 24, 48 o 96 horas.

La **Figura 5** muestra un gráfico de líneas que representa la función cardiaca revelada por cambios en la fracción de eyección ecocardiográfica. Según se indica, las ratas fueron tratadas con vehículo o GGF2 a 3,25 mg/kg por vía intravenosa (iv), con o sin BSA.

La **Figura 6** muestra un gráfico de líneas que representa la vida media del GGF2 humano recombinante (rhGGF2) tras una administración iv.

La **Figura 7** muestra un gráfico de líneas que representa la vida media del GGF2 humano recombinante (rhGGF2) tras una administración subcutánea.

Las **Figuras 8A-D** muestran las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos del GGF2 de longitud máxima. La secuencia de ácidos nucleicos se designa SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos se designa SEQ ID NO: 2.

La **Figura 9** muestra las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos del dominio 1 de tipo factor de crecimiento epidérmico (EGFL). La secuencia de ácidos nucleicos del dominio 1 de EGFL se designa en la presente memoria SEQ ID NO: 3 y la secuencia de aminoácidos del dominio 1 de EGFL se designa en la presente memoria SEQ ID NO: 4.

La **Figura 10** muestra las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos del dominio 2 de tipo factor de crecimiento epidérmico (EGFL). La secuencia de ácidos nucleicos del dominio 2 de EGFL se designa en la presente memoria SEQ ID NO: 5 y la secuencia de aminoácidos del dominio 2 de EGFL se designa en la presente memoria SEQ ID NO: 6.

La **Figura 11** muestra las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos del dominio 3 de tipo factor de crecimiento epidérmico (EGFL). La secuencia de ácidos nucleicos del dominio 3 de EGFL se designa en la presente

memoria SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos del dominio 3 de EGFL se designa en la presente memoria SEQ ID NO: 8.

5 La **Figura 12** muestra las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos del dominio 4 de tipo factor de crecimiento epidérmico (EGFL). La secuencia de ácidos nucleicos del dominio 4 de EGFL se designa en la presente memoria SEQ ID NO: 9 y la secuencia de aminoácidos del dominio 4 de EGFL se designa en la presente memoria SEQ ID NO: 10.

10 La **Figura 13** muestra las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos del dominio 5 de tipo factor de crecimiento epidérmico (EGFL). La secuencia de ácidos nucleicos del dominio 5 de EGFL se designa en la presente memoria SEQ ID NO: 11 y la secuencia de aminoácidos del dominio 5 de EGFL se designa en la presente memoria SEQ ID NO: 12.

La **Figura 14** muestra las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos del dominio 6 de tipo factor de crecimiento epidérmico (EGFL). La secuencia de ácidos nucleicos del dominio 6 de EGFL se designa en la presente memoria SEQ ID NO: 13 y la secuencia de aminoácidos del dominio 6 de EGFL se designa en la presente memoria SEQ ID NO: 14.

15 La **Figura 15** muestra la secuencia de aminoácidos de un polipéptido que comprende un dominio de tipo factor de crecimiento epidérmico (EGFL), que se designa en la presente memoria SEQ ID NO: 21.

La **Figura 16** muestra los vectores pSV-AHSG y pCMGGF2.

La **Figura 17** muestra la secuencia de codificación del GGF2, puesta después de la secuencia intermedia de BMLF-1 del VEB (MIS).

20 **Descripción detallada de la invención**

Los presentes inventores hicieron el sorprendente descubrimiento de que la administración discontinua o intermitente de una neuregulina a intervalos de tiempo separados de forma aproximada suministra una cantidad terapéuticamente eficaz de la neuregulina a un paciente necesitado de la misma y tal posología de tratamiento es útil para prevenir, preservar, mejorar, minimizar, tratar o revertir una enfermedad cardiaca, tal como la insuficiencia cardiaca congestiva.

25 A pesar de la creencia popular y de la práctica de desarrollo relativas al diseño de posologías para mantener concentraciones de estado estacionario de intervalo más estrecho, los presentes inventores demuestran en la presente memoria que las posologías para la administración de neuregulina que no mantienen concentraciones estrechas de estado estacionario son igualmente efectivas como posologías más frecuentes. De hecho, los presentes inventores han demostrado que el tratamiento con neuregulina de la insuficiencia cardiaca con intervalos de dosificación de al menos 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días 1 semana, 2 semanas, 4 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, o cualquier combinación o incremento de los mismos, siempre que el intervalo o la posología sea de al menos 48 horas, es tan efectivo como la dosificación diaria.

30 Para evaluar la farmacocinética de la NRG exógena, los presentes inventores han demostrado que la vida media de la neuregulina, cuando es administrada por vía intravenosa, es de 4 a 8 horas, y cuando se administra por vía subcutánea es de 11 a 15 horas. Véanse, por ejemplo, las Tablas 1 y 2 y las Figuras 6 y 7. Por lo tanto, la dosificación en posologías tan infrecuentes como cada cuarto día no mantendría ningún nivel detectable durante al menos tres días entre dosis. En función de estos hallazgos, antes de la presente invención, no se habría predicho que tales relaciones pico/valle se correlacionarían con un beneficio terapéutico sistemático. Es digno de mención que los compuestos con una vida media de este orden se administran generalmente según una posología frecuente (por ejemplo, dosis diarias o múltiples veces al día). De hecho, en función de los datos farmacocinéticos disponibles para el GGF2, el desarrollo tradicional predeciría que el tratamiento óptimo implicaría una dosificación subcutánea diaria.

35 En consonancia con la creencia popular y la práctica de desarrollo, otros tratamientos médicos para la CHF generalmente se administran al menos una vez al día. Se cree que la periodicidad de tal posología es necesaria porque la CHF es una afección crónica, comúnmente causada por una contracción y/o una relajación deficientes del corazón, más que por una afección aguda. En personas con un corazón débil que lleva a problemas de relajación y de CHF, los tratamientos médicos incluyen fármacos que bloquean la formación o la acción de neurohormonas específicas (por ejemplo, inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina (inhibidores ECA), antagonistas de los receptores de angiotensina (ARA), antagonistas de aldosterona y betabloqueantes de receptores adrenérgicos). Estos y otros medicamentos ahora son cuidados estándar en la CHF crónica, ya que se ha demostrado que mejoran los síntomas, la esperanza de vida y/o la reducción de las hospitalizaciones. En el contexto de una exacerbación aguda o de síntomas crónicos, los pacientes son tratados a menudo con inótrpos (por ejemplo, dobutamina, digoxina) para mejorar la contractilidad cardiaca, junto con vasodilatadores (por ejemplo, nitratos, nesiritida) y/o diuréticos (por ejemplo, furosemida) para reducir la congestión. Los pacientes con

hipertensión e insuficiencia cardiaca congestiva son tratados con uno o más antihipertensivos, como betabloqueantes, inhibidores ECA y los ARA, nitratos (dinitrato de isosorbida), hidralazina y bloqueadores de los canales de calcio.

5 Así, a pesar de la práctica típica con respecto al tratamiento de la CHF, los presentes inventores han demostrado que una posología novedosa da como resultado un tratamiento eficaz de la CHF, mientras se evitan efectos secundarios poco deseables. Aunque no se desea entrar en consideraciones teóricas, es probable que tal tratamiento con neuregulina refuerce la capacidad de bombeo del corazón al estimular la hipertrofia de los cardiomiocitos, y que inhiba parcial o completamente el deterioro ulterior del corazón suprimiendo la apoptosis de los cardiomiocitos.

10 A modo de antecedentes adicionales, el principio básico de dosificación es determinar una concentración circulante efectiva y diseñar una posología para mantener esos niveles. Los estudios farmacocinéticos (FC) y farmacodinámicos (FD) se combinan para predecir una posología que mantenga un nivel de estado estacionario de un fármaco particular. El plan típico es minimizar la diferencia entre  $C_{max}$  y  $C_{min}$  y reducir con ello los efectos secundarios.

15 Los fármacos son descritos por su "índice terapéutico", que es una proporción entre los niveles circulantes o dosis tóxicos divididos por las concentraciones circulantes o dosis efectivas. Cuando el índice terapéutico es grande, existe un amplio intervalo de seguridad en el que se puede dar una dosis efectiva sin aproximarse a niveles tóxicos. Cuando los efectos adversos resultan en concentraciones demasiado cercanas a las concentraciones efectivas, se dice que el índice terapéutico es estrecho y es difícil administrar el medicamento con seguridad.

20 Mientras se desarrollan posologías, se combinan los datos de FC/FD con el conocimiento del índice terapéutico para diseñar una dosis y una frecuencia de administración tales que el compuesto se mantenga a una concentración en un paciente (por ejemplo, un ser humano) de modo que esté por encima de la concentración eficaz y por debajo de la concentración tóxica. Si no se puede mantener una concentración eficaz del medicamento sin inducir efectos inseguros, el fármaco fracasará durante el desarrollo. Se pueden encontrar comentarios adicionales relacionados con el desarrollo de fármacos en referencias diversas, que incluyen: *Pharmacokinetics in Drug Development: Clinical Study Design and Analysis* (2004, Peter Bonate y Danny Howard, ed.), que se incorpora a esta memoria en su integridad.

25 Las neuregulinas son factores de crecimiento relacionados con factores de crecimiento epidérmico que se unen a los receptores erbB. Se ha demostrado que mejoran la función cardiaca en múltiples modelos de insuficiencia cardiaca, cardiotoxicidad e isquemia. También se ha demostrado que protegen el sistema nervioso en modelos de apoplejía, lesión de la médula espinal, exposición a agentes nerviosos, lesiones de los nervios periféricos y quimiotoxicidad.

30 Sin embargo, se ha demostrado que el mantenimiento de niveles supranormales de neuregulinas suministradas exógenamente tiene efectos adversos que incluyen hiperplasia de la vaina nerviosa, hiperplasia mamaria y nefropatía renal. Estos efectos se observaron después de la administración subcutánea diaria de neuregulina. Véase, por ejemplo, la Tabla 10.

35 Según se expone en la presente memoria, se exploró la administración subcutánea debido a la vida media prolongada en comparación con la administración intravenosa y la creencia inicial de que mantener constantes los niveles de ligando sería ventajoso. El desarrollo de posologías para reducir estos efectos mejoraría significativamente la capacidad de las neuregulinas para ser utilizadas como terapéutica y la presente invención va dirigida precisamente a este fin. Demostrar que una dosificación menos frecuente que no mantiene niveles constantes también es efectiva permite este desarrollo.

40 Neuregulinas: Según se ha indicado anteriormente, los péptidos codificados por los genes NRG-1, NRG-2, NRG-3 y NRG-4 poseen dominios de tipo EGF que les permiten unirse y activar los receptores ErbB. Holmes et al. (*Science* 256: 1205-1210, 1992) han demostrado que el dominio de tipo EGF por sí solo es suficiente para unirse al receptor p185erbB2 y activarlo. En consecuencia, cualquier producto peptídico codificado por el gen NRG-1, NRG-2 o NRG-3, o cualquier péptido de tipo neuregulina —por ejemplo, un péptido que tiene un dominio de tipo EGF codificado por un gen de neuregulina o ADNc (por ejemplo, un dominio de tipo EGF que contiene los subdominios peptídicos NRG-1 C-C/D o C-C/D', según se describe en los documentos USPN 5.530.109, USPN 5.716.930 y USPN 7.037.888, o un dominio de tipo EGF, según se describe en el documento WO 97/09425)— puede ser usado en los métodos de la invención para prevenir o tratar la insuficiencia cardiaca congestiva. Se incorpora en la presente memoria en su integridad el contenido de cada uno de los documentos USPN 5.530.109; USPN 5.716.930; USPN 7.037.888; y el documento WO 97/09425.

45 Factores de riesgo: Son muy conocidos los factores de riesgo que aumentan la probabilidad de que un individuo desarrolle insuficiencia cardiaca congestiva. Estos incluyen, sin limitación, tabaquismo, obesidad, hipertensión arterial, cardiopatía isquémica, enfermedades vasculares, cirugía de derivación coronaria, infarto de miocardio, disfunción sistólica del ventrículo izquierdo, exposición a compuestos cardiotoxicos (alcohol, drogas tales como la cocaína y antibióticos de antraciclina (tales como la doxorrubicina y la daunorrubicina), infección viral, pericarditis, miocarditis, gingivitis, enfermedad tiroidea, exposición a radiaciones, defectos genéticos que se sabe que aumentan

el riesgo de insuficiencia cardiaca (tales como los descritos en Bachinski y Roberts, *Cardiol. Clin.* 16:603-610, 1998; Siu et al., *Circulation* 8: 1022-1026, 1999, y Arbustini et al., *Heart* 80: 548-558, 1998), inanición, trastornos de la alimentación tales como anorexia y bulimia, antecedentes familiares de insuficiencia cardiaca e hipertrofia miocárdica.

- 5 Según la presente descripción, que comprende la invención, las neuregulinas pueden administrarse intermitentemente para lograr la profilaxis, tal como previniendo o disminuyendo la velocidad del avance de la cardiopatía congestiva en las personas a las que se identifica en situación de riesgo. Por ejemplo, la administración de neuregulina a un paciente con hipertrofia compensatoria temprana permite el mantenimiento del estado hipertrófico y evita el avance hacia la insuficiencia cardiaca. Además, a las personas a las que se identifica en  
10 situación de riesgo se les puede dar un tratamiento cardioprotector a base de neuregulina antes del desarrollo de la hipertrofia compensatoria.

- La administración de neuregulina a pacientes con cáncer antes y durante la quimioterapia con antraciclina o la terapia combinada con antraciclina/anticuerpo anti-ErbB2 (anti-HER2) (por ejemplo, HERCEPTIN®) puede evitar que los cardiomiocitos del paciente sufran apoptosis, preservando con ello la función cardiaca. Los pacientes que ya han  
15 sufrido pérdida de cardiomiocitos también derivan beneficios del tratamiento con neuregulina, porque el tejido miocárdico restante responde a la exposición a la neuregulina al presentar crecimiento hipertrófico y mayor contractilidad.

- Terapia: Las neuregulinas y los péptidos que contienen dominios de tipo EGF codificados por genes de neuregulina pueden ser administrados a pacientes o animales de experimentación con un diluyente, vehículo o excipiente  
20 farmacéuticamente aceptable. Las composiciones de la invención pueden proporcionarse en formas posológicas unitarias.

- La práctica farmacéutica convencional se emplea para proporcionar formulaciones o composiciones adecuadas, y para administrar tales composiciones a pacientes o animales de experimentación. Aunque se prefiere la administración intravenosa, se puede emplear cualquier vía de administración apropiada; por ejemplo, una  
25 administración parenteral, subcutánea, intramuscular, transdérmica, intracardiaca, intraperitoneal, intranasal, aerosol, oral o tópica (por ejemplo, mediante la aplicación de un parche adhesivo que tiene una formulación capaz de atravesar la dermis y entrar en el torrente sanguíneo).

- Las formulaciones terapéuticas pueden tener la 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  
30 forma de polvos, gotas nasales o aerosoles.

- Métodos muy conocidos en la técnica para preparar formulaciones se encuentran, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences". Por ejemplo, las formulaciones para administración parenteral pueden contener excipientes, agua estéril o solución salina, polialquilenglicoles tales como polietilenglicol, aceites de origen vegetal o naftalenos hidrogenados. Otros sistemas de administración parenteral potencialmente útiles para la administración  
35 de moléculas de la invención incluyen partículas de copolímero de etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables y liposomas. Las formulaciones para inhalación pueden contener excipientes — por ejemplo, lactosa— o pueden ser soluciones acuosas que contienen, por ejemplo, polioxietileno-9-lauriléter, glicocolato y desoxicolato, o pueden ser soluciones oleosas para su administración en forma de gotas nasales, o como un gel.

- 40 Como aspecto adicional de la invención, se proporcionan los presentes compuestos para su uso como un producto farmacéutico especialmente en el tratamiento o la prevención de las afecciones y enfermedades anteriormente mencionadas. También se proporciona en la presente memoria el uso de los presentes compuestos en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una de las afecciones y enfermedades mencionadas anteriormente.

- 45 Con respecto a las inyecciones intravenosas, los niveles de dosis varían de aproximadamente 0,001 mg/kg, 0,01 mg/kg a al menos 10 mg/kg, en intervalos de tiempo regulares de al menos aproximadamente cada 24, 36, 48 horas a aproximadamente cada 96 horas y especialmente cada 48, 72, o 96 horas o más, según se define en la presente memoria. En un caso particular, los niveles de dosis de inyección intravenosa oscilan entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg, en intervalos de tiempo regulares de aproximadamente cada 48 horas a  
50 aproximadamente cada 96 horas y especialmente cada 48, 72 o 96 horas o más, según se define en la presente memoria. En otro caso particular, los niveles de dosis de inyección intravenosa oscilan entre aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg, en intervalos de tiempo regulares de aproximadamente cada 48 horas a aproximadamente cada 96 horas y especialmente cada 48, 72 o 96 horas o más, según se define en la presente memoria. En otro caso particular adicional, los niveles de dosis de inyección intravenosa oscilan entre  
55 aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 1 mg/kg, en intervalos de tiempo regulares de aproximadamente

cada 48 horas a aproximadamente cada 96 horas y especialmente cada 48, 72 o 96 horas o más, según se define en la presente memoria.

5 Con respecto a las inyecciones subcutáneas, los niveles de dosis varían de aproximadamente 0,01 mg/kg a al menos 10 mg/kg, en intervalos de tiempo regulares de aproximadamente cada 48 horas a aproximadamente cada 96 horas y especialmente cada 48, 72 o 96 horas o más, según se define en la presente memoria. En un caso particular, los niveles de dosis de inyección oscilan entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg, en intervalos de tiempo regulares de aproximadamente cada 48 horas a aproximadamente cada 96 horas o más, según se define en la presente memoria, y especialmente cada 48, 72 o 96 horas.

10 En otro caso particular, los niveles de dosis de inyección oscilan entre aproximadamente 1 mg/kg y aproximadamente 10 mg/kg, en intervalos de tiempo regulares de aproximadamente cada 48 horas a aproximadamente cada 96 horas o más, según se define en la presente memoria, y especialmente cada 48, 72 o 96 horas. En otro caso particular adicional, los niveles de dosis de inyección oscilan entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 1 mg/kg, en intervalos de tiempo regulares de aproximadamente cada 48 horas a aproximadamente cada 96 horas o más, según se define en la presente memoria, y especialmente cada 48, 72 o 96 horas. En otro caso particular adicional, los niveles de dosis de inyección oscilan entre aproximadamente 0,1 mg/kg y aproximadamente 1 mg/kg, en intervalos de tiempo regulares de aproximadamente cada 48 horas a aproximadamente cada 96 horas o más, según se define en la presente memoria, y especialmente cada 48, 72 o 96 horas.

20 Generalmente se seleccionan dosis transdérmicas para proporcionar niveles sanguíneos similares o inferiores a los que se logran usando dosis de inyección.

25 Los compuestos de la invención pueden ser administrados como el único agente activo o pueden ser administrados en combinación con otros agentes, incluyendo otros compuestos que demuestran una actividad terapéutica igual o similar y que se determine que son seguros y eficaces para tal administración combinada. Otros compuestos tales utilizados para el tratamiento de la CHF incluyen el péptido natriurético cerebral (BNP), fármacos que bloquean la formación o la acción de neurohormonas específicas (por ejemplo, inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina (inhibidores ECA), antagonistas de los receptores de angiotensina (ARA), antagonistas de aldosterona y betabloqueantes de receptores adrenérgicos), inótropos (por ejemplo, dobutamina, digoxina) para mejorar la contractilidad cardíaca, vasodilatadores (por ejemplo, nitratos, nesiritida) y/o diuréticos (por ejemplo, furosemida) para reducir la congestión, y uno o más agentes antihipertensivos como betabloqueantes, inhibidores ECA y los ARA, nitratos (dinitrato de isosorbida), hidralazina y bloqueantes de los canales de calcio.

35 Según se ha indicado anteriormente, la intervención médica que implica el tratamiento farmacológico requiere la selección de un fármaco apropiado y su administración con una posología adecuada. Una posología adecuada implica una dosis suficiente, una vía de administración, una frecuencia y una duración de tratamiento. El objetivo último de la farmacoterapia es la adquisición de concentraciones óptimas de fármaco en el lugar de acción para permitir que el paciente tratado supere el proceso patológico para el que se necesita tratamiento. En términos generales, el conocimiento básico de los principios del comportamiento del fármaco facilita la selección de las posologías apropiadas. Sin embargo, se puede usar en este contexto la monitorización terapéutica de fármacos (MTF) como herramienta complementaria para contribuir a que el médico encargado determine posologías eficaces y seguras de fármacos seleccionados para la terapia médica de pacientes individuales.

40 Concentración diana y ventana terapéutica: La definición de concentración óptima de un fármaco varía según las características farmacodinámicas del fármaco en particular. La terapia óptima para antibióticos dependientes del tiempo, como la penicilina, por ejemplo, está relacionada con la consecución de concentraciones máximas con relaciones de MIC (concentración inhibitoria mínima) de 2-4 y un tiempo por encima de la MIC igual al 75% del intervalo de dosis. Para antibióticos dependientes de la concentración, como, por ejemplo, la gentamicina, la eficacia está relacionada con la obtención de una concentración máxima con relaciones de MIC de aproximadamente 8-10. Independientemente de los matices asociados con la administración de un fármaco particular, la terapia farmacológica tiene como objetivo alcanzar concentraciones plasmáticas diana (que a menudo reflejan las concentraciones en el sitio de acción) dentro de los límites de una "ventana terapéutica", que ha sido determinada previamente en función de los perfiles farmacocinético, farmacodinámico y de toxicidad del fármaco en la especie diana. La amplitud de esta ventana varía para los diferentes fármacos y las diferentes especies. Cuando la diferencia entre la concentración eficaz mínima y la concentración tóxica mínima es pequeña (de 2 a 4 veces), se dice que la ventana terapéutica es estrecha. En cambio, cuando hay una gran diferencia entre la concentración efectiva y la tóxica, se considera que el medicamento tiene una amplia ventana terapéutica. Un ejemplo de un fármaco con una ventana terapéutica estrecha es la digoxina, en la cual la diferencia entre la concentración promedio efectiva y la tóxica es de 2 o 3 veces. La amoxicilina, por otro lado, tiene un amplio intervalo terapéutico y la sobredosificación de un paciente generalmente no se asocia con problemas de toxicidad.

Variabilidad en la reactividad del fármaco: Es común una pronunciada variabilidad entre sujetos sanos de la misma especie con respecto a la reactividad del fármaco. Además, los estados patológicos tienen el potencial de afectar a los sistemas y las funciones de los órganos (por ejemplo, del riñón, del hígado, y el contenido de agua) que, a su



| Parámetros | Grupo 1 (n=2)  |                      | Grupo 2 (n=1)  |                      |
|------------|----------------|----------------------|----------------|----------------------|
|            | Total          | Precipitable con ATC | Total          | Precipitable con ATC |
|            | Grupo 1 - i.v. |                      | Grupo 2 - s.c. |                      |

En las Figuras 6 y 7 se muestran las concentraciones en plasma tras la administración, para la administración iv y sc, respectivamente. Como se muestra en las Figuras 6 y 7,  $C_{max}$ , se refiere a la concentración máxima en plasma (la concentración máxima que se mide en el plasma en cualquier momento después de la administración);  $CUA_{inf}$  se refiere al área bajo la curva de concentración en función del tiempo hasta un tiempo infinito (método que se usa para prever que el ensayo tiene límites de detección);  $CUA_{0-t}$  se refiere al área bajo la concentración de plasma (curva de tiempo desde un tiempo cero hasta la última concentración medible);  $CUA$ , por cualquier método, se refiere a una estimación de la exposición total al animal; y  $T_{max}$  se refiere a la mediana del tiempo de la concentración máxima en plasma.

Como resulta evidente por las tablas y las figuras, no es posible mantener niveles terapéuticos de estado estacionario por ninguna de las dos vías de dosificación con cada cuarto día, cada dos días o cada día de dosificación. Los niveles son inconmensurables después de un día e incluso mucho antes de eso, como se refleja en los datos expresados en la Tabla 11.

**Tabla 11: Parámetros FC para el GGF2 después de la administración intravenosa\***

| Ratas         |                             |   |                             |                                     |                |               |             |
|---------------|-----------------------------|---|-----------------------------|-------------------------------------|----------------|---------------|-------------|
| Dosis (mg/kg) | $CUA_{0-\infty}$ (hr·ng/mL) | $CUA_{0-\infty}/dosis$ ((hr·ng/mL)/mg/kg) | $CUA_{0-ultima}$ (hr·ng/mL) | $CUA_{0-ultima}$ ((hr·ng/mL)/mg/kg) | CL (mL/min/kg) | $t_{1/2}$ (h) | Vss (mL/kg) |
| 8             | 16100±20500                 | 2010±2560                                 | 16800±22300                 | 2100±2790                           | 18,1±12,7      | 1,46±1,84     | 1050±331    |
| 16            | 39600±9440                  | 2470±590                                  | 38300±10000                 | 2390±625                            | 7,00±1,33      | 1,69±0,430    | 532±145     |
| Monos         |                             |   |                             |                                     |                |               |             |
| 8             | 15900±1690                  | 1980±212                                  | 15100±1730                  | 1890±217                            | 8,48±0,910     | 2,02±0,358    | 1110±113    |

\*tomados de datos obtenidos de concentraciones de GGF2 en plasma medidas por ELISA. Los datos documentados son media ± DT.

15 Estado estacionario: Las concentraciones séricas de estado estacionario son aquellos valores que reaparecen con cada dosis y representan un estado de equilibrio entre la cantidad de fármaco administrada y la cantidad que se elimina en un intervalo de tiempo dado. Durante la dosificación a largo plazo con cualquier fármaco, los dos determinantes principales de su concentración sérica media en estado estacionario son la velocidad a la que se administra el fármaco y la eliminación total del fármaco en ese paciente en particular.

20 Concentración máxima en suero: El punto de máxima concentración en la curva de concentración sérica en función del tiempo. El momento exacto de la concentración sérica máxima es difícil de predecir, ya que representa relaciones complejas entre las tasas de entrada y salida.

25 Concentración valle en suero: La concentración sérica mínima encontrada durante un intervalo de dosificación. Las concentraciones valle están teóricamente presentes en el periodo inmediatamente anterior a la administración de la siguiente dosis.

Absorción: El proceso por el cual un fármaco entra en el cuerpo. Los fármacos administrados intravascularmente se absorben totalmente, pero la administración extravascular produce diversos grados y tasas de absorción. La relación entre la tasa de absorción y la tasa de eliminación es el principal determinante de la concentración del fármaco en el torrente sanguíneo.

30 Distribución: La dispersión del fármaco sistémicamente disponible desde el espacio intravascular en fluidos y tejidos extravasculares y, así, en los sitios receptores diana.

35 Intervalo terapéutico: El intervalo de concentraciones séricas de fármacos asociado con un alto grado de eficacia y un bajo riesgo de toxicidad relacionada con la dosis. El intervalo terapéutico es un concepto estadístico: es el intervalo de concentración asociado con la respuesta terapéutica en la mayoría de los pacientes. En consecuencia, algunos pacientes presentan una respuesta terapéutica a niveles séricos por debajo del límite inferior del intervalo, mientras que otros requieren niveles séricos que superan el límite superior para la obtención de un beneficio terapéutico.

40 La correcta temporización de la toma de muestras es importante, ya que la terapia farmacológica a menudo se revisa en función de las determinaciones de la concentración sérica. Las fases de absorción y distribución deberían estar completas y debería lograrse una concentración en estado estacionario antes de extraer la muestra. Los niveles obtenidos antes de que exista una concentración de estado estacionario pueden ser erróneamente bajos; aumentar la dosis en función de dicho resultado podría producir concentraciones tóxicas. Además, cuando se realizan mediciones comparativas, es importante que la temporización del muestreo sea sistemática.

La temporización de las muestras sanguíneas en relación con la dosificación es crítica para la correcta interpretación del resultado de la concentración sérica. La selección del momento en que se extrae la muestra en relación con la administración del fármaco debería basarse en las propiedades farmacocinéticas del fármaco, en su forma posológica y en la razón clínica para el análisis la muestra (por ejemplo, la evaluación de la eficacia o la aclaración de la posible toxicidad inducida de un fármaco). Para la monitorización rutinaria del nivel sérico de fármacos de vida media corta, se pueden recoger tanto una muestra pico de estado estacionario como una de valle para calificar el perfil de concentración sérica; para fármacos de vida media larga, generalmente bastan las muestras valle en estado estacionario por sí solas.

Por “insuficiencia cardíaca congestiva” se entiende la función cardíaca deficiente que hace que el corazón sea incapaz de mantener un gasto cardíaco normal en reposo o con ejercicio, o de mantener un gasto cardíaco normal en la configuración de la presión normal de llenado del corazón. Una fracción de eyección del ventrículo izquierdo de aproximadamente un 40% o menos es indicativa de insuficiencia cardíaca congestiva (a modo de comparación, una fracción de eyección de aproximadamente el 60 por ciento es normal). Los pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva presentan síntomas y signos clínicos muy conocidos, como taquipnea, derrames pleurales, fatiga en reposo o con ejercicio, disfunción contráctil y edema. La insuficiencia cardíaca congestiva se diagnostica fácilmente con métodos muy conocidos (véase, por ejemplo, “Consensus recommendations for the management of chronic heart failure”, *Am. J. Cardiol.*, 83(2A):1A-38-A, 1999).

La relativa gravedad y el avance de la enfermedad se evalúan utilizando métodos muy conocidos, tales como la exploración física, la ecocardiografía, la gammagrafía, la monitorización hemodinámica invasiva, la angiografía por resonancia magnética y las pruebas de ejercicio en cinta motorizada combinadas con estudios de captación de oxígeno.

Por “cardiopatía isquémica” se entiende cualquier trastorno resultante de un desequilibrio entre la necesidad de oxígeno por parte del miocardio y la adecuación del suministro de oxígeno. La mayoría de los casos de cardiopatía isquémica son consecuencia del estrechamiento de las arterias coronarias, como ocurre en la aterosclerosis u otros trastornos vasculares.

Por “infarto de miocardio” se entiende un proceso mediante el cual la enfermedad isquémica da como resultado que una región del miocardio sea sustituida por tejido cicatricial.

Por “cardiotóxico” se entiende un compuesto que disminuye la función cardíaca al deteriorar o matar cardiomiocitos directa o indirectamente.

Por “hipertensión” se entiende la presión arterial que un profesional médico (por ejemplo, un médico o una enfermera) considera más alta de lo normal y que conlleva un mayor riesgo de desarrollar una insuficiencia cardíaca congestiva.

Por “tratar” se entiende que la administración de una neuregulina o de un péptido de tipo neuregulina ralentiza o inhibe el avance de la insuficiencia cardíaca congestiva durante el tratamiento, en relación con el avance de la enfermedad que se produciría en ausencia de tratamiento, de una manera estadísticamente significativa. Se pueden usar indicadores muy conocidos, tales como la fracción de eyección del ventrículo izquierdo, el rendimiento deportivo y otras pruebas clínicas enumeradas anteriormente, así como las tasas de supervivencia y las tasas de hospitalización para evaluar el avance de la enfermedad. Se puede determinar si un tratamiento ralentiza o inhibe el avance de la enfermedad de una manera estadísticamente significativa mediante métodos que son muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, SOLVD Investigators, *N. Engl. J. Med.* 327:685-691, 1992 y Cohn et al., *N. Engl. J. Med.* 339:1810-1816, 1998).

Por “prevenir” se entiende minimizar o inhibir parcial o completamente el desarrollo de la insuficiencia cardíaca congestiva en un mamífero con riesgo de desarrollar insuficiencia cardíaca congestiva (según se define en “Consensus recommendations for the management of chronic heart failure”, *Am. J. Cardiol.*, 83(2A):1A-38-A, 1999). La determinación de si la insuficiencia cardíaca congestiva se minimiza o se previene mediante la administración de una neuregulina o de un péptido de tipo neuregulina se realiza mediante métodos conocidos, tales como los descritos en SOLVD Investigators, supra, y Cohn et al., supra.

La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a la cantidad de un fármaco o agente farmacéutico que provoca la respuesta biológica o médica de un tejido, un sistema, un animal o un ser humano que está siendo buscada por un investigador, un veterinario, un médico u otro clínico. Un cambio terapéutico es un cambio en una característica bioquímica medida en una dirección que se espera que alivie la enfermedad o afección que se aborda. Más en particular, una “cantidad terapéuticamente eficaz” es una cantidad suficiente para disminuir los síntomas asociados con una afección o dolencia médica, para normalizar las funciones corporales en enfermedades o trastornos que provocan el deterioro de funciones corporales específicas, o para proporcionar una mejoría en uno o más de los parámetros medidos clínicamente de una enfermedad.

La expresión "cantidad profilácticamente efectiva" se refiere a la cantidad de un fármaco que evitará o reducirá el riesgo de incidencia del evento biológico o médico que se busca prevenir en un tejido, un sistema, un animal o un ser humano por parte de un investigador, un veterinario, un médico u otro clínico.

5 La expresión "ventana terapéutica" se refiere al intervalo de dosis entre la cantidad mínima para lograr cualquier cambio terapéutico, y la cantidad máxima que da como resultado una respuesta que es la respuesta inmediatamente antes de la toxicidad para el paciente.

10 Por "en riesgo de insuficiencia cardiaca congestiva" se entiende un individuo que fuma, que es obeso (es decir, 20% o más por encima de su peso ideal), que ha estado o estará expuesto a un compuesto cardiotóxico (tal como un antibiótico de antraciclina), o que tiene (o tuvo) hipertensión arterial, cardiopatía isquémica, un infarto de miocardio, un defecto genético que se sabe que aumenta el riesgo de insuficiencia cardiaca, antecedentes familiares de insuficiencia cardiaca, hipertrofia miocárdica, miocardiopatía hipertrófica, disfunción sistólica del ventrículo izquierdo, cirugía de derivación coronaria, enfermedad vascular, aterosclerosis, alcoholismo, pericarditis, una infección viral, gingivitis o un trastorno alimentario (por ejemplo, anorexia nerviosa o bulimia), o que es alcohólico o cocainómano.

15 Por "disminución del avance del adelgazamiento del miocardio" se entiende el mantenimiento de la hipertrofia de los cardiomiocitos ventriculares de manera que el grosor de la pared ventricular se mantenga o aumente.

Por "inhibe la apoptosis del miocardio" se entiende que el tratamiento con neuregulina inhibe la muerte de los cardiomiocitos en al menos un 10%, más preferiblemente en al menos un 15%, aún más preferentemente en al menos un 25%, incluso más preferentemente en al menos un 50%, aún más preferentemente en al menos un 75%, y lo más preferentemente en al menos un 90%, en comparación con cardiomiocitos no tratados.

20 Por "neuregulina" o "NRG" se entiende un péptido que es codificado por un gen NRG-1, NRG-2 o NRG-3 o ácido nucleico (por ejemplo, un ADNc), y se une y activa receptores ErbB2, ErbB3 o ErbB4, o combinaciones de los mismos.

25 Por "neuregulina-1", "NRG-1", "heregulina", "GGF2", o "ligando p185erbB2" se entiende un péptido que se une al receptor ErbB2 cuando se empareja con otro receptor (ErbB1, ErbB3 o ErbB4) y está codificado por el gen del ligando p185erbB2 descrito en la patente estadounidense nº 5.530.109; en la patente estadounidense nº 5.716.930; y en la patente estadounidense nº 7.037.888, cada una de las cuales se incorpora en la presente memoria por referencia en su integridad.

Por "péptido de tipo neuregulina" se entiende un péptido que posee un dominio de tipo EGF codificado por un gen de neuregulina, y se une y activa ErbB2, ErbB3, ErbB4, o una combinación de los mismos.

30 Por "dominio de tipo factor de crecimiento epidérmico" o "dominio de tipo EGF" se entiende un motivo peptídico codificado por el gen NRG-1, NRG-2 o NRG-3 que se une a ErbB2, ErbB3, ErbB4 o a combinaciones de los mismos y los activa, y tiene una similitud estructural con el dominio de unión al receptor de EGF, según se da a conocer en Holmes et al., Science 256:1205-1210, 1992; en la patente estadounidense nº 5.530.109; en la patente estadounidense nº 5.716.930; en la patente estadounidense nº 7.037.888; en Hijazi et al., Int. J. Oncol. 13:1061-1067, 1998; Chang et al., Nature 387:509-512, 1997; Carraway et al., Nature 387:512-516, 1997; Higashiyama et al., J Biochem. 122:675-680, 1997; y en el documento WO 97/09425). Véanse las Figuras 9-14 para secuencias nucleicas y de aminoácidos correspondientes a los dominios EGFL 1-6 codificados por el gen NRG-1.

35

40 Por "anticuerpo anti-ErbB2" o "anticuerpo anti-HER2" se entiende un anticuerpo que se une específicamente al dominio extracelular del receptor ErbB2 (también denominado HER2 en seres humanos) e impide la transducción de señal dependiente de ErbB2 (HER2) iniciada por la unión con neuregulina.

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

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

50 Por "unido operativamente" se entiende que un ácido nucleico que codifica un péptido (por ejemplo, un ADNc) y una o más secuencias reguladoras están conectados de tal manera que permita la expresión génica cuando las moléculas apropiadas (por ejemplo, proteínas activadoras de la transcripción) están unidas a las secuencias reguladoras.

55 Por "vector de expresión" se entiende un plásmido o virus genéticamente modificado, derivado, por ejemplo, de un bacteriófago, un adenovirus, un retrovirus, un poxvirus, un herpesvirus o un cromosoma artificial, que se usa para transferir una secuencia de codificación de péptido (por ejemplo, una neuregulina), unida operativamente a un

promotor, en una célula anfitriona, de manera que el péptido o péptido codificado se exprese dentro de la célula anfitriona.

5 A no ser que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente una persona con un dominio normal de la técnica a la que pertenece esta invención.

10 La exposición de documentos, acciones, materiales, dispositivos, artículos y similares se incluye en esta memoria con el fin único de proporcionar un contexto para la presente invención. No se sugiere ni se da a entender que alguno o la totalidad de estos elementos formaran parte de la base de la técnica anterior o fueran del dominio público general en el campo relevante para la presente invención antes de la fecha de prioridad de cada reivindicación de esta solicitud.

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

### Ejemplos

15 Según se ha indicado anteriormente en la presente memoria, las neuregulinas son una familia de factores de crecimiento estructuralmente relacionados con el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y son esenciales para el desarrollo normal del corazón. La evidencia sugiere que las neuregulinas son una terapia potencial para el tratamiento de enfermedades cardíacas, incluyendo la insuficiencia cardíaca, el infarto de miocardio, la toxicidad por quimioterapia y la miocarditis viral.

20 Los estudios descritos en la presente memoria se aportaron para definir la dosificación en el modelo de ligadura de la arteria descendente anterior izquierda (LAD) de insuficiencia cardíaca congestiva en la rata. Se clonaron y produjeron múltiples variantes de empalme de neuregulina. Se comparó un fragmento de neuregulina consistente en el dominio de tipo EGF (EGF-Id) de informes anteriores (Liu et al., 2006) con una neuregulina de longitud máxima denominada factor de crecimiento glial 2 (GGF2), y el dominio de tipo EGF con el dominio Ig (EGF-Ig). Se sometió a ratas Sprague-Dawley macho y hembra a ligadura de la arteria LAD. A los 7 días después de la ligadura, las ratas fueron tratadas diariamente por vía intravenosa (iv) con neuregulina. La función cardíaca fue monitorizada mediante ecocardiografía.

25 El primer estudio comparó 10 días de dosificación con cantidades equimolares de EGF-Id o GGF2 (para el GGF2 esto da 0,0625 y 0,325 mg/kg). El tratamiento con GGF2 produjo una mejora significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) en la fracción de eyección (FE) y el acortamiento fraccionario (AF) que en el EGF-Id al final del periodo de dosificación. El segundo estudio comparó 20 días de GGF2 con EGF-Id y EGF-Ig en concentraciones equimolares. El tratamiento con GGF2 dio como resultado una FE, un AF y una dimensión sistólica final del ventrículo izquierdo (DSFVI) significativamente mejores ( $p < 0,01$ ). Las mejoras en la fisiología cardíaca no se mantuvieron durante este periodo con EGF-Id ni con EGF-Ig. El tercer estudio comparó la dosificación diaria (cada 24 horas), cada dos días (cada 48 horas) y cada cuarto día (cada 96 horas) durante 20 días con GGF2 (3,25 mg/kg). Las tres posologías de tratamiento con GGF2 dieron como resultado mejoras significativas en la fisiología cardíaca, incluidos la FE, el volumen sistólico final (VSF) y el volumen diastólico final (VDF), y los efectos se mantuvieron durante 10 días tras la finalización de la dosificación. Los estudios aquí presentados confirman que el GGF2 es el principal compuesto de la neuregulina y establecen posologías óptimas para la administración del mismo.

40 Como se muestra en la presente memoria, los presentes estudios establecen la eficacia relativa del GGF2 en comparación con los fragmentos de neuregulina publicados (Liu et al., 2006), inician estudios de dosis y frecuencia de dosis y determinan si se requiere excipiente BSA, según se documentó previamente.

### Métodos y materiales

45 **Clonación, expresión y purificación del dominio IgEGF (Ig154Y) del ADN de GGF2 (EGF-Ig):** El dominio IgEGF fue amplificado a partir de un ADNc de GGF2 existente y fue clonado en el vector pET15b (nº de catálogo de Novagen 69661-3) usando los sitios de restricción Nde1 y BamH1. La proteína resultante es una etiqueta His de 21,89 kDa + ~ 3kDa (= ~ 25 kDa).

Secuencia de ADN del clon pET15 de IgEgf: Las secuencias subrayadas son los cebadores usados para la amplificación. Las secuencias en negrita son los sitios de clonación utilizados para insertar la secuencia en el vector pET (Nde1 y BamH1).

**CATATG**ttgcctccccaattgaaagagatgaaaagccaggaatcggctgcaggttccaaa  
 L P P Q L K E M K S Q E S A A G S K  
 ctagtccttcgggtgtgaaaccagttctgaatactcctctctcagattcaagtggttcaag  
 L V L R C E T S S E Y S S L R F K W F K  
 aatgggaatgaattgaatcgaaaaaacaaccacaaaatatcaagatacaaaaaaagcca  
 N G N E L N R K N K P Q N I K I Q K K P  
 gggaagtcagaacttcgcattaacaagcatcactggctgattctggagagtatatgtgc  
 G K S E L R I N K A S L A D S G E Y M C  
 aaagtgatcagcaaattaggaaatgacagtgacctctgccaatatcaccatcgtggaatca  
 K V I S K L G N D S A S A N I T I V E S  
 aacgctacatctacatccaccactgggacaagccatcttgtaaaatgtgcgagaaggag  
 N A T S T S T T G T S H L V K C A E K E  
 aaaactttctgtgtgaatggaggggagtgcttcatgggtgaaagacctttcaaaccctcg  
 K T F C V N G G E C F M V K D L S N P S  
 agatacttggtgcaagtgcccaaatgagtttactgggtgatcgctgccaaaactacgtaatg  
 R Y L C K C P N E F T G D R C Q N Y V M  
gccagcttctacGGATCC (SEQ ID NO: 15)  
 A S F Y (SEQ ID NO: 16)

A continuación, se muestra la proteína traducida final del vector pET15b. La porción del vector está subrayada.

M G G S H H H H H G M A S M T G G T A N G V G  
D L Y D D D D K V P G S L P P Q L K E M K S Q E  
 S A A G S K L V L R C E T S S E Y S S L R F K W  
 F K N G N E L N R K N K P Q N I K I Q K K P G K  
 S E L R I N K A S L A D S G E Y M C K V I S K L  
 E N D S A S A N I T I V E S N A T S T S T T G T  
 S H L V K C A E K E K T F C V N G G E C F M V K  
 D L S N P S R Y L C K C P N E F T G D R C Q N Y  
 V M A S F Y (SEQ ID NO: 17)

5 **Expresión proteica:** El clon se transformó en células BI21 para la expresión de proteínas usando el sistema de autoinducción exprés de un día para otro (Novagen) en caldo de lisogenia (CL) a 25°C durante 24 horas.

**Replegamiento de proteínas:** Adaptado del equipo de reactivos de replegamiento de proteínas Novagen, 70123-3.

**Purificación de proteínas:** Columnas His TRAP, según las instrucciones del fabricante.

**Inmunoelctrotransferencia:** La expresión de la proteína fue evaluada mediante inmunoelctrotransferencia. La banda resultante con la etiqueta His se corre a aproximadamente 25 kD.

10 Se usó un gel Criterion (Biorad) al 4-20% para la resolución de las proteínas seguido de transferencia sobre papel de nitrocelulosa Protran (tamaño de poro de 0,1 µm según Schleicher y Schull). La transferencia se bloquea en leche al 5% en TBS-T (0,1%). Disolución 1:1000 del anticuerpo primario (anticuerpo policlonal purificado de afinidad NRG1-alfa/HRG1-alfa anti EGF humano, nº de catálogo AF-296-NA de R&D Systems) en leche al 5% en TBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente (TA) (también funciona a 4°C de un día para otro). Se utilizó anticuerpo secundario de

peroxidasa de rábano picante (HRP) de conejo anti cabra a una disolución de 1:10.000 en leche al 5% en TBS-T durante 1 hora a TA. Todos los lavados se realizaron en TBS-T.

5 **Protocolo de purificación para Ig154Y:** Los cultivos se desarrollan a 25°C en el sistema 1 de autoinducción exprés de un día para otro de Novagen (nº de catálogo 71300-4). El cultivo se centrifuga y los sedimentos se extraen, se solubilizan, y se vuelven a plegar para obtener Ig154Y antes de que pueda tener lugar la purificación.

**Materiales para la extracción, la solubilización y el replegamiento:**

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

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

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

10 N-laurilsarcosina al 30%: añadir como polvo (Sigma 61739-SG)

1M DTT

Glutatión reducido (Novagen 3541)

Glutatión oxidado (Novagen 3542)

**A. Lisis celular y preparación de cuerpos de inclusión**

- 15
- Los sedimentos celulares fueron descongelados y resuspendidos en 30 ml de tampón de lavado 1x.
  - A la suspensión se añadieron los inhibidores de la proteasa (25ul de 10x cada 50 ml) DNasa (200ul de 1 mg/ml cada 50 ml) y MgCl<sub>2</sub> (500ul de 1M cada 50 ml).
  - Las células se lisaron por sonicación con enfriamiento en hielo.
  - Tras la sonicación, los cuerpos de inclusión fueron recogidos por centrifugación a 10000 x g durante 12
- 20 minutos.
- El sobrenadante fue eliminado y el sedimento fue completamente resuspendido en 30 ml de tampón de lavado 1x.
  - Se repitió la etapa 4.
  - El sedimento fue completamente resuspendido en 30 ml de tampón de lavado 1x.
- 25
- Los cuerpos de inclusión fueron recogidos por centrifugación a 10000 x g durante 10 minutos.

**B. Solubilización y replegamiento**

- A partir del peso húmedo de los cuerpos de inclusión que han de procesarse, calcular la cantidad de tampón de solubilización 1x necesaria para resuspender los cuerpos de inclusión a una concentración de 10-15 mg/ml. Si el volumen calculado es mayor que 250 ml, usar 250 ml.
- 30
- A temperatura ambiente, preparar el volumen calculado de tampón de solubilización 1x complementado con N-laurilsarcosina al 0,3% (se puede usar hasta el 2% si es necesario en una optimización adicional) (300 mg/100 ml de tampón) y 1 mM de DTT.
  - Añadir la cantidad calculada de tampón de solubilización 1x de la etapa 2 a los cuerpos de inclusión y mezclar suavemente. Los desechos grandes pueden romperse mediante pipeteo reiterado.
- 35
- Incubar en el agitador refrigerador a 25°C, a 50-100 rpm durante 4-5 horas (o más si es necesario en una optimización adicional).
  - Aclarar por centrifugación a 10000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente.
  - Transferir el sobrenadante que contiene la proteína soluble a un tubo limpio.

**C. Protocolo de diálisis para el replegamiento de las proteínas**

- 40
- Preparar el volumen requerido de tampón para la diálisis de la proteína solubilizada. La diálisis debería realizarse con al menos 2 cambios en el tampón de más de 50 veces el volumen de la muestra.
  - Diluir el tampón de diálisis 50x hasta 1x en el volumen deseado y complementar con 0,1mM de DTT.
  - Dializar durante al menos 4 horas a 4°C. Cambiar el tampón y continuar. Dializar durante 4 o más horas adicionales.
- 45
- Preparar tampón adicional de diálisis según se determinó en la etapa 1, pero omitir el DTT.
  - Continuar la diálisis a través de dos cambios adicionales (como mínimo de 4 horas cada uno), con el tampón de diálisis que carece de DTT.

**D. Tampón redox de replegamiento para promover la formación de enlaces disulfuro**

- 50
- Preparar un tampón de diálisis que contenga glutatión reducido 1mM (1,2 g/4 L) y glutatión oxidado 0,2mM (0,48 g/4 L) en tampón de diálisis 1x. El volumen debería ser 25 veces mayor que el volumen de la muestra de proteína solubilizada. Enfriar a 4°C.
  - Dializar la proteína replegada de la etapa 1 de un día para otro a 4°C.

**Materiales para la purificación**

Todos los procedimientos se realizan a 4°C.

Productos químicos:

Clorhidrato de Trizma (Sigma T5941-500G)  
 Solución de cloruro sódico 5M (Sigma S6546-4L)  
 Hidróxido sódico 10N (JT Baker 5674-02)  
 5 Imidazol (JT Baker N811-06)

**A. Purificación en la columna HISPrep FF 16/10 de 20 ml (GE Healthcare)**

Tampón A: 20mM Tris-HCL + 500mM NaCl pH 7,5  
 Tampón B: Tampón A+ 500mM imidazol pH 7,5  
 Equilibrado de la columna: Tampón A: 5CV, tampón B: 5CV, tampón A: 10CV  
 10 Cargar 20 ml de la muestra por tanda en la columna de 20 ml a 0,5 ml/min  
 Lavar la columna con 5CV de tampón A  
 Eluir la columna con 5CV de imidazol 280mM.

Limpiar con 10CV de tampón B al 100%  
 Equilibrar con 15CV de tampón A  
 15 Analizar las fracciones con una tinción con plata SDS-PAGE  
 Juntar las fracciones con Ig154Y

**B. Eliminación de la etiqueta His**

La eliminación de la etiqueta His se realiza con un equipo de reactivos de captura de escisión de trombina de Novagen (nº de catálogo 69022-3). Según pruebas previas, las mejores condiciones son temperatura ambiente durante 4 horas con trombina a 0,005U de enzima por µl por cada 10 µg de proteína Ig154Y. Después de cuatro horas de incubación, añadir 16 µl de suspensión espesa de agarosa de estreptavidina por unidad de la enzima trombina. Sacudir la muestra durante 30 minutos a temperatura ambiente. Recuperar el Ig154Y mediante filtrado por centrifugación o filtrado estéril (dependiendo del volumen).

La escisión completa se determina mediante EGF e inmunoelectrotransferencia anti His.

**C. Concentración de Ig154Y**

Ajustar a la concentración deseada con un concentrador de 15 ml Millipore Centriprep 3000 MWCO (Ultracel YM-3, 4320).

**D. Almacenamiento en el tampón final**

Almacenar en 20mM Tris + 500mM NaCl pH 7,5 y 1x PBS + 0,2% BSA.

30 **Clonación, expresión y purificación de ADN de 156Q (EGF-I<sub>d</sub>) [dominio NRG1b2 EGF (156Q)]:** El dominio NRG1b2 EGF fue clonado a partir de ADNc del cerebro humano y clonado en el vector pET15b (nº de catálogo de Novagen 69661-3) usando los sitios de restricción Nde1 y BamH1. La proteína resultante es una etiqueta His de 6,92 kDa + ~3kDa (= 9,35 kDa).

35 Secuencia de ADN del clon pET15 de NRG1b2: Las secuencias subrayadas son los sitios de clonación (Nde1 y BamH1).

CATATGAGCCA TCTTGTA AAA TGTGCGGAGA AGGAGAAAAC TTTCTGTGTG  
 AATGGAGGGG AGTGCTTCAT GGTGAAAGAC CTTTCAAACC CCTCGAGATA  
 CTTGTGCAAG TGCCCAAATG AGTTTACTGG TGATCGCTGC CAAAAC TACG  
 TAATGGCCAG CTTCTACAAG GCGGAGGAGC TGTACCAGTA AGGATCC (SEQ ID NO:  
 18)

A continuación, se muestra la proteína traducida final del vector pET15b. El dominio EGF está destacado en verde.

## ES 2 664 394 T3

10                      20                      30                      40                      50  
MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MSHLVKCAEK EKTFCVNGGE CFMVKDLSNP

60                      70                      80  
SRYLCKCPNE FTGDRQNYV MASFYKAEEL YQ (SEQ ID NO: 19)

pI/Mw calculado: 7,69/9349,58

**Expresión proteica:** El clon se transformó en células BI21 para la expresión de proteínas usando el sistema de autoinducción exprés de un día para otro (Novagen) en caldo de lisogenia (CL) a 25°C durante 24 horas. La expresión es fundamentalmente en cuerpos insolubles de inclusión.

**Replegamiento de proteínas:** Adaptado del equipo de reactivos de replegamiento de proteínas Novagen, 70123-3.

**Purificación de proteínas:** Se carga proteína en una columna de intercambio aniónico DEAE a 2,5 ml/min. El fragmento EGF-Id permanece en flujo pasante, mientras que los contaminantes se unen y eluyen a una sal más alta. El tampón de carga y lavado es 50 mM Tris pH 7,9 y el tampón de elución es 50 mM Tris pH 7,9 con 1M NaCl. El flujo pasante se agrupa y se concentra con un aparato Centriprep YM-3 de Millipore.

**Inmunoelctrotransferencia:** La expresión de la proteína se evalúa mediante inmunoelctrotransferencia. La banda resultante se corre a aproximadamente 10 kD.

Se usó un gel Criterion (Biorad) al 4-20% para la resolución de las proteínas seguido de transferencia sobre papel de nitrocelulosa Protran (tamaño de poro de 0,1 µm según Schliecher y Schull). La transferencia se bloquea en leche al 5% en TBS-T (0,1%). Disolución 1:1000 del anticuerpo primario (anticuerpo policlonal purificado de afinidad NRG1-alfa/HRG1-alfa anti EGF humano, nº de catálogo AF-296-NA de R&D Systems) en leche al 5% en TBS-T durante 1 hora a TA (también funciona a 4°C de un día para otro). Se utilizó anticuerpo secundario de HRP de conejo anti cabra a una disolución de 1:10.000 en leche al 5% en TBS-T durante 1 hora a TA. Todos los lavados se realizaron en TBS-T.

**Protocolo de purificación para NRG-156Q:** Los cultivos se desarrollan a 25°C en el sistema 1 de autoinducción exprés de un día para otro de Novagen (nº de catálogo 71300-4). Hay presente muy poco NRG-156Q (EGF-Id) soluble. El cultivo se centrifuga y los sedimentos se extraen, se solubilizan y se vuelven a plegar para obtener el NRG-156Q antes de que pueda tener lugar la purificación.

### Materiales para la extracción, la solubilización y el replegamiento:

Tampón de lavado 10x: 200mM Tris-HCl, pH 7,5, 100mM EDTA, Triton X-100 al 10%  
Tampón de solubilización 10x: 500mM CAPS, pH 11,0  
Tampón de diálisis 50x: 1M Tris-HCl, pH 8,5  
N-laurilsarcosina al 30%: añadir como polvo (Sigma 61739-SG)  
1M DTT

Glutatión reducido (Novagen 3541)  
Glutatión oxidado (Novagen 3542)

### A. Lisis celular y preparación de cuerpos de inclusión

- Descongelar y resuspender el sedimento celular en 30 ml de tampón de lavado 1x. Mezclar según se precise para una completa resuspensión.
- Añadir a la suspensión los inhibidores de la proteasa (25ul de 10x cada 50 ml) DNasa (200ul de 1 mg/ml cada 50 ml) y MgCl<sub>2</sub> (500ul de 1M cada 50 ml).
- Lisar las células por sonicación.

- a. Enfriar las células en hielo en toda esta etapa.
- b. Usando la punta cuadrada, emitir ultrasonidos durante 30 segundos en el nivel 6, diez veces hasta que la suspensión se vuelva menos viscosa. Dejar que la suspensión se enfríe en hielo durante 60 segundos entre cada sonicación. Mantener el volumen a no más de 40 ml en un tubo cónico de 50 ml cuando se esté sonicando.

- Cuando se complete, transferir cada suspensión a frascos de centrifugadora de cuello inclinado de 250 ml para uso con el rotor F-16/250.
- Recoger los cuerpos de inclusión por centrifugación a 10.000 × g durante 12 minutos.
- Eliminar el sobrenadante (salvo una muestra para el análisis de la proteína soluble) y resuspender completamente el sedimento en 30 ml de tampón de lavado 1x.
- Repetir la centrifugación como en la etapa 4 y guardar el sedimento.
- De nuevo, resuspender completamente el sedimento en 30 ml de tampón de lavado 1x.

- Recoger los cuerpos de inclusión por centrifugación a 10.000 x g durante 10 minutos. Decantar el sobrenadante y eliminar los últimos vestigios de líquido dando golpecitos con el tubo invertido sobre una toalla de papel.

**B. Solubilización y replegamiento**

- 5
- A partir del peso húmedo de los cuerpos de inclusión que han de procesarse, calcular la cantidad de tampón de solubilización 1x necesaria para resuspender los cuerpos de inclusión a una concentración de 10-15 mg/ml. Si el volumen calculado es mayor que 250 ml, usar 250 ml.
  - A temperatura ambiente, preparar el volumen calculado de tampón de solubilización 1x complementado con N-laurilsarcosina al 0,3% (se puede usar hasta el 2% si es necesario en una optimización adicional) (300 mg/100 ml de tampón) y 1 mM de DTT.
- 10
- Añadir la cantidad calculada de tampón de solubilización 1x de la etapa 2 a los cuerpos de inclusión y mezclar suavemente. Los desechos grandes pueden romperse mediante pipeteo reiterado.
  - Incubar en el agitador refrigerador a 25°C, a 50-100 rpm durante 4-5 horas.
  - Aclarar por centrifugación a 10.000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente.

15 **C. Protocolo de diálisis para el replegamiento de las proteínas**

- Preparar el volumen requerido de tampón para la diálisis de la proteína solubilizada. La diálisis debería realizarse con al menos 2 cambios en el tampón de más de 50 veces el volumen de la muestra.
  - Diluir el tampón de diálisis 50x hasta 1x en el volumen deseado y complementar con 0,1mM de DTT.
  - Dializar durante al menos 4 horas a 4°C. Cambiar el tampón y continuar. Dializar durante 4 o más horas adicionales.
- 20
- Preparar tampón adicional de diálisis según se determinó en la etapa 1, pero omitir el DTT.
  - Continuar la diálisis a través de dos cambios adicionales (como mínimo de 4 horas cada uno), con el tampón de diálisis que carece de DTT.

**D. Tampón redox de replegamiento para promover la formación de enlaces disulfuro**

- 25
- Preparar un tampón de diálisis que contenga glutatión reducido 1mM (1,2 g/4 L) y glutatión oxidado 0,2mM (0,48 g/4 L) en tampón de diálisis 1x. El volumen debería ser 25 veces mayor que el volumen de la muestra de proteína solubilizada. Enfriar a 4°C.
  - Dializar la proteína replegada de la etapa 1 de un día para otro a 4°C.

**Materiales para la purificación**

30 Todos los procedimientos se realizan a 4°C.

Productos químicos:

Clorhidrato de Trizma (Sigma T5941-500G)  
 Solución de cloruro sódico 5M (Sigma S6546-4L)  
 Hidróxido sódico 10N (JT Baker 5674-02)

35 **E. Purificación en la columna aniónica DEAE HiPrep FF 16/10 de 20 ml (GE Healthcare)**

Tampón A: 50mM Tris-HCL pH 8,0  
 Tampón B: 50mM Tris-HCL con 1M NaCl pH 8,0  
 Equilibrado de la columna: Tampón A: 5CV, tampón B: 5CV, tampón A: 10CV

- 40
- Cargar 50 ml de la muestra por tanda en la columna de 20 ml a 0,5 ml/min (en el flujo pasante hay NRG-156 (EGF-Id))
  - Lavar la columna de 20 ml con 5CV del tampón A

La columna de 20 ml con un gradiente de tampón B hasta el 100% con 5CV. Esto es para eliminar los contaminantes por elución

- 45
- Limpiar con 10CV de tampón B al 100%
  - Equilibrar con 15CV de tampón A
  - Analizar las fracciones con una tinción con plata SDS-PAGE
  - Juntar las fracciones con NRG-156Q (10 kDa)

**F. Concentración de NRG-156 (EGF-Id)**

- 50
- Concentrar con un concentrador de 15 ml Millipore Centriprep 3000 MWCO (Ultracel YM-3, 4320)
  - Usar el ensayo de proteínas de Lowry modificado para determinar la concentración

**G. Eliminación de la etiqueta His**

5 La eliminación de la etiqueta His se realiza con un equipo de reactivos de captura de escisión de trombina de Novagen (nº de catálogo 69022-3). Según pruebas previas, las mejores condiciones son temperatura ambiente durante 4 horas con trombina a 0,005U de enzima por µl por cada 10 µg de proteína NRG-156Q (EGF-I<sub>d</sub>). Después de cuatro horas de incubación, añadir 16 µl de suspensión espesa de agarosa de estreptavidina por unidad de la enzima trombina. Sacudir la muestra durante 30 minutos a temperatura ambiente. Recuperar el NRG-156Q mediante filtrado por centrifugación o filtrado estéril (dependiendo del volumen). La escisión completa se determina con EGF e inmunoelectrotransferencia anti His.

**H. Almacenamiento en el tampón final**

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

**Expresión y purificación de GGF2**

Para la clonación del GGF2 e información de antecedentes de la misma, véase el documento USPN 5.530.109. La línea celular está descrita en el documento USPN 6.051.401. El contenido completo de cada uno de los documentos USPN 5.530.109 y USPN 6.051.401 se incorpora en la presente memoria por referencia en su integridad.

15 **Línea celular CHO-(Alfa2HSG)-GGF:** Esta línea celular se diseñó para producir cantidades suficientes de fetuina (alfa2HSG humana) para soportar tasas elevadas de producción de rhGGF2 en condiciones libres de suero.

20 Células Cho (dhfr-) fueron transfectadas con el vector de expresión que se muestra en la Figura 16 (pSV-AHSG). Las células estables se cultivaron bajo selección de ampicilina. La línea celular fue designada (dhfr/α2HSGP). A continuación, las células dhfr/α2HSGP fueron transfectadas con el vector pCMGGF2 mostrado en la Figura 16 que contenía la secuencia codificante para el GGF2 humano usando el reactivo lípido catiónico DMRIE-C (Life Technologies nº 10459-014).

25 Se obtuvieron líneas celulares estables y de alta producción bajo protocolos estándar usando metotrexato (100 nM, 200 nM, 400 nM, 1 µM) a intervalos de 4-6 semanas. Las células fueron desligadas gradualmente del caldo que contenía suero. Se aislaron clones mediante metodologías de disolución limitante estándar. Los detalles de los requisitos del caldo se encuentran en los informes mencionados anteriormente.

Para mejorar la transcripción, la secuencia de codificación del GGF2 se situó después de la secuencia intermedia de BMLF-1 del VEB (MIS). Véase la Figura 17.

Secuencia MIS (SEQ ID NO: 20)

CGATAACTAGCAGCATTTCTCCAACGAGGATCCCGCAG

(GTAAGAAGCTACACCGGCCAGTGGCCGGGGCC

CGATAACTAGCAGCATTTCTCCAACGAGGATCCCGCAG(GTAAGAAGCTACACCGGCC

AGTGGCCGGGGCC

GTGGAGCCGGGGCCATCCGGTGCCTGAGACAGAGGTGCTCAAGGCAGTCTCCACCTTTT

GTCTCCCTCTGCAG) AGAGCCACATTTCTGGAA] GTT

30 Secuencia codificante del GGF2 (SEQ ID NO: 1) –

## ES 2 664 394 T3

atgagatgg cgacgcgccc cgcgcccgtc cgggcgtccc  
301 ggcccccggg cccagcgcgc cggctccgcc gcccgctcgt cggcccgct gccgctgctg  
361 ccaactactgc tgctgctggg gaccgcggcc ctggcgccgg gggcggcggc cggcaacgag  
421 gcggctcccg cgggggcctc ggtgtgctac tcgtccccgc ccagcgtggg atcggtgag  
481 gagctagctc agcgcgcgcg ggtggtgatc gagggaaaag tgcacccgca gcggcggcag  
541 cagggggcac tcgacaggaa ggcggcggcg gcggcggcg aggcaggggc gtggggcggc  
601 gatcgcgagc cgccagcgcg gggcccacgg gcgctggggc cggcccgca ggagccgctg  
661 ctgcgccca acgggaccgt gccctcttgg cccaccgccc cggtgcccag cgccggcgag  
721 cccggggagg aggcgcctta tctggtgaag gtgcaccagg tgtgggcggg gaaagccggg  
781 ggcttgaaga aggactcgtc gtcaccgtg cgcctgggga cctggggcca cccgccttc  
841 ccctcctgcg ggaggctcaa ggaggacagc aggtacatct tcttcatgga gcccgacgcc  
901 aacagcacca gccgcgcgcg ggccgccttc cgagcctctt tccccctct ggagacgggc  
961 cggaacctca agaaggaggt cagccgggtg ctgtgcaagc ggtgcccctt gcctcccaa  
1021 ttgaaagaga tgaaaagcca ggaatcggct gcaggttcca aactagtcct tcggtgtgaa  
1081 accagttctg aatactcctc tctcagattc aagtggttca agaattggaa tgaattgaat  
1141 cgaaaaaaca aaccacaaa tatcaagata caaaaaaagc caggggaagtc agaacttcgc  
1201 attaacaaag catcactggc tgattctgga gagtatatgt gcaaagtgat cagcaatta  
1261 ggaaatgaca gtgcctctgc caatatcacc atcgtggaat caaacgctac atctacatcc  
1321 accactggga caagccatct tgtaaaatgt gcggagaagg agaaaacttt ctgtgtgaat  
1381 ggaggggagt gcttcatggt gaaagacctt tcaaaccctc cgagatactt gtgcaagtgc  
1441 ccaaatgagt ttactggtga tcgctgccaa aactacgtaa tggccagctt ctacagtacg  
1501 tccactccct ttctgtctct gcctgaatag

## ES 2 664 394 T3

Secuencia proteínica del GGF2 (SEQ ID NO: 2) -

MRWRRAPRRSRGPRGPRAPQRPQSAARSSPPLPLPLLLLLLGTAAAL  
 APGAAAGNEAAPAGASVCYSSPPSVGSGVQELAQRAAVVIEGKVHPQRRQQGALDRKAA  
 AAAGEAGAWGGDREPPAAGPRALGPPAAEPLLAANGTVPSWPTAPVPSAGEPGEEAPY  
 LVKVHVQVWAVKAGGLKKDSSLTVRLGTWGHFPAFPSCGRLKEDSRYIFFMEPDANSTSR  
 APAAFRASFPPLETGRNLKKEVSRVLCKRCALPPQLKEMKSQESAAGSKLVLRCESTSS  
 EYSSLRFKWFKNGNELNRKNKPQNIKIQKKPGKSELRINKASLADSGEYMCKVISKLG  
 NDSASANITIVESNATSTSTTGTSHLVKCAEKEKTFVNGGECFMVKDLSNPSRYLCK  
 CPNEFTGDRCQNYVMASFYSTSTPFLSLPE

5 Producción del GGF2: Se descongeló un vial de GGF2 a  $2,2 \times 10^6$  células/ml en 100 ml de caldo Acorda 1 (véase la Tabla 3) y se expandió hasta alcanzar cantidades suficientes para sembrar los recipientes de producción. Las células se inocularon en el medio de producción caldo Acorda 2 (véase la Tabla 4) a  $1,0 \times 10^5$  células/ml en frascos rotatorios de cultivo de dos litros con ventilación. Los frascos rotatorios de cultivo se mantienen a 37°C durante 5 días y luego se reducen a 27°C durante 26 días. Los frascos rotatorios de cultivo son monitorizados para obtener el recuento de las células y comprobar su aspecto general, pero no son alimentados. Una vez que la viabilidad está por debajo del 10%, las células son centrifugadas y el caldo acondicionado es recogido y filtrado en condiciones estériles.

10

Tabla 3: Caldo 1

| Componente                      | Fabricante | Número de catálogo | Concentración final                                     |
|---------------------------------|------------|--------------------|---|
| CD-CHO                          | Invitrogen | 10743-029          | -retirar 50 ml, luego añadir los componentes que siguen |
| FeSO <sub>4</sub> .EDTA         | Sigma      | F-0518             | 1x (10 ml/L)  |
| L-glutamina                     | Cellgro    | 25-005-CI          | 4 mM (20 ml/L)  |
| Insulina humana recombinante    | Sigma      | I-9278             | 290 U/L (1 ml/L)  |
| Aminoácido no esencial          | Cellgro    | 25-025-CI          | 1x (10 ml/L)  |
| Peptona de soja HySoy de tipo 4 | Sigma      | P0521              | Pulverizada 20x en CD-CHO (50 ml/L)                     |
| Gentamicina                     | Invitrogen | 15750-078          | 100µg (2ml/L)   |

Tabla 4: Caldo 2

| Componente                      | Fabricante | Número de catálogo | Concentración final                 |
|---------------------------------|------------|--------------------|-------------------------------------|
| CD-CHO                          | Invitrogen | 10743-029          | 50% (-50 ml primero)                |
| HyQ SFX-CHO                     | HyClone    | SH30187.02         | 50% (-50 ml primero)                |
| FeSO <sub>4</sub> .EDTA         | Sigma      | F-0518             | 1x (10 ml/L)                        |
| L-glutamina                     | Cellgro    | 25-005-CI          | 4 mM (20 ml/L)                      |
| Insulina humana recombinante    | Sigma      | I-9278             | 290 U/L (1 ml/L)                    |
| Aminoácido no esencial          | Cellgro    | 25-025-CI          | 1x (10 ml/L)                        |
| Peptona de soja HySoy de tipo 4 | Sigma      | P0521              | Pulverizada 20x en CD-CHO (50 ml/L) |
| Gentamicina                     | Invitrogen | 15750-078          | 100µg (2ml/L)                       |

### Protocolo de purificación para el GGF2

Todos los procedimientos se realizan a 4 °C.

15 Productos químicos:

Acetato sódico  
 Ácido acético glacial (para el ajuste del pH)  
 10N NaOH (para el ajuste del pH)

20

NaCl  
 Sulfato sódico  
 L-arginina (JT Baker, nº de catálogo: 2066-06)  
 Manitol (JT Baker, nº de catálogo: 2553-01)

Material de partida: Sobrenadante del caldo acondicionado. Ajustar el pH a 6,5.

**Etapa 1:**

Captura: Cromatografía de intercambio catiónico

- 5 HiPrep SP 16/10 (Amersham Biosciences)  
 Equilibrado de la columna: Tampón A - 5CV, tampón B - 5CV, buffer 15%B - 5CV  
 Tampón A: 20 mM de acetato sódico, pH 6,0  
 Tampón B: 20 mM de acetato sódico, pH 6,0, 1M NaCl

Cargar la muestra a 2 ml/min con una carga continua, si es posible, de un día para otro. La unión es mejor con carga continua.

- 10 Máxima capacidad para una muestra de partida: Caldo de 5 mg GGF2/ml  
 Caudal: 3 ml/min  
 Primer lavado: 15%B, 10CV  
 Segundo lavado: 35% B, 10CV  
 Elución de GGF2: 60%B, 8CV  
 Lavado de la columna: 100%B, 8CV

| Tampones: | Composición                                   | Conductividad | Uso                                     |
|-----------|---|---------------|---|
| 15%B      | 20 mM de acetato sódico, pH 6,0, 150 mM NaCl  |               | Preequilibrado                          |
| 35%B      | 20 mM de acetato sódico, pH 6,0, 350 mM NaCl  |               | Primer lavado                           |
| 60%B      | 20 mM de acetato sódico, pH 6,0, 600 mM NaCl  |               | Segundo lavado                          |
| 100%B     | 20 mM de acetato sódico, pH 6,0, 1000 mM NaCl | 88 mS/cm      | Elución de GGF2<br>Lavado de la columna |

15 **Etapa 2:**

Depuración: Cromatografía de filtración en gel

- 20 Sefacril S200 26/60  
 Tampón de elución: 20 mM de acetato sódico, 100mM de sulfato sódico, 1% de manitol, 10 mM de L-arginina, pH 6,5  
 Conductividad del tampón:  
 Muestra: el repositorio de elución de SP GGF2 se concentra hasta ~ AU280 1,0  
 Caudal: 1,3 ml/min  
 Elución pico: a ~ 0,36CV desde el inicio de la inyección

**Etapa 3:**

- 25 Retirada del ADN y de la endotoxina: Filtrado a través de la membrana Intercept Q.

Tampón de preequilibrado: 20 mM de acetato sódico, 100mM de sulfato sódico, 1% de manitol, 10 mM de L-arginina, pH 6,5  
 Recoger el flujo pasante

**Etapa 4:**

- 30 Formulación final y preparación de muestras

Añadir a la muestra 90 mM de L-arginina adicional  
 Concentrar  
 Filtrar de forma estéril

- 35 El artículo vehicular o de control usado en la presente memoria es albúmina de suero bovino (BSA) al 0,2%, 0,1 M de fosfato sódico, pH 7,6.

En la presente memoria se usan cepas de rata CD@IGS [Cr1:CD@(SD)/MYOINFARCT] y Sprague-Dawley no modificadas. Estas cepas fueron adquiridas en Charles River Laboratories. Los animales de ensayo son de aproximadamente 6-7 semanas de edad a la llegada y pesan aproximadamente 160 - 200 g, en el momento del procedimiento quirúrgico. El intervalo real puede variar y está documentado en los datos.

- 40 Todos los animales Sprague-Dawley no modificados recibidos fueron puestos en el estudio y asignados al Grupo 1. Los animales considerados adecuados para el estudio fueron pesados antes del tratamiento.

Todos los animales CD@IGS [Cr1:CD@(SD)/MYOINFARCT] fueron asignados de manera aleatoria a grupos de tratamiento (Grupos 2 - 5) usando un procedimiento de aleatorización simple basado en la fracción de eyección calculada de exploraciones ecocardiográficas llevadas a cabo el 7º día posterior al procedimiento quirúrgico

realizado en Charles River Laboratories. La aleatorización simple se realizó para dar como resultado que cada grupo de tratamiento (Grupos 2 - 5) consistiera en números aplicables de animales, lo que resulta en una fracción de eyección media del grupo aproximadamente igual ( $\pm 3\%$ ) en los Grupos 2 - 5.

5 Todos los animales de los Grupos 2-6 fueron aclimatados en los Charles River Laboratories según los procedimientos operativos estándar de ese laboratorio. Los animales fueron aleatorizados en grupos de tratamiento. Todos los animales no modificados del Grupo 1 fueron aclimatados aproximadamente 24 horas después de la recepción antes de sus exploraciones ecocardiográficas primarias.

10 Los animales fueron alojados individualmente en jaulas suspendidas de acero inoxidable tipo malla de alambre. En general, no se usaron jaulas de fondo sólido no se usaron en general porque los roedores son coprófagos y la ingestión de heces que contenían artículo de ensayo excretado y productos metabólicos o la ingestión del propio lecho podrían frustrar la interpretación de los resultados en este estudio de toxicidad.

15 Se proporcionó iluminación fluorescente mediante un temporizador automático durante aproximadamente 12 horas por día. En ocasiones, el ciclo de oscuridad se interrumpió intermitentemente debido a actividades relacionadas con el estudio. La temperatura y la humedad fueron monitorizadas y registradas diariamente y se mantuvieron en la máxima medida posible entre 17,8 y 26,1°C y del 30 al 70%, respectivamente.

La dieta basal fue la dieta n° 5002 en bloques certificada para roedores de Lab Diet® de PMI Nutrition International, Inc. Esta dieta estaba disponible *ad libitum*, no ser que se indique lo contrario. Cada número de lote utilizado fue identificado en los registros del estudio. Se suministró agua de grifo *ad libitum* a todos los animales a través de un sistema automático de agua, a no ser que se indique lo contrario.

20 **Diseños del estudio**

Tabla 5: GGF2 en comparación con el fragmento de EGF-Id (Liu et al., 2006)  
Dosificado durante 10 días a partir del 7º día después de la ligadura de la LAD

| Grupo                   | Tratamiento        | Duración en vida | Dosis               | Intervalo de dosificación† | Momentos ECO (post op) |
|-------------------------|--------------------|------------------|---------------------|----------------------------|------------------------|
| 1<br>(n = 5 M; n = 5 H) | Control (vehículo) | 17 días post op  | Únicamente vehículo | 24Hr                       | Días 6, 17             |
| 2<br>(n = 6 M; n = 6 H) | GGF2               | 17 días post     | 0,0625 mg/kg        | 24Hr                       | Días 6, 17             |
| 3<br>(n = 6 M; n = 6 H) | GGF2               | 17 días post     | 0,0625 mg/kg        | 24Hr                       | Días 6, 17             |
| 4<br>(n = 6 M; n = 7 H) | EGF-Id             | 17 días post     | Equimolar           | 24Hr                       | Días 6, 17             |
| 5<br>(n = 7 M; n = 6 H) | EGF-Id             | 17 días post     | Equimolar           | 24Hr                       | Días 6, 17             |

Tabla 6: Dosis de GGF2 mayor en comparación con EGF-Id y EGF-Ig  
Dosificado durante 20 días a partir del 7º día después de la ligadura de la LAD. Reposo farmacológico de 10 días.

| Grupo                   | Tratamiento                                    | Duración en vida             | Dosis               | Intervalo de dosificación† | Momentos ECO (post op) |
|-------------------------|--|------------------------------|---------------------|----------------------------|------------------------|
| 1<br>(n = 5 M; n = 5 H) | N/D: Controles no modificados de la misma edad | 30 días tras la ECO primaria | ND                  | ND                         | ‡Días 1, 12, 22 y 32   |
| 2<br>(n = 6 M; n = 6 H) | Control (vehículo)                             | 38 días post op              | Únicamente vehículo | 24Hr                       | *Días 7, 18, 28 y 38   |
| 3<br>(n = 6 M; n = 6 H) | GGF-2  | 38 días post op              | 0,625 mg/kg         | 24Hr                       | *Días 7, 18, 28 y 38   |
| 4<br>(n = 6 M; n = 7 H) | GGF-2  | 38 días post op              | 3,25 mg/kg          | 24Hr                       | *Días 7, 18, 28 y 38   |
| 5<br>(n = 7 M; n = 6 H) | EGF-Id   | 38 días post op              | Equimolar           | 24Hr                       | *Días 7, 18, 28 y 38   |
| 6<br>(n = 7 M; n = 6 H) | EGF-Ig   | 38 días post op              | Equimolar           | 24Hr                       | *Días 7, 18, 28 y 38   |

Tabla 7: Frecuencia de las dosis de GGF2

| Grupo                   | Tratamiento                                    | Duración en vida             | Dosis               | Intervalo de dosificación† | Momentos ECO (post op) |
|-------------------------|--|------------------------------|---------------------|----------------------------|------------------------|
| 1<br>(n = 5 M; n = 5 H) | N/D: Controles no modificados de la misma edad | 30 días tras la ECO primaria | ND                  | ND                         | ‡Días 1, 12, 22 y 32   |
| 2<br>(n = 6 M; n = 6 H) | Control (vehículo)                             | 38 días post op              | Únicamente vehículo | 24Hr                       | *Días 7, 18, 28 y 38   |
| 3<br>(n = 6 M; n = 6 H) | GGF-2  | 38 días post op              | 3,25 mg/kg          | 24Hr                       | *Días 7, 18, 28 y 38   |
| 4<br>(n = 6 M; n = 7 H) | GGF-2  | 38 días post op              | 3,25 mg/kg          | 48Hr                       | *Días 7, 18, 28 y 38   |
| 5<br>(n = 7 M; n = 6 H) | GGF-2  | 38 días post op              | 3,25 mg/kg          | 96Hr                       | *Días 7, 18, 28 y 38   |

TA 1- Artículo 1 de ensayo; M = machos; H = hembras.

Tabla 8: GGF2 con y sin BSA

| Grupo                   | Tratamiento                                    | Duración en vida | Dosis               | Intervalo de dosificación† | Momentos ECO (post op) |
|-------------------------|--|------------------|---------------------|----------------------------|------------------------|
| 1<br>(n = 5 M; n = 5 H) | N/D: Controles no modificados de la misma edad | 17 días post op  | ND                  | ND                         | Días 6 y 17            |
| 2<br>(n = 6 M; n = 6 H) | Control (vehículo)                             | 17 días post     | Únicamente vehículo | 24Hr                       | Días 6 y 17            |
| 3<br>(n = 6 M; n = 6 H) | GGF-2 + BSA                                    | 17 días post     | 3,25 mg/kg          | 24Hr                       | Días 6 y 17            |
| 4<br>(n = 6 M; n = 7 H) | GGF-2 sin BSA                                  | 17 días post     | 3,25 mg/kg          | 24Hr                       | Días 6 y 17            |

### Administración de los artículos de ensayo y de control

#### 5 Vía de administración

Los artículos de ensayo y de control fueron administrados por inyección intravenosa. Los animales asignados al Grupo 1 no fueron tratados con artículos vehiculares ni de ensayo; estos animales sirvieron como controles de la misma edad sin tratamiento. La frecuencia, la duración y la dosis de administración fueron las descritas en las Tablas 5-8. El volumen de la dosis fue de aproximadamente 1 ml por kg.

#### 10 Administración de los artículos de ensayo

Los artículos de ensayo y control se administraron a través de la vena caudal. Las dosis individuales se basaron en los pesos corporales más recientes. La dosis se administró mediante inyección rápida, a no ser que el responsable del experimento indicara lo contrario.

#### Preparación del sistema del ensayo

#### 15 Procedimiento quirúrgico: Ligadura de la arteria descendente anterior izquierda

Los procedimientos quirúrgicos se realizaron en Charles River Laboratories como se describe en *Surgical Capabilities Reference Paper*, vol. 13, nº 1, 2005, de Charles River Laboratories. Sucintamente, se hace una incisión cráneo-caudal en el pecho, ligeramente a la izquierda del esternón, a través de la piel y los músculos pectorales. Se cortan transversalmente las costillas tercera y cuarta, y se rompen los músculos intercostales diseccionando. Se entra rápidamente en la cavidad torácica y se abre por completo el pericardio. El corazón es extraído a través de la incisión. El cono pulmonar y la aurícula izquierda son identificados. Se usa una pequeña aguja curvada para hacer pasar una sutura de seda 5-0 debajo de la arteria coronaria descendente anterior izquierda. Se practica la ligadura, y se devuelve el corazón al interior del tórax. Se extrae con delicadeza el aire de la cavidad torácica mientras se cierran la pared torácica y la incisión de la piel. El animal es reanimado utilizando ventilación con presión positiva y puesto en un entorno rico en oxígeno.

**Recuperación postoperatoria**

Charles River Laboratories llevó a cabo la monitorización posoperatoria a corto plazo y la administración de analgésicos apropiados según se describe en *Surgical Capabilities Reference Paper*, vol. 13, nº 1, 2005, de Charles River Laboratories.

- 5 Se llevó a cabo una monitorización postoperatoria a largo plazo para evaluar a los animales en busca de signos de dolor o infección. Las observaciones diarias del sitio de incisión continuaron durante 7 días después de la recepción de los animales. Se administraron un tratamiento complementario del dolor y una terapia antimicrobiana cuando fue necesario.

| TABLA 9. MEDICACIONES Y DOSIFICACIONES PROGRAMADAS |  |                      |                      |                      |                        |
|--|--|----------------------|----------------------|----------------------|------------------------|
| FÁRMACO  | INTERVALO, DOSIS Y RUTA                        |                      |                      |                      |                        |
|  | DIARIAMENTE POSTCIRUGÍA                        | ECO EN DÍA 1/7*      | ECO EN DÍA 12/18*    | ECO EN DÍA 22/28*    | ECO y NECROPSIA 32/38* |
| Isoflurano   | -  | Como tal, inhalación | Como tal, inhalación | Como tal, inhalación | Como tal, inhalación   |
| Buprenorfina                                       | 0,01 mg/kg, I.M. (solo en la medida necesaria) | -                    | -                    | -                    | -                      |

- 10 \* El día del procedimiento ECO fue definido por la asignación de los grupos de animales según se indica posteriormente.

**Evaluaciones del estudio ante mortem****Observaciones en jaula**

- 15 Todos los animales fueron observados al menos dos veces al día para comprobar morbilidad, mortalidad, lesiones y disponibilidad de alimentos y agua. Cualquier animal con mala salud fue identificado para un seguimiento adicional y su posible eutanasia.

**Pesos corporales**

Los pesos corporales fueron medidos y registrados al menos una vez antes de la aleatorización y semanalmente durante el estudio.

**Consumo de alimentos**

- 20 No se midió el consumo de alimentos, pero se documentó la inapetencia.

**Exploraciones ecocardiográficas**

- 25 Se realizaron exploraciones ecocardiográficas en todos los animales asignados al Grupo 1 en los días 1, 12, 22 y el día 32 después de la recepción (día 0). Se realizaron exploraciones ecocardiográficas en todos los animales asignados a los Grupos 2 -5 en los días 7, 18, 28 y el día 38, después del procedimiento quirúrgico realizado en Charles River Laboratories (día 0).

Para la exploración ecocardiográfica, cada animal fue anestesiado según la Tabla 5 y su pelo recortado del tórax. Se aplicó gel de acoplamiento al transductor ecocardiográfico y se obtuvo una imagen para medir la función cardiaca en múltiples niveles. Se obtuvieron imágenes para cada animal en una vista en eje corto (a nivel papilar medio, u otro, dependiendo de la ubicación del área de infarto observada mediante ecocardiografía).

- 30 **Parámetros ecocardiográficos**

- 35 Se tomaron imágenes ECO a nivel del músculo papilar medio, u otro, dependiendo de la ubicación del área de infarto observada mediante ecocardiografía, del ventrículo izquierdo. Se grabaron y almacenaron imágenes de modo M y de dos dimensiones en CD y/o MOD. Los parámetros de medición obtenidos con ECO incluyen: grosor de la pared septal intraventricular (diástole); unidades = cm; grosor de la pared septal intraventricular (sístole); unidades = cm; dimensión interna del ventrículo izquierdo (diástole); unidades = cm; dimensión interna del ventrículo izquierdo (sístole); unidades = cm; grosor de la pared papilar del ventrículo izquierdo (diástole); unidades = cm; grosor de la pared papilar del ventrículo izquierdo (sístole); unidades = cm; volumen diastólico final; unidades = mL; volumen sistólico final; unidades = mL; fracción de eyección; documentado como un porcentaje; volumen sistólico; unidades = ml; y acortamiento fraccionario porcentual; documentado como un porcentaje.

- 40

**Eutanasia**

**Moribundidad**

5 Cualquier animal moribundo, definido por un procedimiento operativo estándar de la instalación de ensayo, fue sacrificado por razones humanitarias. Todos los animales sacrificados *in extremis* o encontrados muertos fueron sometidos a una necropsia rutinaria.

**Método de eutanasia**

La eutanasia se realizó mediante inyección de cloruro de potasio saturado en la vena cava seguida de un método aprobado para garantizar la muerte; por ejemplo, exsanguinación.

**Eliminación final**

10 Todos los animales supervivientes integrados en el estudio fueron sacrificados en su necropsia programada o, si fue necesario, sacrificados *in extremis*.

**Resultados**

15 Estudio 1: El tratamiento de ratas con GGF2 a 0,625 mg/kg iv cada día dio como resultado una mejora significativa de la función cardiaca, como se muestra aquí por los cambios en la fracción de eyección y el acortamiento fraccionario. El fragmento EGF-Id no dio como resultado el mismo grado de mejora. Véase la Tabla 5.

Estudio 2: El tratamiento de ratas con GGF2 a 0,625 y 3,25 mg/kg iv cada día dio como resultado una mejora significativa de la función cardiaca, como se muestra aquí por los cambios en la fracción de eyección y el acortamiento fraccionario. También se observaron mejoras significativas en los volúmenes sistólico y diastólico finales durante el periodo de tratamiento. Véase la Tabla 6.

20 Resultados del estudio 3: El tratamiento de ratas con GGF2 3,25 mg/kg iv cada 24, 48 o 96 horas produjo una mejora significativa de la función cardiaca, como se muestra aquí por los cambios en la fracción de eyección y el acortamiento fraccionario. También se observaron mejoras significativas en los volúmenes sistólico y diastólico finales durante el periodo de tratamiento. Véase la Tabla 7.

25 Informes anteriores (Liu et al) han demostrado que se requiere una proteína portadora, tal como la BSA, para una estabilidad y una actividad óptimas de la neuregulina. El GGF2 ha demostrado estabilidad sin proteínas portadoras como la BSA. Este experimento fue diseñado para comprobar si el GGF2 es estable y activo en un régimen terapéutico sin BSA. Después de 10 días de tratamiento, tanto las formulaciones de GGF2 que contenían BSA como las que no contenían BSA dieron como resultado mejoras en la fracción de eyección en comparación con los controles vehiculares similares a las observadas en estudios previos. Por lo tanto, resulta evidente por este estudio que en las formulaciones de GGF2 para el tratamiento de la CHF no se requiere BSA ni otra proteína portadora. Véase la Tabla 8.

Tabla 10: Hallazgos de patología

| Dosificación                      | Hiperplasia de la vaina del nervio (NSH) ciático | NSH mamaria | Cambios en el sitio de la inyección o en la piel | Efectos cardiacos |
|-----------------------------------|--|-------------|--|-------------------|
| S.c. diaria                       | ++   | ++          | ++   | +                 |
| I.v. diaria                       | +  | +           | +  | +/-               |
| I.v. con un intervalo de 48 horas | +/-  | -           | -  | +/--              |
| I.v. con un intervalo de 96 horas | -  | -           | -  | -                 |

++ presentes frecuentemente; + presentes; +/- observados ocasionalmente, - raros o no observados

35 Según se muestra en la Tabla 10, la dosificación intermitente de GGF2 reduce los efectos secundarios asociados con niveles supranormales de GGF2 administrado exógenamente. Los presentes inventores han descubierto que este hallazgo es válido independientemente de si el GGF2 se administra por vía intravenosa o subcutánea.

La hiperplasia y los efectos cardiacos a veces se ven con la dosificación cada dos días. Los inventores no los han visto con una dosificación menos frecuente.

40 En esta solicitud se hace referencia a varias publicaciones y documentos de patente para describir más completamente el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

Lista de secuencias

<110> Acorda Therapeutics, Inc.  
 Caggiano, Anthony  
 Ganguly, Anindita  
 Iaci, Jennifer  
 Parry, Tom

<120> Dosificación terapéutica de una neuregulina o de una subsecuencia de la misma para el tratamiento o la profilaxis de la insuficiencia cardiaca

<130> 43509-514001WO

<140> PCT/US2009/004130  
 <141> 2009-07-17

<150> 61/135171  
 <151> 2008-07-17

<160> 33

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
 <211> 2003  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (31)..(32)  
 <223> n es a, c, g, o t

<400> 1  
 ggaattcctt tttttttttt tttttttctt nntttttttt tgcccttata cctcttcgcc 60  
 tttctgtggt tccatccact tcttccccct cctcctcca taaacaactc tcctaccctt 120  
 gcacccccaa taaataaata aaaggaggag ggcaaggggg gaggaggagg agtggtgctg 180  
 cgaggggaag gaaaagggag gcagcgcgag aagagccggg cagagtccga accgacagcc 240  
 agaagcccgc acgcacctcg caccatgaga tggcgcgcg ccccgcgccg ctccgggcgt 300  
 cccggccccc gggcccagcg ccccggtcc gccgcccgt cgtcgccgc gctgcccgtg 360  
 ctgccactac tgctgctgct ggggaccgcg gccctggcgc cgggggcccg ggcccggcaac 420  
 gaggcggctc ccgcccgggc ctccggtgtc tactcgtccc cgccagcgt gggatcggtg 480  
 caggagctag ctccagcgcg ccggtgtgtg atcgagggaa aggtgcacc gcagcggcgg 540  
 cagcaggggg cactcgacag gaagggcgcg gcggcggcgg gcgagggcag ggcgtggggc 600  
 ggcgatcgcg agccgccagc ccgcccggcc cgggcgctgg ggcccggcgc cgaggagccg 660  
 ctgctcgccg ccaacgggac cgtgccctct tggcccaccg ccccggtgcc cagcggcggc 720  
 gagcccgggg aggaggcggc ctatctggtg aaggtgcacc aggtgtgggc ggtgaaagcc 780  
 gggggcttga agaaggactc gctgctcacc gtgcgcctgc gcgcgccggc cgccttccga 840  
 gcctctttcc ccctctgga gacgggcccg aacctcaaga aggaggtcag ccgggtgctg 900

ES 2 664 394 T3

tgcaagcggg ggccttgcc tcccgaattg aaagagatga aaagccagga atcggctgca 960  
 ggttccaaac tagtccttcg gtgtgaaacc agttctgaat actcctctct cagattcaag 1020  
 tggttcaaga atgggaatga attgaaatga aaaaacaaac cacaaaatat caagatacaa 1080  
 aaaaagccag ggaagtcaga acttcgcatt aacaaagcat cactggctga ttctggagag 1140  
 tatatgtgca aagtgatcag caaattagga aatgacagtg cctctgcca tatcaccatc 1200  
 gtggaatcaa acgctacatc tacatccacc actgggacaa gccatcttgt agggacctgg 1260  
 gggcaccocg ccttcccctc ctgcgggagg ctcaaggagg acagcaggta catcttcttc 1320  
 atggagcccg acgccaacag caccagcaaa tgtgcggaga aggagaaaac tttctgtgtg 1380  
 aatggagggg agtgcttcat ggtgaaagac ctttcaaacc cctcgagata cttgtgcaag 1440  
 tgcccaaatg agtttactgg tgatcgctgc caaaactacg taatggccag cttctacagt 1500  
 acgtccactc cttttctgtc tctgcctgaa taggagcatg ctcaagttgg gctgctttct 1560  
 tgttgctgca tctcccctca gattccaact agagctagat gtgtcttacc agatctaata 1620  
 ttgactgcct ctgcctgtcg catgagaaca ttaacaaaag caattgtatt acttctctcg 1680  
 ttcgcgacta gttggctctg agataactaat aggtgtgtga ggctccggat gtttctggaa 1740  
 ttgatattga atgatgtgat acaaattgat agtcaatatc aagcagtga atatgataat 1800  
 aaaggcattt caaagtctca cttttattga taaaataaaa atcattctac tgaacagtc 1860  
 atcttcttta tacaatgacc acatcctgaa aaggggtgtg ctaagctgta accgatatgc 1920  
 acttgaatg atggtaagtt aattttgatt cagaatgtgt tatttgtcac aaataaacat 1980  
 aataaaagga aaaaaaaaaaaa aaa 2003

<210> 2  
 <211> 406  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 2  
 Met Arg Trp Arg Arg Ala Pro Arg Arg Ser Gly Arg Pro Gly Pro Arg  
 1 5 10 15  
 Ala Gln Arg Pro Gly Ser Ala Ala Arg Ser Ser Pro Pro Leu Pro Leu  
 20 25 30  
 Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Gly Thr Ala Ala Leu Ala Pro Gly Ala  
 35 40 45  
 Ala Ala Gly Asn Glu Ala Ala Pro Ala Gly Ala Ser Val Cys Tyr Ser  
 50 55 60  
 Ser Pro Pro Ser Val Gly Ser Val Gln Glu Leu Ala Gln Arg Ala Ala  
 65 70 75 80

ES 2 664 394 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 664 394 T3

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

Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser  
 355 360 365

Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp  
 370 375 380

Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro  
 385 390 395 400

Phe Leu Ser Leu Pro Glu  
 405

<210> 3  
 <211> 198  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 3  
 agccatcttg tcaagtgtgc agagaaggag aaaactttct gtgtgaatgg aggcgagtgc 60  
 ttcattggtga aagacctttc aaatccctca agatacttgt gcaagtgcc aaatgagttt 120  
 actggtgatc gctgccaaaa ctacgtaatg gccagcttct acagtacgtc cactcccttt 180  
 ctgtctctgc ctgaatag 198

<210> 4  
 <211> 65  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10

<400> 4  
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn  
 1 5 10 15

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

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

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

Glu  
 65

15

<210> 5  
 <211> 192  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

ES 2 664 394 T3

<400> 5  
agccatcttg tcaagtgtgc agagaaggag aaaactttct gtgtgaatgg aggcgagtgc 60  
ttcatggatga aagacctttc aaatccctca agatacttgt gcaagtgccca acctggatcc 120  
actggagcga gatgtactga gaatgtgccc atgaaagtcc aaaccaaga aaaagcggag 180  
gagctctact aa 192

<210> 6  
<211> 63  
5 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 6  
Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn  
1 5 10 15  
Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr  
20 25 30  
Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn  
35 40 45  
Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Ala Glu Glu Leu Tyr  
50 55 60

10 <210> 7  
<211> 183  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 7  
agccatcttg tcaagtgtgc agagaaggag aaaactttct gtgtgaatgg aggcgagtgc 60  
ttcatggatga aagacctttc aaatccctca agatacttgt gcaagtgccca aaatgagttt 120  
actggtgatc gctgccaaaa ctacgtaatg gccagcttct acaaagcggg ggagctctac 180  
taa 183

15 <210> 8  
<211> 60  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 8  
Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn  
1 5 10 15  
Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr  
20 25 30  
Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr  
35 40 45  
Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr  
50 55 60

25 <210> 9  
<211> 210  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

ES 2 664 394 T3

<400> 9  
agccatcttg tcaagtgtgc agagaaggag aaaactttct gtgtgaatgg aggcgagtgc 60  
ttcatgggga aagacctttc aaatccctca agatacttgt gcaagtgcc aaatgagttt 120  
actggtgatc gctgccaaaa ctacgtaatg gccagcttct acaagcatct tgggattgaa 180  
tttatggaga aagcggagga gctctactaa 210

5 <210> 10  
<211> 69  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

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

Ala Glu Glu Leu Tyr  
65

10 <210> 11  
<211> 267  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 11  
agccatcttg tcaagtgtgc agagaaggag aaaactttct gtgtgaatgg aggcgagtgc 60  
ttcatgggga aagacctttc aaatccctca agatacttgt gcaagtgcc accctggattc 120  
actggagcga gatgtactga gaatgtgccc atgaaagtcc aaacccaaga aaagtgccca 180  
aatgagttta ctggtgatcg ctgccaaaac tacgtaatgg ccagcttcta cagtacgtcc 240  
actccctttc tgtctctgcc tgaatag 267

15 <210> 12  
<211> 88  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

ES 2 664 394 T3

<400> 12

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

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

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

Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr  
50 55 60

Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser  
65 70 75 80

Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu  
85

<210> 13

<211> 252

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

agccatcttg tcaagtgtgc agagaaggag aaaactttct gtgtgaatgg aggcgagtgc 60

ttcatgggtga aagacctttc aaatccctca agatacttgt gcaagtgccca acctggattc 120

actggagcga gatgtactga gaatgtgccc atgaaagtcc aaaccaaga aaagtgccca 180

aatgagttta ctggtgatcg ctgccaaaac tacgtaatgg ccagcttcta caaagcggag 240

gagctctact aa 252

<210> 14

<211> 83

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

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

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

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

Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr  
50 55 60

Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu  
65 70 75 80

Glu Leu Tyr

<210> 15

<211> 498

5

10

15

ES 2 664 394 T3

<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<400> 15  
 catatgttgc ctccccaatt gaaagagatg aaaagccagg aatcggctgc aggttccaaa 60  
 ctagtcccttc ggtgtgaaac cagttctgaa tactcctctc tcagattcaa gtggttcaag 120  
 aatgggaatg aattgaatcg aaaaaacaaa ccacaaaata tcaagataca aaaaaagcca 180  
 gggaagtcat aacttcgcat taacaaagca tcactggctg attctggaga gtatatgtgc 240  
 aaagtgatca gcaaattagg aatgacagt gcctctgccca atatcaccat cgtggaatca 300  
 aacgctacat ctacatccac cactgggaca agccatcttg taaaatgtgc ggagaaggag 360  
 aaaactttct gtgtgaatgg aggggagtgc ttcatgggtga aagacctttc aaaccctcgc 420  
 agatacttgt gcaagtgcc ccaatgagttt actggtgatc gctgccaaaa ctacgtaatg 480  
 gccagcttct acggatcc 498

5 <210> 16  
<211> 162  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 16  
 Leu Pro Pro Gln Leu Lys Glu Met Lys Ser Gln Glu Ser Ala Ala Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser Ser Leu  
 20 25 30  
 Arg Phe Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu Asn Arg Lys Asn Lys  
 35 40 45  
 Pro Gln Asn Ile Lys Ile Gln Lys Lys Pro Gly Lys Ser Glu Leu Arg  
 50 55 60  
 10 Ile Asn Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys Lys Val  
 65 70 75 80  
 Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr Ile Val  
 85 90 95  
 Glu Ser Asn Ala Thr Ser Thr Ser Thr Thr Gly Thr Ser His Leu Val  
 100 105 110  
 Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys  
 115 120 125  
 Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys  
 130 135 140  
 Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser  
 145 150 155 160  
 Phe Tyr

ES 2 664 394 T3

<210> 17  
 <211> 199  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5 <400> 17  
 Met Gly Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr  
 1 5 10 15  
 Gly Gly Thr Ala Asn Gly Val Gly Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys  
 20 25 30  
 Val Pro Gly Ser Leu Pro Pro Gln Leu Lys Glu Met Lys Ser Gln Glu  
 35 40 45  
 Ser Ala Ala Gly Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser Ser Glu  
 50 55 60  
 Tyr Ser Ser Leu Arg Phe Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu Asn  
 65 70 75 80  
 Arg Lys Asn Lys Pro Gln Asn Ile Lys Ile Gln Lys Lys Pro Gly Lys  
 85 90 95  
 Ser Glu Leu Arg Ile Asn Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr  
 100 105 110  
 Met Cys Lys Val Ile Ser Lys Leu Glu Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn  
 115 120 125  
 Ile Thr Ile Val Glu Ser Asn Ala Thr Ser Thr Ser Thr Gly Thr  
 130 135 140  
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Glu Lys Thr Phe Cys Val  
 145 150 155 160  
 Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg  
 165 170 175  
 Tyr Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn  
 180 185 190  
 Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr  
 195

10 <210> 18  
 <211> 198  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 18  
 catatgagcc atcttgtaaa atgtgcgag aaggagaaaa ctttctgtgt gaatggaggg 60  
 gagtgttca tggtgaaaga ctttcaaac ccctcgagat acttgtgcaa gtgcccaaat 120  
 gagtttactg gtgatcgctg ccaaaactac gtaatggcca gcttctacaa ggcggaggag 180  
 ctgtaccagt aaggatcc 198

ES 2 664 394 T3

<210> 19  
 <211> 82  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5 <400> 19  
 Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro  
 1 5 10 15  
 Arg Gly Ser His Met Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys  
 20 25 30  
 Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser  
 35 40 45  
 Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp  
 50 55 60  
 Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu  
 65 70 75 80  
 Tyr Gln

<210> 20  
 <211> 236  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

10 <220>  
 <223> MIS Sequence  
 <400> 20  
 cgataactag cagcatttcc tccaacgagg atcccgcagg taagaagcta caccggccag 60  
 tggccggggc ccgataacta gcagcatttc ctccaaccag gatcccgcag gtaagaagct 120  
 acaccggcca gtggccgggg ccgtggagcc gggggcatcc ggtgcctgag acagaggtgc 180  
 tcaaggcagt ctccaccttt tgtctcccct ctgcagagag ccacattctg gaagtt 236

15 <210> 21  
 <211> 60  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 21  
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn  
 1 5 10 15  
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr  
 20 25 30  
 Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr  
 35 40 45  
 Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr  
 50 55 60

20 <210> 22  
 <211> 61  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

ES 2 664 394 T3

<400> 22

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

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

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

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

<210> 23

<211> 1269

5 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

```

atgagatggc gacgcgcccc gcgcccctcc gggcgtcccg gcccccgggc ccagcgcgcc 60
ggctccgcgcg cccgctcgtc gccgcccgtg ccgctgctgc cactactgct gctgctgggg 120
accgcggccc tggcgcgggg gcgcccggcc ggcaacgagg cggctcccgc gggggcctcg 180
gtgtgctact cgtccccgcc cagcgtggga tcggtgcagg agctagctca gcgcgcgcgcg 240
gtggtgatcg agggaaaggt gcacccgagc cggcggcagc agggggcact cgacaggaag 300
gcggcggcgg cggcggggcg ggagggggcg tggggcggcg atcgcgagcc gccagccgcg 360
ggcccacggg cgctggggcc gcccgccgag gagccgctgc tcgccgcaa cgggaccgtg 420
ccctcttggc ccaccgcccc ggtgccccagc gcggcgagc cgggggagga ggcgccctat 480
ctggtgaagg tgcaccaggt gtgggcggtg aaagccgggg gcttgaagaa ggactcgtg 540
ctcaccgtgc gcctggggac ctggggccac cccgccttcc cctcctgcg gaggctcaag 600
gaggacagca ggtacatctt cttcatggag ccgacgcca acagcaccag ccgcgcgcgcg 660
gccgccttcc gagcctcttt cccccctctg gagacgggcc ggaacctcaa gaaggaggtc 720
agccgggtgc tgtgcaagcg gtgccccttg cctcccctaat tgaaagagat gaaaagccag 780
gaatcggtc caggttcaa actagtcctt cgggtgtgaaa ccagttctga atactcctct 840
ctcagattca agtggttcaa gaatgggaat gaattgaatc gaaaaaacia accacaaaat 900
atcaagatac aaaaaagcc aggaagtca gaacttcgca ttaacaaagc atcactggct 960
gattctggag agtatatgtg caaagtgatc agcaaattag gaaatgacag tgcctctgcc 1020
aatatcacca tcgtggaatc aaacgctaca tctacatcca cactggggac aagccatctt 1080
gtaaaatgtg cggagaagga gaaaactttc tgtgtgaaat gaggggagtg cttcatggtg 1140
aaagaccttt caaacccctc gagatacttg tgcaagtgcc caaatgagtt tactggtgat 1200
cgctgcaaaa actacgtaat ggcagcttc tacagtacgt ccaactccctt tctgtctctg 1260
cctgaatag 1269

```

<210> 24

<211> 422

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 664 394 T3

<400> 24

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 664 394 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Leu Ser Leu Pro Glu  
 420

5 <210> 25  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 25  
 Val Cys Leu Leu Thr Val Ala Ala Leu Pro Pro  
 1 5 10

10 <210> 26  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 26  
 Ala Ser Pro Val Ser Val Gly Ser Val Gln Glu Leu Val Gln Arg  
 1 5 10 15

15 <210> 27  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20 <400> 27  
 Trp Phe Val Val Ile Glu Gly Lys  
 1 5

<210> 28  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 28

<210> 29  
 <211> 5  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (4)..(4)  
 10 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 29  
**Asp Leu Leu Xaa Val**  
 1 5

<210> 30  
 <211> 13  
 15 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (12)..(12)  
 20 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 30  
**Leu Gly Ala Trp Gly Pro Pro Ala Phe Pro Val Xaa Tyr**  
 1 5 10

<210> 31  
 <211> 13  
 25 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (10)..(10)  
 30 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 31  
**Tyr Ile Phe Phe Met Glu Pro Ala Ala Xaa Ser Ser Gly**  
 1 5 10

<210> 32  
 <211> 4  
 35 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 32  
**Leu Val Leu Arg**  
 1

<210> 33  
 <211> 13  
 40 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> característica\_misc  
 <222> (12)..(12)  
 45 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 33  
**Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Met Xaa Lys**  
 1 5 10

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un péptido que comprende un dominio de tipo factor de crecimiento epidérmico (de tipo EGF) del factor de crecimiento glial humano 2 (GGF2), en el que el péptido es GGF2, para ser usado en el tratamiento o la prevención de la insuficiencia cardíaca en un mamífero administrando una cantidad terapéuticamente eficaz a intervalos de al menos 96 horas.
2. El péptido para ser usado según la reivindicación 1 en el que dicha administración se lleva a cabo cada 96 horas.
3. El péptido para ser usado según la reivindicación 1 en el que dicha administración se lleva a cabo cada 14 días.
- 10 4. El péptido para ser usado según la reivindicación 1 en el que dicha administración se lleva a cabo según una posología seleccionada entre el grupo constituido por cada: cuatro días, semana, 10 días, 14 días, mes, dos meses, tres meses o cuatro meses.
5. El péptido para ser usado según la reivindicación 1 en el que dicho mamífero es un ser humano.
6. El péptido para ser usado según la reivindicación 1 en el que dicho péptido es GGF2 humano recombinante.
- 15 7. El uso de un péptido que comprende un dominio de tipo factor de crecimiento epidérmico (de tipo EGF), en el que el péptido es GGF2, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de la insuficiencia cardíaca en un mamífero administrando una cantidad terapéuticamente eficaz a intervalos de al menos 96 horas.

Figura 1

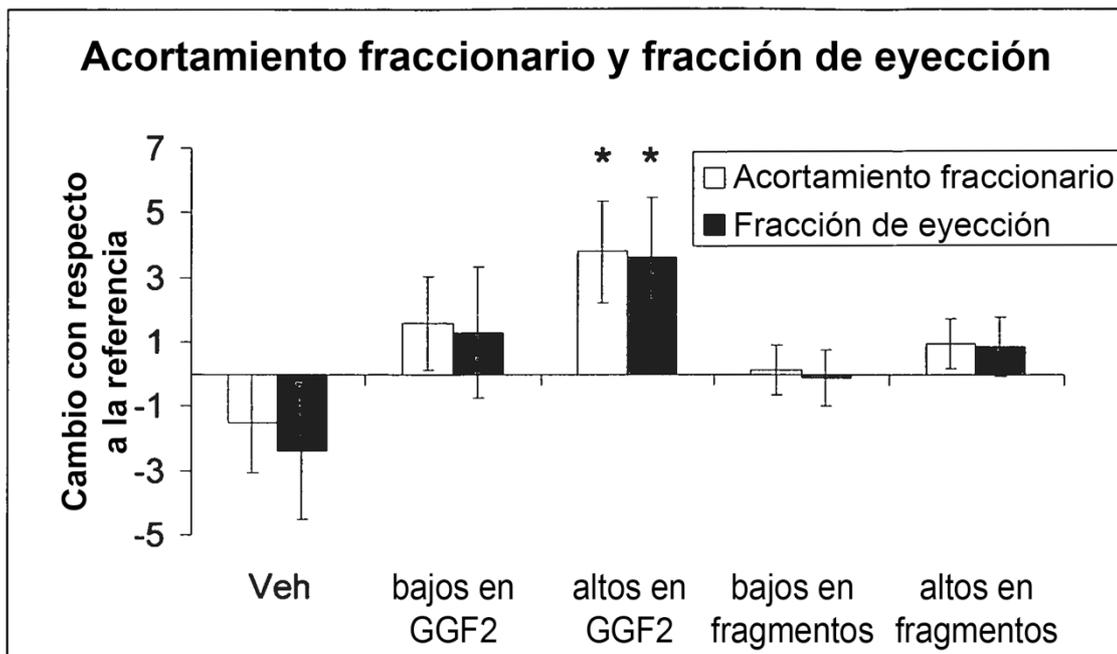


Figura 2

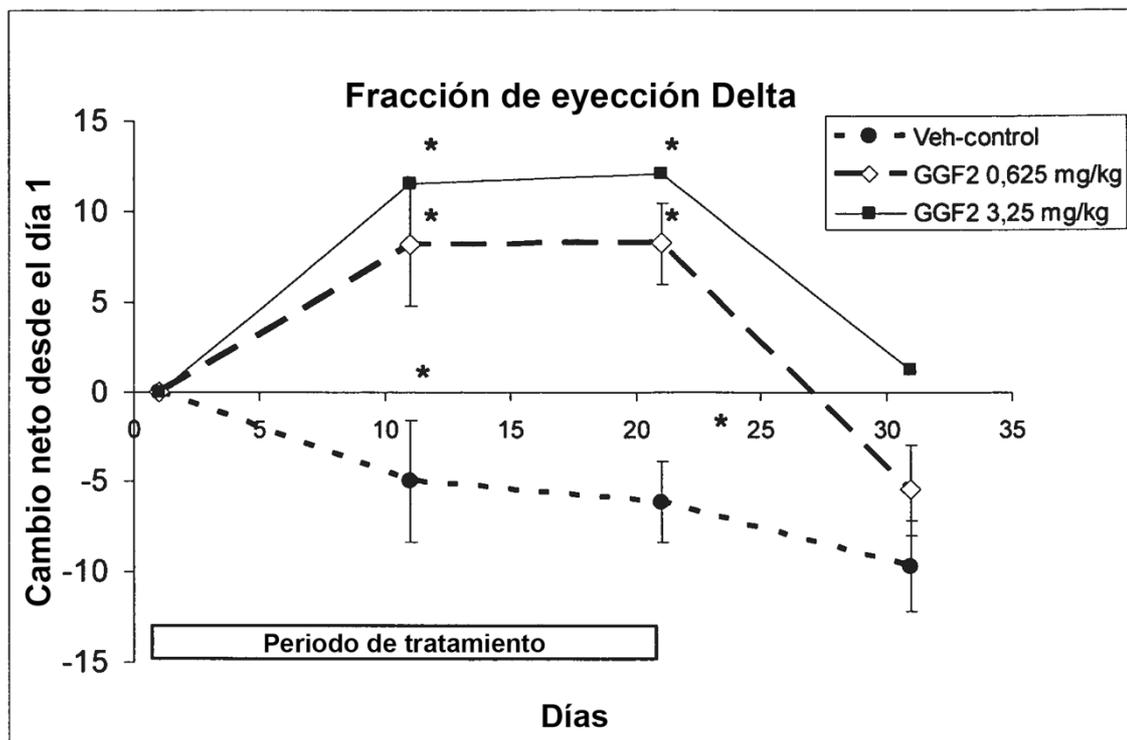


Figura 3

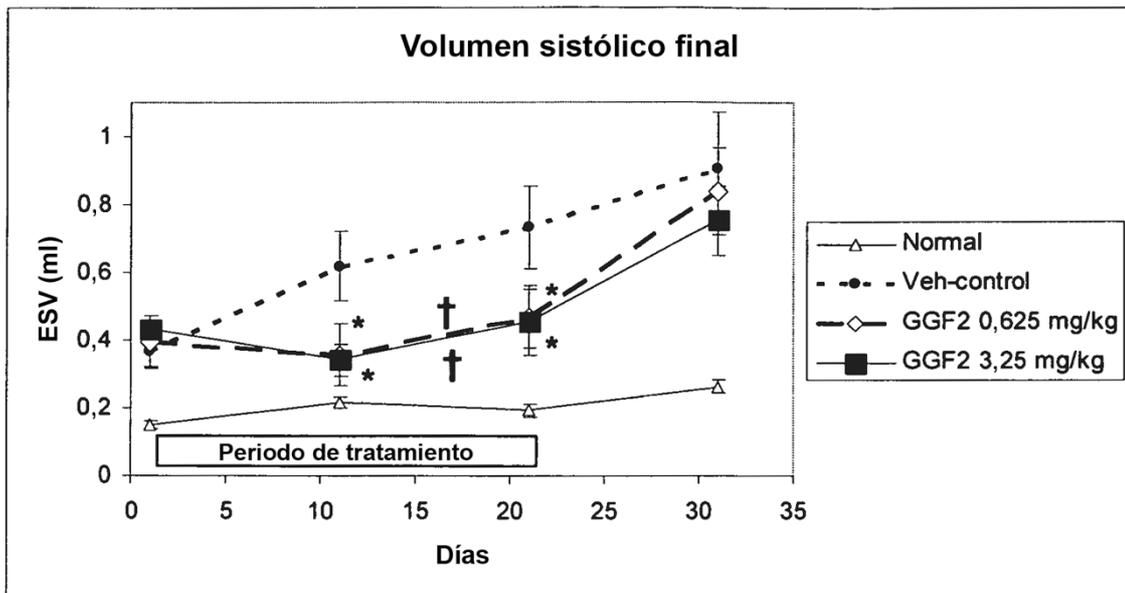


Figura 4

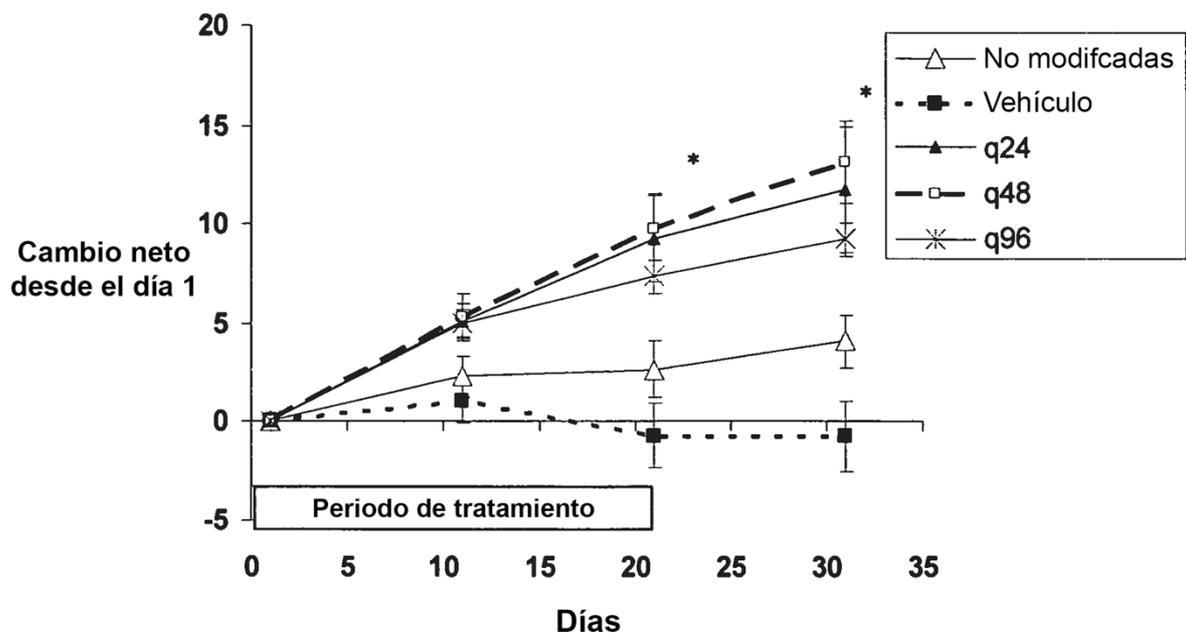


Figura 5

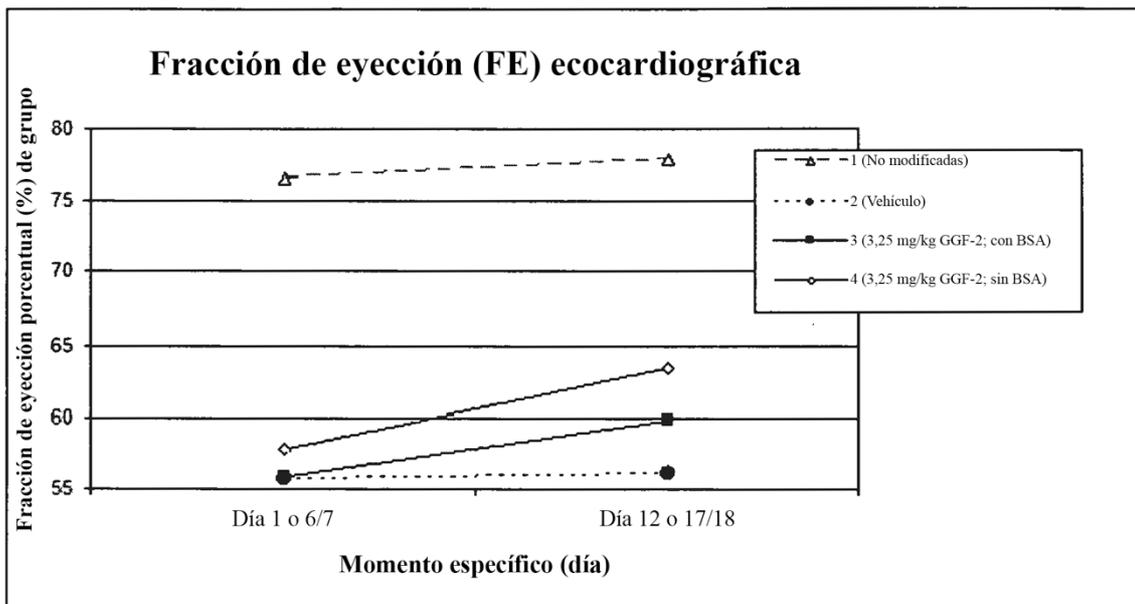


Figura 6

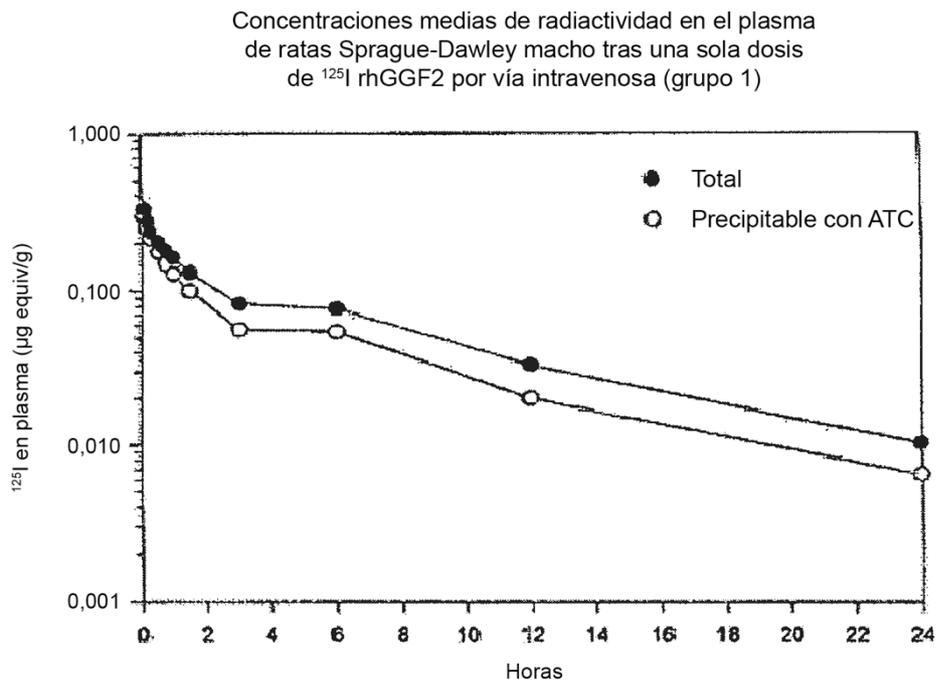
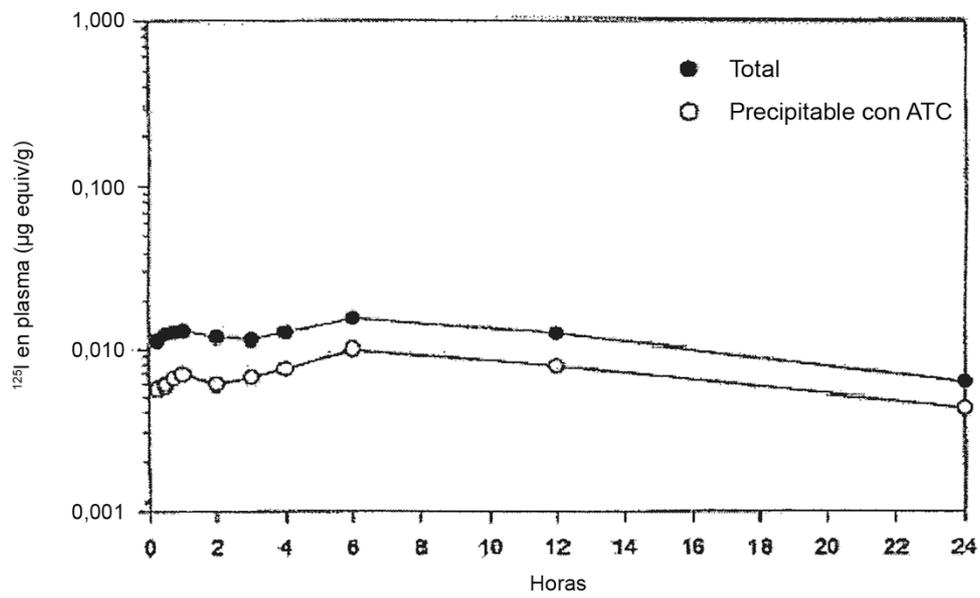


Figura 7

Concentraciones medias de radiactividad en el plasma de una rata Sprague-Dawley macho tras una sola dosis de  $^{125}\text{I}$  rhGGF2 por vía intravenosa (grupo 2)



## Figura 8A

## Secuencia de nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos de GGF2HBS5

|  |     |
|--|-----|
| GGAATTCCCTT TTTTTTTTTT TTTTTTCTTT NNTTTTTTTT TGCCCTTATA CCTCTTCGCC | 60  |
| TTTCTGTGGT TCCATCCACT TCCTCCCCCT CCTCTCCCA TAAACAATC TCCTACCCCT    | 120 |
| GCACCCCAA TAAATAATA AAAGGAGGAG GGCAAGGGG GAGGAGGAG AGTGGTGTG       | 180 |
| CGAGGGGAG GAAAAGGAG GCAGCGGAG AAGAGCCGG CAGAGTCCGA ACCGACAGCC      | 240 |
| AGAAGCCCGC ACGCACCTCG CACC ATG AGA TGG CGA CGC GCC CCG CGC CGC     | 291 |
| Met Arg Trp Arg Arg Ala Pro Arg Arg                                |     |
| TCC GGG CGT CCC GGC CCC CGG GCC CAG CGC CCC GGC TCC GCC GCC CGC    | 339 |
| Ser Gly Arg Pro Gly Pro Arg Ala Gln Arg Pro Gly Ser Ala Ala Arg    |     |
| TCG TCG CCG CCG CTG CCG CTA CTG CTG CTG CTG CTG GGG ACC            | 387 |
| Ser Ser Pro Pro Leu Pro Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Thr            |     |
| Val Cys Leu Leu Thr Val  |     |
| GGF-II 09  |     |
| GCG GCC CTG GCG CCG GGG GCG GCC GGC AAC GAG GCG GCT CCC GCG        | 435 |
| Ala Ala Leu Ala Pro Gly Ala Ala Ala Gly Asn Glu Ala Ala Pro Ala    |     |
| Ala Ala Leu Pro  |     |
| GGG GCC TCG GTG TGC TAC TCG TCC CCG CCC AGC GTG GGA TCG GTG CAG    | 483 |
| Gly Ala Ser Val Cys Tyr Ser Ser Pro Pro Ser Val Gly Ser Val Gln    |     |
| Ala Ser Pro Val Ser Val Gly Ser Val Gln                            |     |
| GGF-II 08  |     |
| GAG CTA GCT CAG CGC GCC GCC GTG ATC GAG GGA AAG GTG CAC CCG        | 531 |
| Glu Leu Ala Gln Arg Ala Ala Val Val Ile Glu Gly Lys Val His Pro    |     |
| Glu Leu Val Gln Arg Trp Phe Val Val Ile Glu Gly Lys                |     |
| GGF-II 04  |     |

## Figura 8B

## Secuencia de nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos de GGF2HBS5

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

**Figura 8C**

**Secuencia de nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos de GGF2HBS5**

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

## Figura 8D

### Secuencia de nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos de GGF2HBS5

|  |      |
|--|------|
| AAA TGT GCG GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT GGA GGG GAG TGC<br>Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Glu Cys     | 1395 |
| TTC ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAC CCC TCG AGA TAC TTG TGC AAG TGC<br>Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys | 1443 |
| CCA AAT GAG TTT ACT GGT GAT CGC TGC CAA AAC TAC GTA ATG GCC AGC<br>Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser | 1491 |
| TTC TAC AGT ACG TCC ACT CCC TTT CTG TCT CTG CCT GAA<br>Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu                         | 1530 |
| TAGGAGCATG CTCAGTTGGT GCTGCTTTCT TGTGCTGCA TCTCCCCTCA GATTCCACCT   | 1590 |
| AGAGCTAGAT GTGTCTTACC AGATCTAATA TTGACTGCCT CTGCCCTGTCG CATGAGAACA   | 1650 |
| TTAACAAAAAG CAATTGTATT ACTTCCCTCG TTCGGGACTA GTTGGCTCTG AGATACTAAT   | 1710 |
| AGGTGTGTGA GGCTCCGGAT GTTTCTGGAA TTGATATTGA ATGATGTGAT ACAAAATTGAT   | 1770 |
| AGTCAATATC AAGCAGTGAA ATATGATAAT AAAGGCATTT CAAAGTCTCA CTTTTATTGA  | 1830 |
| TAAAAATAAAA ATCATTCTAC TGAACAGTCC ATCTTCTTTA TACAATGACC ACATCCTGAA   | 1890 |
| AAGGGTGTG CTAAGCTGTA ACCGATATGC ACTTGAAAATG ATGGTAAGTT AATTTTGATT  | 1950 |
| CAGAAATGTGT TATTTGTCAC AAATAAACAT AATAAAAGGA AAAAAAAAA AAA   | 2003 |

**Figura 9****EGFL1**

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

**Figura 10**

**EGFL2**

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

**Figura 11****EGFL3**

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

## Figura 12

## EGFL4

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

Figura 13

**EGFL5**

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

## Figura 14

## EGFL6

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

**Figura 15**

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

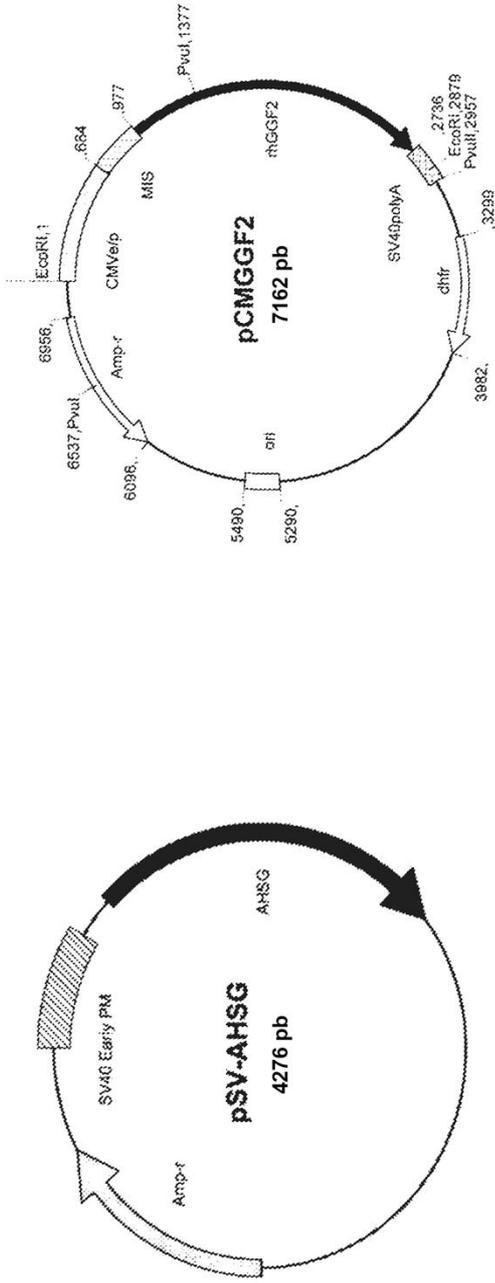


Figura 16

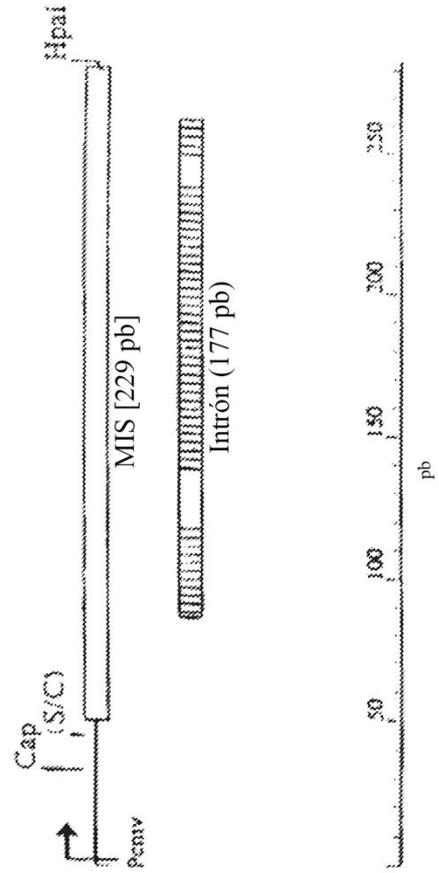


Figura 17