

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 644**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 38/18** (2006.01)

**G01N 33/573** (2006.01)

**A61P 1/00** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.08.2012 PCT/US2012/050970**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.02.2013 WO13025817**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.08.2012 E 12824129 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019 EP 2744512**

54 Título: **Uso de neuregulina-4 para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal y la enterocolitis necrotizante**

30 Prioridad:

**15.08.2011 US 201161523733 P**

**18.10.2011 US 201161548645 P**

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

**03.03.2020**

73 Titular/es:

**CHILDREN'S HOSPITAL LOS ANGELES (100.0%)  
4650 Sunset Boulevard, MS No.84  
Los Angeles, California 90027, US**

72 Inventor/es:

**FREY, MARK R.**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 745 644 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

Uso de neuregulina-4 para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal y la enterocolitis necrotizante

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La invención proporciona métodos para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal y la enterocolitis necrotizante en un sujeto que lo necesite usando activadores del ErbB4. La invención es como se describe en las reivindicaciones.

10

## ANTECEDENTES

[0002] El ErbB4 es el miembro menos conocido de la familia de los receptores de tirosina quinasas que también incluye el receptor de EGF (EGFR/ErbB1), ErbB2/HER2 y ErbB3 (Wieduwilt, M. J. y Moasser, M. M. (2008) Cellular and molecular life sciences: CMLS 65, 1566-1584) Los ErbB reconocen y se activan mediante un conjunto de ligandos que incluyen el factor de tipo EGF que se une a heparina (HB-EGF), betacelulina y la familia heregulina/neuregulina (Wilson, K. J., Gilmore, J. L., Foley, J., Lemmon, M. A. y Riese, D. J., 2nd. (2009) Pharmacology & therapeutics 122, 1-8). La unión del ligando está asociada con la dimerización del receptor, el aumento de la actividad de la tirosina quinasa y la autofosforilación en los residuos de tirosina del extremo C-terminal, que luego proporcionan sitios de acoplamiento para los efectores *downstream* (Bublil, E. M. y Yarden, Y. (2007) Current opinion in cell biology 19, 124-134) Los diferentes ligandos muestran especificidades y afinidades distintas para diferentes receptores ErbB, y estimulan diversos patrones de dimerización, señalización y respuestas celulares (Saito, T., Okada, S., Ohshima, K., Yamada, E., Sato, M., Uehara, Y., Shimizu, H., Pessin, JE y Mori, M. (2004) Endocrinology 145, 4232-4243; Sweeney, C., Lai, C., Riese, D. J., 2nd, Diamonti, A. J., Cantley, L. C., y Carraway, K. L., 3rd. (2000) J Biol Chem 275, 19803-19807).

25

[0003] El ErbB4 tiene varias características que lo distinguen de otras tirosina quinasas, lo que lo convierte en una diana única tanto en términos de señalización como de papel potencial en la enfermedad humana. Puede unir factores de crecimiento de heregulina/neuregulina y un subconjunto de factores de la familia EGF (Jones, J. T., Akita, R. W. y Sliwkowski, M. X. (1999) FEBS letters 447, 227-231), pero al menos un ligando peptídico -NRG4- es exclusivo de ErbB4 y no se une a ErbB1-3 (Harari, D., Tzahar, E., Romano, J., Shelly, M., Pierce, J. H., Andrews, G. C. y Yarden, Y. (1999) Oncogene 18, 2681-2689) Además, el ErbB4 se asocia con un conjunto divergente de dianas que contienen SH2 y más restringido que EGFR, ErbB2 o ErbB3 (Kaushansky, A., Gordus, A., Budnik, B. A., Lane, W. S., Rush, J. y MacBeath, G. (2008) Chem Biol 15, 808-817). Por lo tanto, la activación selectiva de ErbB4 con NRG4 puede provocar diferentes resultados celulares que la estimulación con otras moléculas de la familia EGF o heregulina.

[0004] El ErbB4 es inducido en las células epiteliales del colon por las citocinas inflamatorias, y está presente en niveles elevados en la mucosa colónica inflamada de los pacientes con EII (Frey, M. R., Edelblum, K. L., Mullane, M. T., Liang, D. y Polk, D. B. (2009) Gastroenterology 136, 217-226). Esto parece ser una respuesta protectora compensatoria más que un proceso patológico, ya que la sobreexpresión ectópica de ErbB4 protege a las células epiteliales de colon de ratón cultivadas de la apoptosis inducida por citocinas de una manera dependiente de los ligandos (Frey, M. R., Edelblum, K. L., Mullane, M. T., Liang, D. y Polk, D. B. (2009) Gastroenterology 136, 217-226; Hilliard, V. C., Frey, M. R., Dempsey, P. J., Peek, R. M., Jr. y Polk, D. B. (2011) American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology 301, G338-346; Frey, M. R., Hilliard, V. C., Mullane, M. T. y Polk, D. B. (2010) Laboratory Investigation 90, 1415-1424) Sin embargo, estos estudios, como la mayoría de las investigaciones sobre la función del ErbB4, utilizaron los ligandos de ErbB compartidos heregulina (HRG)-1 $\beta$  o HB-EGF, lo que plantea la cuestión de la especificidad de la señal.

[0005] La enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, conocidas colectivamente como EII, en conjunto afectan a más de 1,4 millones de pacientes estadounidenses (Strober, W., Fuss, I. y Mannon, P. (2007) J Clin Invest 117, 514-521). Las causas y curas de la EII quedan por determinar, pero está claro que una característica general de la patología de estos trastornos es la elevada apoptosis en el epitelio intestinal (Qiu, W., Wu, B., Wang, X., Buchanan, M. E., Regueiro, M. D., Hartman, D. J., Schoen, R. E., Yu, J., y Zhang, L. (2011) J Clin Invest 121, 1722-1732; Di Sabatino, A., Ciccocioppo, R., Luinetti, O., Ricevuti, L., Morera, R., Cifone, M. G., Solcia, E., y Corazza, G. R. (2003) Diseases of the colon and rectum 46, 1498-15077), impulsada por citocinas inflamatorias como TNF e IFN- $\gamma$ . Por lo tanto, la identificación de las vías de transducción de señales que protegen las células epiteliales del colon de la apoptosis inducida por citocinas o lesiones conducirá a nuevos métodos para controlar los brotes de las enfermedades.

60

[0006] Las terapias actuales para la enfermedad inflamatoria intestinal incluyen terapias anti-TNF y antiinflamatorios esteroideos y generalmente están destinadas a interrumpir la inflamación en lugar de estimular específicamente la curación de la mucosa. Estas terapias han demostrado tener una efectividad limitada. En la presente invención, el inventor propone terapias alternativas para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal.

65

[0007] La enterocolitis necrotizante es una enfermedad en la que partes del intestino sufren necrosis tisular. Es predominante en los bebés prematuros, en donde el momento de su aparición es, por lo general, inversamente

proporcional a la edad gestacional del bebé al nacer. Los tratamientos actuales incluyen el uso de un catéter IV para proporcionar nutrientes, terapia con antibióticos para tratar infecciones, cirugía, etc. En este caso, el inventor proporciona una terapia alternativa para tratar la enterocolitis necrotizante.

## 5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0008]

10 La Figura 1 muestra que (A) ErbB4 y NRG4 se expresan en todo el tracto intestinal y que (B) NRG4 bloquea la apoptosis inducida por citocinas en células epiteliales de colon cultivadas

La Figura 2 representa que ErbB4, pero no ErbB1-3, es estimulado por NRG4 en los colonocitos.

15 La Figura 3 muestra que NRG4 bloquea la apoptosis inducida por citocinas *in vivo*. Se inyectó intraperitonealmente TNF (250 µg/kg) más IFN-γ (250 unidades/g) a ratones, con o sin NRG4 (100 µg/kg). Después de 24 h, se extirparon los colonos. La apoptosis se evaluó mediante (A, B) transferencia Western Blot para detectar caspasa-3 escindida en raspados de la mucosa (el gráfico de B es la cuantificación de las transferencias de 4 ratones por enfermedad) y (C, D) tinción ISOL (las imágenes de C muestran células marcadas representativas) en secciones de tejido fijado impregnadas en parafina.

20 La Figura 4 representa que NRG4 no estimula la proliferación o migración de colonocitos. (A) A las células epiteliales de colon de ratones adultos jóvenes que expresaban ErbB4 (células YAMC-B4) se les dio NRG4 o factor de crecimiento epidérmico (EGF, control positivo para la estimulación celular) durante 24 h, y luego se marcaron con EdU para determinar el índice proliferativo. El gráfico representa los resultados de 3 experimentos independientes. \*, p<0,01 vs. todas las otras columnas. (B) Secciones de colon fijadas de ratones inyectados con PBS o NRG4 se inmunotintaron para detectar el marcador proliferativo Ki-67, y se contó el número de células marcadas por cripta. Los puntos de datos son células/cripta promedio en ratones individuales. (C) Las células YAMC-B4 se sometieron a un ensayo de migración/restitución de 8 h en presencia de NRG4 o EGF. \*, p<0,01 vs. todas las otras columnas. (D) El EINRG4 exógeno es protector en la colitis aguda inducida por DSS.

25 La Figura 5 representa que la fosforilación de Akt es estimulada por NRG4 *in vitro* e *in vivo*. (A) Se estimularon células YAMC-B4 con NRG4 durante 10' y se prepararon lisados de células enteras. (B) A los ratones se les inyectó NRG4 con o sin TNF + IFN-γ; después de 24 h se prepararon homogeneizados epiteliales. La expresión y la fosforilación de las moléculas indicadas se determinaron mediante análisis de transferencia Western blot. (C) La fosforilación de Akt en tejido de colon fijado e impregnado en parafina se evaluó mediante análisis de inmunofluorescencia. Los datos son representativos de al menos 3 experimentos independientes o ratones por enfermedad.

35 La Figura 6 representa que el inhibidor de PI3K bloquea los efectos antiapoptóticos de NRG4. (A) Se expusieron células YAMC-B4 a TNF + IFN-γ, con o sin NRG4 y/o inhibidor de PI3K (LY294002). Después de 6 h, las células se fijaron y la apoptosis se evaluó mediante tinción inmunofluorescente para caspasa-3 escindida. Los datos son representativos de 4 experimentos independientes. (B) A los ratones se les inyectó TNF + IFN-γ, con o sin NRG4 y/o inhibidor de PI3K (LY294002). Después de 24 h, se fijaron los colonos y se cuantificó la apoptosis mediante tinción ISOL.

40 La Figura 7 muestra que los niveles de NRG4 disminuyen en la enfermedad inflamatoria intestinal humana. (A, B) Se realizó un análisis de qPCR para la expresión de los genes (A) NRG4 y (B) HRG-1β en matrices de qPCR de TissueScan para Crohn/Colitis. Los niveles relativos de ARNm se calcularon utilizando el método 2-ΔΔCT con 13-actina como referencia. (C) Homogenatos de colon de ratones de control de tipo salvaje (WT) o IL-10-/- se sometieron a análisis de transferencia Western Blot para ErbB4, fosfo-ErbB4 y NRG4. Los resultados mostrados son representativos de 4 ratones por genotipo.

La Figura 8 muestra que, en células epiteliales ileales de rata, la apoptosis inducida por *Cronobacter sakazakii* es atenuada por NRG4.

La Figura 9 muestra que las crías de rata son resistentes a la ECN experimental cuando se tratan con NRG4.

50

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0009] A menos que se definan de otro modo, los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende normalmente un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3rd ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2001); March, Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 5th ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 2001); y Sambrook and Russel, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2001), proporcionan a un experto en la materia una guía general de muchos de los términos utilizados en la presente solicitud.

60

[0010] Los "resultados beneficiosos" pueden incluir, pero no están limitados a, disminuir o paliar la gravedad de la enfermedad, prevenir el empeoramiento de la enfermedad, curar la enfermedad, prevenir el desarrollo de la

enfermedad, disminuir las posibilidades de que un paciente desarrolle la enfermedad y prolongar la vida o la esperanza de vida del paciente. La enfermedad puede ser cáncer.

[0011] "Mamífero", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier miembro de la clase *Mammalia* incluyendo, sin limitación, humanos y primates no humanos como chimpancés y otros simios y especies de monos; animales de granja como vacas, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos como perros y gatos; animales de laboratorio, incluyendo roedores como ratones, ratas y cobayas, y similares. El término no denota una edad o sexo en particular. Por lo tanto, los sujetos adultos y recién nacidos, así como los fetos, ya sean machos o hembras, deben incluirse dentro del alcance de este término.

[0012] "Tratamiento" y "tratar", tal como se usan en el presente documento, se refieren tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en las que el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) la afección patológica en cuestión, prevenir la afección patológica, buscar u obtener resultados beneficiosos, o disminuir las posibilidades de que el individuo desarrolle la afección incluso si el tratamiento finalmente no tiene éxito. Los que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen la afección, así como aquellos propensos a tener la afección o aquellos en quienes se debe prevenir la afección.

[0013] La "enfermedad inflamatoria intestinal" o "EII", como se usa en este documento, se refiere a las afecciones inflamatorias que incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis colágena, colitis linfocítica, colitis isquémica, colitis por derivación, enfermedad de Behçet y colitis indeterminada.

[0014] El inventor propone una alternativa a las terapias existentes para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal que comprende administrar una cantidad eficaz de un activador de ErbB4 al sujeto. Como se describe en este documento, el ErbB4 es activado por la Neuregulina-4 (NRG4). La NRG4 es el único factor de crecimiento conocido que se encuentra en el intestino y es completamente específico para la tirosina quinasa del receptor ErbB4. Los datos del inventor indican que la señalización NRG4-ErbB4 es una vía antiapoptótica en las células epiteliales del colon que se ve comprometida en la colitis por la pérdida del ligando NRG4. Sin pretender limitarse a una teoría específica, el inventor plantea la hipótesis de que la activación de ErbB4 por NRG4 promueve la supervivencia de las células epiteliales del colon y protege el epitelio del daño inducido por la inflamación.

#### Métodos terapéuticos

[0015] En el presente documento se describen métodos para tratar, inhibir, reducir los síntomas y/o favorecer la profilaxis de enfermedades asociadas con la apoptosis inducida por citocinas tales como TNF e IFN- $\alpha$ . En algunas formas de realización, los métodos incluyen administrar al sujeto un activador de ErbB4. Los ejemplos de enfermedades incluyen, entre otros, enfermedad inflamatoria intestinal, enterocolitis necrotizante, artritis reumatoide y asma. En algunas formas de realización, el activador de ErbB4 se selecciona del grupo que consiste en una molécula pequeña, un péptido, un anticuerpo o un fragmento del mismo y una molécula de ácido nucleico. En una forma de realización, el activador de ErbB4 es la Neuregulina-4 o un equivalente farmacéutico, análogo, derivado o una sal de la misma.

[0016] La invención proporciona métodos terapéuticos para tratar, inhibir, reducir los síntomas y/o favorecer la profilaxis de la enfermedad inflamatoria intestinal en un sujeto que lo necesite usando activadores de ErbB4.

[0017] La invención también proporciona métodos terapéuticos para tratar, inhibir, reducir los síntomas y/o promover la profilaxis de la enterocolitis necrotizante en un sujeto que lo necesite usando activadores de ErbB4.

#### *Enfermedad inflamatoria intestinal y activador de ErbB4*

[0018] La invención proporciona métodos para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal en un sujeto que lo necesite. Los métodos comprenden proporcionar una composición que comprende un activador de ErbB4 y administrar una cantidad eficaz de la composición al sujeto para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal del sujeto. En algunas formas de realización, el activador de ErbB4 se selecciona del grupo que consiste en una molécula pequeña, un péptido, un anticuerpo o un fragmento del mismo y una molécula de ácido nucleico. En una forma de realización, el activador de ErbB4 es la Neuregulina-4 o un equivalente farmacéutico, análogo, derivado o una sal de la misma.

[0019] La invención también proporciona métodos para inhibir y/o reducir los síntomas de la enfermedad inflamatoria intestinal en un sujeto que lo necesite. Los métodos comprenden proporcionar una composición que comprende un activador de ErbB4 y administrar una cantidad eficaz de la composición al sujeto para inhibir y/o reducir los síntomas de la enfermedad inflamatoria intestinal del sujeto. En algunas formas de realización, el activador de ErbB4 se selecciona del grupo que consiste en una molécula pequeña, un péptido, un anticuerpo o un fragmento del mismo y una molécula de ácido nucleico. En una forma de realización, el activador de ErbB4 es la Neuregulina-4 o un equivalente farmacéutico, análogo, derivado o una sal de la misma.

[0020] La invención también proporciona métodos para inhibir la muerte de células epiteliales del intestino delgado y del colon asociada a la inflamación en un sujeto que lo necesite. Los métodos comprenden proporcionar una

composición que comprende un activador de ErbB4 y administrar una cantidad eficaz de la composición al sujeto para inhibir la muerte de las células epiteliales del intestino delgado y del colon asociada a la inflamación en un sujeto. En algunas formas de realización, el activador de ErbB4 se selecciona del grupo que consiste en una molécula pequeña, un péptido, un anticuerpo o un fragmento del mismo y una molécula de ácido nucleico. En una forma de realización, el activador de ErbB4 es la Neuregulina-4 o un equivalente farmacéutico, análogo, derivado o una sal de la misma.

[0021] La invención también proporciona métodos para favorecer la profilaxis de la enfermedad inflamatoria intestinal, mitigar el efecto de la enfermedad inflamatoria intestinal, reducir la gravedad de la enfermedad inflamatoria intestinal, reducir la probabilidad de desarrollar la enfermedad inflamatoria intestinal y/o ralentizar la progresión de la enfermedad inflamatoria intestinal en sujetos que lo necesiten. Los métodos comprenden proporcionar una composición que comprende un activador de ErbB4 y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición al sujeto para favorecer la profilaxis de la enfermedad inflamatoria intestinal, mitigar el efecto de la enfermedad inflamatoria intestinal, reducir la gravedad de la enfermedad inflamatoria intestinal, reducir la probabilidad de desarrollar la enfermedad inflamatoria intestinal y/o retrasar la progresión de la enfermedad inflamatoria intestinal en sujetos que lo necesiten. En algunas formas de realización, el activador de ErbB4 se selecciona del grupo que consiste en una molécula pequeña, un péptido, un anticuerpo o un fragmento del mismo y una molécula de ácido nucleico. En una forma de realización, el activador de ErbB4 es la Neuregulina-4 o un equivalente farmacéutico, análogo, derivado o una sal de la misma.

[0022] En diversas formas de realización, el activador de ErbB4 puede usarse junto con tratamientos existentes para la enfermedad inflamatoria intestinal. Por ejemplo, los activadores de ErbB4 pueden usarse junto con terapias existentes, tales como modificaciones en la dieta y administraciones de medicamentos terapéuticos que incluyen, entre otros, sulfasalazina (Azulfidine), mesalamina (Asacol, Pentasa), azatioprina (Imuran), 6-MP (Purinethol), ciclosporina, metotrexato, infliximab (Remicade), budesonida (Entocort EC) y corticosteroides (prednisona), para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal. Las dosis de los tratamientos existentes que pueden usarse con los activadores ErbB4 serán evidentes para un experto en la materia. En una forma de realización, el activador de ErbB4 es la Neuregulina-4 o un equivalente farmacéutico, análogo, derivado o una sal de la misma.

[0023] El cáncer colorrectal representa la causa principal del exceso de morbilidad y mortalidad por enfermedad maligna en la colitis ulcerosa, así como en la enfermedad de Crohn. En una forma de realización, el tratamiento, la inhibición o la reducción de los síntomas de la enfermedad inflamatoria intestinal en un sujeto pueden prevenir y/o tratar el cáncer colorrectal. Por consiguiente, la invención proporciona métodos para tratar, reducir la gravedad y/o prevenir el cáncer colorrectal en un sujeto que lo necesite. Los métodos comprenden proporcionar una composición que comprende un activador de ErbB4 y administrar una cantidad eficaz de la composición al sujeto para inhibir la muerte asociada a la inflamación de las células epiteliales del intestino delgado y del colon en un sujeto. En algunas formas de realización, el activador de ErbB4 se selecciona del grupo que consiste en una molécula pequeña, un péptido, un anticuerpo o un fragmento del mismo y una molécula de ácido nucleico. En una forma de realización, el activador de ErbB4 es la Neuregulina-4 o un equivalente farmacéutico, análogo, derivado o una sal de la misma.

[0024] En algunas formas de realización, el activador de ErbB4 es un activador directo de ErbB4, de modo que el activador se une a ErbB4 y lo activa, por ejemplo, induciendo o aumentando la fosforilación de ErbB4. En algunas formas de realización, el activador de ErbB4 es un activador indirecto de ErbB4, de modo que el activador inhibe el inhibidor de ErbB4 para que se active el ErbB4.

#### *Enterocolitis necrotizante y activador de ErbB4*

[0025] La invención proporciona un método para tratar la enterocolitis necrotizante en un sujeto que lo necesite. El método comprende proporcionar una composición que comprende un activador de ErbB4 y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición al sujeto para tratar la enterocolitis necrotizante. En algunas formas de realización, el activador de ErbB4 se selecciona del grupo que consiste en una molécula pequeña, un péptido, un anticuerpo o un fragmento del mismo y una molécula de ácido nucleico. En una forma de realización, el activador de ErbB4 es la Neuregulina-4 o un equivalente farmacéutico, análogo, derivado o una sal de la misma.

[0026] La invención también proporciona un método para inhibir la enterocolitis necrotizante en un sujeto que lo necesite. El método comprende proporcionar una composición que comprende un activador de ErbB4 y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición al sujeto para inhibir la enterocolitis necrotizante. En una forma de realización, el activador de ErbB4 es NRG4, una sal de la misma o un equivalente farmacéutico de la misma. En algunas formas de realización, el activador de ErbB4 se selecciona del grupo que consiste en una molécula pequeña, un péptido, un anticuerpo o un fragmento del mismo y una molécula de ácido nucleico. En una forma de realización, el activador de ErbB4 es la Neuregulina-4 o un equivalente farmacéutico, análogo, derivado o una sal de la misma.

[0027] La invención también proporciona métodos para favorecer la profilaxis de la enterocolitis necrotizante, mitigar el efecto de la enterocolitis necrotizante, reducir la gravedad de la enterocolitis necrotizante, reducir la probabilidad de desarrollar enterocolitis necrotizante y/o ralentizar la progresión de la enterocolitis necrotizante en

5 sujetos que lo necesiten. Los métodos comprenden proporcionar una composición que comprende un activador de ErbB4 y administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición al sujeto para inhibir la enterocolitis necrotizante. En algunas formas de realización, el activador de ErbB4 se selecciona del grupo que consiste en una molécula pequeña, un péptido, un anticuerpo o un fragmento del mismo y una molécula de ácido nucleico. En una forma de realización, el activador de ErbB4 es la Neuregulina-4 o un equivalente farmacéutico, análogo, derivado o una sal de la misma.

10 [0028] En algunas formas de realización, el activador de ErbB4 es un activador directo de ErbB4, de modo que el activador se une al ErbB4 y lo activa, por ejemplo, induciendo o aumentando la fosforilación de ErbB4. En algunas formas de realización, el activador de ErbB4 es un activador indirecto de ErbB4, de modo que el activador inhibe el inhibidor del ErbB4 para que se active el ErbB4.

15 [0029] Además, en caso de la enterocolitis necrotizante, los activadores de ErbB4 se pueden usar junto con los tratamientos existentes, como detener la alimentación enteral, realizar descompresión nasogástrica e iniciar la toma de antibióticos de amplio espectro. En una forma de realización, el activador de ErbB4 es la Neuregulina-4 o un equivalente farmacéutico, análogo, derivado o una sal de la misma.

20 [0030] Se pueden utilizar varios métodos para administrar la composición de los métodos, que incluyen pero no se limitan a aerosol, vía nasal, oral, transmucosa, transdérmica, parenteral, bomba implantable, infusión continua, aplicación tópica, cápsulas y/o inyecciones.

[0031] Los sujetos tratados mediante la presente invención incluyen sujetos mamíferos, que incluyen humanos, monos, simios, perros, gatos, vacas, caballos, cabras, cerdos, conejos, ratones y ratas.

25 Dosis de la invención

30 [0032] Como se ha descrito anteriormente, el activador de ErbB4 puede usarse junto con los tratamientos existentes para la enfermedad inflamatoria intestinal y la enterocolitis necrotizante. En algunas formas de realización, el activador de ErbB4 se administra simultáneamente con los tratamientos existentes para la enfermedad inflamatoria intestinal y la enterocolitis necrotizante. En diversas formas de realización, el activador de ErbB4 se administra secuencialmente con los tratamientos existentes para la enfermedad inflamatoria intestinal y la enterocolitis necrotizante. El activador de ErbB4, solo o junto con los tratamientos existentes para la enfermedad inflamatoria intestinal y la enterocolitis necrotizante, se puede administrar en varias etapas de la enfermedad inflamatoria intestinal y la enterocolitis necrotizante, como etapas tempranas, etapas intermedias y/o etapas tardías de la enfermedad inflamatoria intestinal y la enterocolitis necrotizante. En una forma de realización, el activador de ErbB4 es la Neuregulina-4 o un equivalente farmacéutico, análogo, derivado o una sal de la misma.

40 [0033] En algunas formas de realización de la invención, la cantidad eficaz de activador de ErbB4 en la composición puede estar en el intervalo de aproximadamente 10-50 mg/día, 50-100 mg/día, 100-150 mg/día, 150-200 mg/día, 100-200 mg/día, 200-300mg/día, 300-400mg/día, 400-500mg/día, 500-600mg/día, 600-700mg/día, 700-800mg/día, 800-900mg/día, 900-1000mg/día, 1000-100mg/día, 1100-1200mg/día, 1200-1300mg/día, 1300-1400mg/día, 1400-1500mg/día, 1500-1600mg/día, 1600-1700mg/día, 1700-1800mg/día, 1800-1900mg/día, 1900-2000mg/día, 2000-2100mg/día, 2100-2200mg/día, 2200-2300mg/día, 2300-2400mg/día, 2400-2500mg/día, 2500-2600mg/día, 2600-2700mg/día, 2700-2800mg/día, 2800-2900mg/día o 2900-3000mg/día. En una forma de realización de la invención, el ErbB4 es Neuregulina-4 o un equivalente farmacéutico, análogo, derivado o una sal de la misma.

50 [0034] En formas de realización adicionales de la invención, la cantidad eficaz de activador de ErbB4 para usar con los métodos puede estar en el intervalo de 0,001-0,005mg/kg, 0,005-0,01mg/kg, 0,01-0,02mg/kg, 0,02-0,04mg/kg, 0,04-0,06mg/kg, 0,06-0,08mg/kg, 0,08-1mg/kg, 1-5mg/kg, 5-10mg/kg, 10-15mg/kg, 15-20mg/kg, 20-25mg/kg, 25-30mg/kg, 30-35mg/kg, 35-40mg/kg, 40-45mg/kg, 45-50mg/kg, 10-50mg/kg, 50-100mg/kg, 100-150mg/kg, 150-200mg/kg, 100-200mg/kg, 200-300mg/kg, 300-400mg/kg, 400-500mg/kg, 500-600mg/kg, 600-700mg/kg, 700-800mg/kg, 800-900mg/kg, 900-1000mg/kg, 1000-1100mg/kg, 1100-1200mg/kg, 1200-1300mg/kg, 1300-1400mg/kg, 1400-1500mg/kg, 1500-1600mg/kg, 1600-1700mg/kg, 1700-1800mg/kg, 1800-1900mg/kg, 1900-2000mg/kg, 2000-2100mg/kg, 2100-2200mg/kg, 2200-2300mg/kg, 2300-2400mg/kg, 2400-2500mg/kg, 2500-2600mg/kg, 2600-2700mg/kg, 2700-2800mg/kg, 2800-2900mg/kg o 2900-3000mg/kg. En una forma de realización de la invención, el activador de ErbB4 es la Neuregulina-4 o un equivalente farmacéutico, análogo, derivado o una sal de la misma.

60 [0035] Las dosis típicas de una cantidad eficaz de un activador de ErbB4, como la Neuregulina-4, pueden estar dentro de los intervalos recomendados por el fabricante cuando se usan compuestos terapéuticos conocidos, y también según lo indicado por el experto en la materia según las respuestas *in vitro* o las respuestas en modelos animales. La dosis real puede depender del juicio del médico, de la enfermedad del paciente y de la efectividad del método terapéutico basada, por ejemplo, en la capacidad *in vitro* de respuesta de células cultivadas relevantes o de muestras de tejido histocultivadas, o en las respuestas observadas en los modelos animales apropiados.

Métodos de cribado de la invención

[0036] Otro aspecto de la invención se refiere a ensayos y métodos para identificar compuestos que activan ErbB4. En una forma de realización, el método comprende poner en contacto ErbB4 en una célula positiva para ErbB4 con el compuesto de interés y posteriormente determinar si el contacto da como resultado una fosforilación alterada de ErbB4. En una forma de realización, una alteración en la cantidad de fosforilación de ErbB4 es un aumento en la cantidad de fosforilación de ErbB4. En una forma de realización, un aumento en la cantidad de fosforilación de ErbB4 indica que la molécula de interés es un activador de ErbB4.

[0037] Los métodos de cribado proporcionan además métodos para identificar compuestos que activan ErbB4, donde el método incluye poner en contacto ErbB4 en una célula positiva para ErbB4 con el compuesto de interés, poner en contacto la célula positiva para ErbB4 y el compuesto de interés con una célula diana y posteriormente determinar si el contacto da como resultado la apoptosis alterada de las células diana. En una forma de realización, una disminución en la apoptosis de las células diana indica que la molécula de interés es un activador de ErbB4.

[0038] El compuesto de interés que activa ErbB4 puede ser uno cualquiera o más de entre una molécula pequeña, un péptido, un polipéptido, un anticuerpo o un fragmento del mismo y una molécula de ácido nucleico.

[0039] Los ensayos que pueden emplearse para identificar compuestos que activan ErbB4 incluyen, entre otros, uno o más de entre análisis de microchips de ADN, PCR cuantitativa, ensayo de transferencia Northern blot, ensayo de transferencia Southern blot, ensayo de inmunohistoquímica, ensayo de transferencia Western blot, ensayos de unión, ensayos de retraso en gel, ensayos utilizando el sistemas del doble híbrido en levadura, ensayos que miden la apoptosis celular, o una combinación de los mismos. Un experto en la materia puede emplear fácilmente numerosas técnicas conocidas en la técnica para determinar si un agente particular activa ErbB4.

#### Composiciones farmacéuticas

[0040] Las composiciones de la invención son como se describen en las reivindicaciones. En diversas formas de realización, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que incluyen un excipiente farmacéuticamente aceptable junto con una cantidad terapéuticamente eficaz de Neuregulina-4 o un equivalente farmacéutico, análogo, derivado o una sal de la misma. "Excipiente farmacéuticamente aceptable" significa un excipiente que es útil en la preparación de una composición farmacéutica que generalmente es segura, no tóxica y deseable, e incluye excipientes que son aceptables para uso veterinario así como para uso farmacéutico humano. Dichos excipientes pueden ser sólidos, líquidos, semisólidos o, en el caso de una composición de aerosol, gaseosos.

[0041] En diversas formas de realización, las composiciones farmacéuticas según la invención pueden formularse para su administración a través de cualquier vía de administración. La "vía de administración" puede referirse a cualquier vía de administración conocida en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, por aerosol, nasal, oral, transmucosal, transdérmica o parenteral.

[0042] Las composiciones farmacéuticas según la invención también pueden contener cualquier vehículo farmacéuticamente aceptable. "Vehículo farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable que está implicado en llevar o transportar un compuesto de interés desde un tejido, órgano o parte del cuerpo hasta otro tejido, órgano o parte del cuerpo. Por ejemplo, el vehículo puede ser una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente, disolvente o material de encapsulación, o una combinación de los mismos. Cada componente del vehículo debe ser "farmacéuticamente aceptable" en el sentido de que debe ser compatible con los otros ingredientes de la formulación. También debe ser adecuado para su uso en contacto con cualquier tejido u órgano con el que pueda entrar en contacto, lo que significa que no debe conllevar un riesgo de toxicidad, irritación, respuesta alérgica, inmunogenicidad o cualquier otra complicación que supere excesivamente sus beneficios terapéuticos.

[0043] Las composiciones farmacéuticas según la invención también pueden encapsularse, comprimirse o prepararse en una emulsión o jarabe para administración oral. Se pueden añadir vehículos sólidos o líquidos farmacéuticamente aceptables para mejorar o estabilizar la composición, o para facilitar la preparación de la composición. Los vehículos líquidos incluyen jarabe, aceite de cacahuete, aceite de oliva, glicerina, solución salina, alcoholes y agua. Los vehículos sólidos incluyen almidón, lactosa, sulfato de calcio, dihidrato, yeso en polvo, estearato de magnesio o ácido esteárico, talco, pectina, acacia, agar o gelatina. El vehículo también puede incluir un material de liberación sostenida tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, solo o con una cera.

[0044] La composición farmacéutica según la invención también puede ser un sistema de perlas para la administración del activador de ErbB4 a las células diana. Por ejemplo, puede usarse un sistema de perlas de hidrogel de pectina/zeína para administrar Neuregulina-4 o un equivalente farmacéutico, análogo, derivado o una sal de la misma, a las células diana del sujeto (Yan F. y col., J Clin Invest. 2011 Jun; 121 (6): 2242-53).

[0045] Las preparaciones farmacéuticas se realizan siguiendo las técnicas convencionales de farmacia que implican molienda, mezcla, granulación y compresión, cuando sea necesario, para formas de comprimido; o

molienda, mezcla y llenado para formas de cápsulas de gelatina dura. Cuando se usa un vehículo líquido, la preparación estará en forma de jarabe, elixir, emulsión o una suspensión acuosa o no acuosa. Dicha formulación líquida se puede administrar directamente por vía oral o como relleno de una cápsula de gelatina blanda.

5 [0046] Las composiciones farmacéuticas según la invención pueden administrarse en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad terapéuticamente eficaz precisa es la cantidad de la composición que producirá los resultados más efectivos en términos de eficacia del tratamiento en un sujeto dado. Esta cantidad  
10 variará dependiendo de una variedad de factores, que incluyen, entre otros, las características del compuesto terapéutico (que incluye actividad, farmacocinética, farmacodinámica y biodisponibilidad), la condición fisiológica del sujeto (que incluye edad, sexo, tipo y estadio de la enfermedad, estado físico general, capacidad de respuesta a una dosis dada y tipo de medicamento), la naturaleza del vehículo o vehículos farmacéuticamente aceptables de la formulación y la vía de administración. Un experto en la técnica clínica y farmacológica podrá determinar una cantidad terapéuticamente eficaz mediante experimentación rutinaria, por ejemplo, controlando la respuesta de un  
15 sujeto a la administración de un compuesto y ajustando la dosis en consecuencia. Para una orientación adicional, véase Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro ed. 20th edition, Williams & Wilkins PA, EE. UU.) (2000).

Kits de la invención

20 [0047] La presente invención también se dirige a kits para tratar la enfermedad inflamatoria intestinal y/o la colitis necrotizante. El kit es un conjunto de materiales o componentes, que incluye al menos una de las composiciones de la invención. Por lo tanto, en algunas formas de realización, el kit contiene una composición que incluye Neuregulina-4 o un equivalente farmacéutico, análogo, derivado o una sal de la misma, como se ha descrito anteriormente.

25 [0048] La naturaleza exacta de los componentes configurados en el kit de la invención depende de su finalidad prevista. En una forma de realización, el kit está configurado particularmente para sujetos humanos. En formas de realización adicionales, el kit está configurado para aplicaciones veterinarias, para el tratamiento de sujetos tales como, pero sin limitarse a, animales de granja, animales domésticos y animales de laboratorio.

30 [0049] Las instrucciones de uso están incluidas en el kit. Las "instrucciones de uso" típicamente incluyen una expresión tangible que describe la técnica que se utilizará para usar los componentes del kit para lograr un resultado deseado, como tratar o prevenir la enfermedad inflamatoria intestinal y/o la colitis necrotizante en un sujeto. Opcionalmente, el kit también contiene otros componentes útiles, tales como herramientas de medición, diluyentes, tampones, vehículos farmacéuticamente aceptables, jeringas u otros elementos útiles que los expertos  
35 en la materia reconocerán fácilmente.

[0050] Los materiales o componentes ensamblados en el kit se pueden proporcionar al profesional almacenados de cualquier manera conveniente y adecuada para preservar su operatividad y utilidad. Por ejemplo, los  
40 componentes pueden estar en forma disuelta, deshidratada o liofilizada; se pueden proporcionar a temperatura ambiente, refrigerados o congelados. Los componentes están contenidos típicamente en material(es) de envasado adecuado(s). Tal como se emplea en el presente documento, la frase "material de envasado" se refiere a una o más estructuras físicas utilizadas para alojar el contenido del kit, tales como composiciones inventivas y similares. El material de envasado se fabrica mediante métodos ampliamente conocidos, preferiblemente para proporcionar  
45 un ambiente estéril y libre de contaminantes. Como se usa en el presente documento, el término "paquete" se refiere a una matriz o material sólido adecuado tal como vidrio, plástico, papel, papel de aluminio y similares, capaz de contener los componentes individuales del kit. Así, por ejemplo, un paquete puede ser una botella utilizada para contener cantidades adecuadas de una composición inventiva que contiene Neuregulina-4 o un equivalente farmacéutico, análogo, derivado o una sal de la misma. El material de envasado generalmente tiene una etiqueta  
50 externa que indica el contenido y/o el propósito del kit y/o sus componentes.

## EJEMPLOS

55 [0051] El siguiente ejemplo se proporciona para ilustrar mejor la invención reivindicada y no debe interpretarse como limitativo del alcance de la invención. En la medida en que se mencionen materiales específicos, es meramente para fines de ilustración y no se pretende limitar la invención.

[0052] La expresión de la tirosina quinasa ErbB4 es elevada en las células epiteliales del colon durante la enfermedad inflamatoria intestinal (EII), mientras que la sobreexpresión de ErbB4 en colonocitos cultivados  
60 bloquea la apoptosis inducida por TNF de una manera dependiente del ligando. En conjunto, estas observaciones sugieren que la inducción de ErbB4 puede ser una respuesta protectora. Sin embargo, no se conocían efectos de la señalización de ErbB4 en el epitelio del colon *in vivo*. Además, el trabajo previo sobre ErbB4 utilizó ligandos compartidos con otros receptores, lo que plantea la cuestión de si las respuestas observadas se deben explícitamente al ErbB4. En este caso, el inventor utilizó el ligando específico de ErbB4 Neuregulina-4 (NRG4)  
65 para activar el ErbB4 y definir su papel en la biología de los colonocitos. El tratamiento con NRG4, ya sea en células cultivadas o en ratones, bloqueó la apoptosis epitelial del colon inducida por TNF e IFN- $\gamma$ . La NRG4 estimuló la fosforilación de ErbB4 pero no de otros receptores ErbB, lo que indica que esta es una respuesta específica.

Además, en contraste con los ligandos relacionados, la NRG4 mejoró la supervivencia celular pero no la proliferación o la migración, y estimuló la fosforilación del mediador antiapoptótico Akt pero no ERK MAPK. La inhibición farmacológica de la señalización de PI3K/Akt revirtió los efectos antiapoptóticos de NRG4, confirmando el papel de esta cascada en la supervivencia celular inducida por NRG4. Con respecto a la importancia clínica potencial de esta vía, la expresión de NRG4 disminuyó en muestras de EII humana y modelos de colitis en ratones, lo que sugiere que la activación de ErbB4 se altera durante la enfermedad. Por lo tanto, la NRG4 exógena puede ser beneficiosa para trastornos en los que la apoptosis epitelial forma parte de la patología.

## Ejemplo 1

### Métodos experimentales

[0053] *Cultivo celular*. El Dr. Robert Whitehead (Whitehead, R. H., VanEeden, P. E., Noble, M. D., Ataliotis, P., and Jat, P. S. (1993) Proc Natl Acad Sci U S A 90, 587-591) proporcionó células epiteliales de colon de ratón joven (YAMC) no transformadas y condicionalmente inmortalizadas. Estas células expresan bajos niveles de ErbB4 endógeno; se generaron células YAMC-B4 que expresan una construcción ErbB4 humana como se ha descrito previamente (Frey, M. R., Edelblum, K. L., Mullane, M. T., Liang, D. y Polk, D. B. (2009) Gastroenterology 136, 217-226) Los grupos de células que no mostraban activación de ErbB4 autocrina se seleccionaron para su uso y se mantuvieron en condiciones permisivas [33 °C en RPMI 1640 con FBS al 5%, 5 unidades/ml de interferón- $\gamma$  de ratón (Peprotech, Rocky Hill, NJ), 100 U/ml de penicilina y estreptomina, 5  $\mu$ g/ml de insulina, 5  $\mu$ g/ml de transferrina y 5 ng/ml de ácido selenoso (BD Biosciences, San Jose, CA)], luego se cambiaron a condiciones no permisivas (RPMI 1640 que contenía FBS al 0,5%, estreptomina y penicilina sin IFN- $\gamma$ , insulina, transferrina o ácido selenoso, a 37 °C) durante la noche antes de su uso en experimentos.

[0054] *Anticuerpos, citocinas, factores de crecimiento e inhibidores*. Los anticuerpos se compraron de: monoclonal antiactina, Sigma Corp. (St. Louis, MO); policlonal anti-fosfo-Y1284 ErbB4, fosfo-Y1068 EGFR, fosfo-Y1248 ErbB2, fosfo-Y1289 ErbB3, EGFR, ErbB2, ErbB3, fosfo-S473 Akt, caspasa-3 escindida, polimerasa de poli (ADP-ribosa) escindida, fosfo-p38, y fosfo-ERK, señalización celular (Danvers, MA); policlonal anti-ErbB4 (c-18) y policlonal anti-COX-2 de cabra, Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA); anti-Ki67, Dako Corp (Carpinteria, CA); IRDye antirrátón, anticonejo y anticabra, Li-Cor Corp (Lincoln, NE); anticonejo conjugado con AlexaFluor-555, Invitrogen (Carlsbad, CA). El TNF, IFN- $\gamma$  y EGF de murino recombinantes eran de Peprotech. HRG-1 $\beta$  y el anticuerpo anticaspasa fueron de R&D Systems (Minneapolis, MN). La NRG4 recombinante [secuencia de ectodominio A1/A2 (Hayes, N. V., Newsam, R. J., Baines, A. J. y Gullick, W. J. (2008) Oncogene 27, 715-720)] fue sintetizada por Genscript Corp (Piscataway, NJ). LY294002 (inhibidor de PI 3-quinasa) se adquirió de Cell Signaling.

[0055] *Animales*. Todo uso de animales fue aprobado y monitoreado por el Comité institucional de cuidado y uso de animales del Children's Hospital Los Angeles. Los experimentos utilizaron ratones C57B1/6J machos de 6-8 semanas de edad (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME). Se administraron citocinas, factores de crecimiento e inhibidores mediante inyección intraperitoneal. 24 horas después de las inyecciones, los ratones se sacrificaron y se extirparon los colonos, o bien para fijación e incrustación o bien para lisados epiteliales. Para estos últimos, los colonos se incubaron en solución de recuperación celular (BD Biosciences, San Jose, CA) durante 1 hora a 4 °C; las criptas se liberaron mediante agitación vigorosa y se recogieron por centrifugación, de forma similar a la descrita anteriormente (Whitehead, R. H., and Robinson, P. S. (2009) American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology 296, G455-460). Las criptas recolectadas se lisaron y procesaron de manera similar a las células cultivadas como se muestra a continuación. Para la colitis murina, los ratones IL-10-/- con contexto genético C57B1/6 se mantuvieron sin respuesta hasta las 32-36 semanas de edad, momento en el que los ratones knockout pero no los animales de tipo salvaje tuvieron una colitis inflamatoria activada por citocinas (Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K. y Muller, W. (1993) Cell 75, 263-274).

[0056] *Inmunofluorescencia y análisis histoquímico*. Los tejidos y las células se fijaron con paraformaldehído al 4% (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA). Se realizó una inmunotinción utilizando técnicas estándar en secciones impregnadas en parafina de 4-6  $\mu$ M o células YAMC-B4 fijas, utilizando las sugerencias de los fabricantes para diluciones de anticuerpos. Para la inmunofluorescencia, los portaobjetos se montaron con medio Vectashield que contenía DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Para la inmunohistoquímica, el sustrato de diaminobencidina era de Sigma Corp (St. Louis, MO) y las secciones se contratiñeron con verde metilo (Dako Corp).

[0057] *Lisados celulares y análisis de transferencia Western blot*. Los lisados celulares se extrajeron en tampón RIPA modificado como se ha descrito previamente (Frey, M. R., Dise, R. S., Edelblum, K. L. y Polk, D. B. (2006) Embo J 25, 5683-5692), se aclararon por centrifugación y se hirvieron en tampón de muestra Laemmli. Las muestras se separaron en geles de SDS-poliacrilamida (6-10%, según corresponda), se transfirieron a membranas de PVDF y se sometieron a inmunotransferencia cuantitativa usando el sistema de detección de infrarrojos Odyssey de Li-Cor. La carga igual fue monitoreada por inmunoblots para actina y al menos una proteína adicional.

[0058] *Ensayos de apoptosis*. La apoptosis se estimuló en cultivo celular mediante exposición de 6 horas a una mezcla de citocinas que contenía TNF (100 ng/ml) más IFN- $\gamma$  (150 unidades/ml), con o sin NRG4 recombinante

(100 ng/ml). En algunos experimentos, también se usó LY294002 (inhibidor de PI3K, 5  $\mu$ M). Las células se fijaron en paraformaldehído al 4% y se inmunotintaron para caspasa-3 escindida.

5 [0059] Para el análisis de apoptosis *in vivo*, se inyectó intraperitonealmente a ratones PBS/vehículo, TNF (250  $\mu$ g/kg) más IFN- $\gamma$  (250 unidades/g), NRG4 (100  $\mu$ g/kg) o NRG4 más TNF e IFN- $\gamma$ . En algunos experimentos, se incluyó LY294002 (50 mg/kg). Después de 24 h, los ratones se sacrificaron y los cólones se extirparon y se fijaron o se usaron para crear homogeneizados de la mucosa. Se detectó la apoptosis mediante tinción de ligación de oligonucleótidos *in situ* (ISOL; EMD Millipore, Billerica, MA) para la fragmentación del ADN en secciones de tejido impregnadas en parafina, y por transferencia Western blot de caspasa-3 escindida en homogeneizados.

10 [0060] *Ensayos de proliferación*. El índice de proliferación en muestras fijas de colon se evaluó mediante tinción inmunohistoquímica para Ki-67. *In vitro*, las células se expusieron al vehículo o factores de crecimiento durante 24 h, luego se marcaron con 5-etinil-2-desoxiuridina (EdU) durante 2 h y se fijaron. Los núcleos se marcaron con DAPI, y la EdU incorporada se detectó usando un kit Click-iT EdU (Invitrogen).

15 [0061] *Migración/restitución celular*. Células cultivadas en placas recubiertas con fibronectina se sometieron a múltiples heridas circulares con una sonda giratoria de silicona como se ha descrito anteriormente (Corredor, J., Yan, F., Shen, C. C., Tong, W., John, S. K., Wilson, G., Whitehead, R. y Polk, D. B. (2003) American journal of physiology. Cell physiology 284, C953-961) Los cultivos se fotografiaron inmediatamente y 8 h después de la realización de herida; el % de cierre se determinó midiendo las heridas en la imagen.

20 [0062] *Aislamiento de ARN y detección por RT-PCR de ligandos ErbB*. El ARN total procedente de células epiteliales aisladas o de colon de ratón ultracongeladas se purificó con columnas RNeasy (Qiagen, Valencia, CA), incluyendo el tratamiento con DNasa en columna. El ADNc se sintetizó a partir de 1  $\mu$ g de ARN con iScript (Bio-Rad, Hercules, CA), se amplificó por técnicas de PCR estándar utilizando cebadores descritos anteriormente (Huotari, M. A., Miettinen, P. J., Palgi, J., Koivisto, T., Ustinov, J., Harari, D., Yarden, Y. y Otonkoski, T. (2002) Endocrinology 143, 4437-4446), y se visualizó por electroforesis en gel.

25 [0063] *Análisis de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) de NRG4 en EII*. Los niveles de expresión de NRG4 y HRG-1 $\beta$  se determinaron en la EII humana usando ensayos de expresión génica TaqMan (Life Technologies, Grand Island, NY) en matrices qPCR de TissueScan Crohn/Colitis [OriGene Technologies, Rockville MD; estos especímenes se identificaron completamente antes de su recepción, y el estudio fue revisado por la Junta de supervisión institucional del CHLA y se determinó que no se considera una investigación en "sujetos humanos" según §46.102 (f) (Wilson, K. J., Gilmore, J. L., Foley, J., Lemmon, M. A. y Riese, D. J., 2nd. (2009) Pharmacology & therapeutics 122, 1-8)]. Los niveles relativos de ARNm se calcularon utilizando el método 2- $\Delta\Delta$ CT con  $\beta$ -actina como referencia; la validez de la referencia se confirmó comparándola con un segundo gen de referencia ( $\beta$ -glucuronidasa).

30 [0064] *Estadísticas y réplicas*. Todos los datos son representativos de al menos tres experimentos independientes. Los análisis estadísticos se realizaron con el software Prism (GraphPad Inc., La Jolla, CA). La significación estadística se evaluó mediante análisis ANOVA con Tukey después de la prueba. Las barras de error indican el error estándar de las medias.

35 **Ejemplo 2**

40 *NRG4 bloquea la apoptosis de colonocitos inducida por citocinas inflamatorias tanto in vitro como in vivo*

45 [0065] Múltiples ligandos de la familia ErbB se expresan en el colon (Tabla 1). Se preparó ARN a partir de colon de ratón entero ultracongelado o epitelio de colon aislado, luego se sometió a análisis por RT-PCR para detectar la presencia de los ligandos indicados (las especificidades de unión al receptor se indican entre paréntesis de la Tabla 1).

50 **Tabla 1: ligandos ErbB expresados en colon de ratón**

Ligando	Colon entero	Células epiteliales aisladas
EGF (EGFR)	+	-
HB-EGF (EGFR, ErbB4)	+	+
Betacelulina (EGFR, ErbB4)	+	-
NRG4 (ErbB4)	+	-
HRG-1 $\beta$ (ErbB3, ErbB4)	+	-
TGF- $\alpha$ (EGFR)	+	+

55 [0066] De estos, se cree que solo NRG4 es específico para ErbB4 en comparación con otros miembros de la familia (Harari, D., Tzahar, E., Romano, J., Shelly, M., Pierce, J. H., Andrews, G. C. y Yarden, Y. (1999) Oncogene 18, 2681-2689); por lo tanto, se utilizó este ligando para definir el papel de la activación de ErbB4 en la biología epitelial del colon. El ErbB4 se expresa en todo el tracto intestinal (Figura 1A) y se induce en las células epiteliales del colon por inflamación. Se analizaron homeogenados de duodeno (Duo), yeyuno (Jej), íleon (Ile), colon proximal

(PC) y colon distal (CD) de machos C57/BL6 de 6 semanas de edad por transferencia Western blot para detectar la expresión de ErbB4 y su ligando específico, NRG4. Tanto ErbB4 como NRG4 se expresaron desde el duodeno hasta el colon distal. Las transferencias son representativas de los datos de 3 ratones.

5 [0067] Células epiteliales de colon de ratón cultivadas que expresaban células ErbB4 (YAMC-B4) se expusieron a TNF (100 ng/ml) más interferón (IFN) - $\gamma$  (150 unidades/ml), con o sin NRG4 (100 ng/ml). Después de 6 h, se fijaron las células y se evaluó la apoptosis mediante análisis de inmunofluorescencia para caspasa-3 escindida. Cuando las células YAMC-B4 recibieron 100 ng/ml de NRG4, las células se protegieron de la apoptosis inducida por la  
10 exposición de 6 horas a la mezcla de citocinas que contenía TNF (100 ng/ml) e IFN- $\gamma$  (150 U/ml), según lo medido por análisis de inmunofluorescencia para caspasa-3 escindida (Figura 1B; disminución de 2,7 veces con citocinas más NRG4 frente a citocinas solas,  $p < 0,03$ ). Se obtuvieron resultados similares mediante el ensayo TUNEL.

15 [0068] Para confirmar que este resultado se debía específicamente a la estimulación del ErbB4, las células YAMC-B4 se expusieron a HRG-1 $\beta$  (100 ng/ml), NRG4 o EGF (10 ng/ml) durante 10 minutos. La fosforilación de EGFR, ErbB2, ErbB3 y ErbB4 se determinó mediante análisis de transferencia Western blot de lisados celulares usando anticuerpos fosfoespecíficos. Las transferencias son representativas de los resultados de al menos 3 experimentos independientes. Mientras que los controles positivos con EGF y HRG-1 $\beta$  estimularon la fosforilación de múltiples ErbB (Figura 2), NRG4 activó solo el ErbB4, confirmando que NRG4 es un ligando específico para el ErbB4.

20 [0069] Para traducir estos resultados en un contexto *in vivo*, se inyectaron intraperitonealmente 250  $\mu$ g/kg de TNF más 250 U/g de IFN- $\gamma$ , con o sin NRG4 (100  $\mu$ g/kg) a ratones C57B1/6 de 6 a 8 semanas de edad. 24 horas después de las inyecciones, se extirparon los cólonos. La apoptosis evaluada mediante análisis de transferencia Western blot para caspasa-3 escindida en células epiteliales aisladas determinó que NRG4 bloqueaba la apoptosis inducida por citocinas *in vivo* (Figura 3A, B; disminución de 3,6 veces,  $p = 0,012$ ). Se obtuvieron resultados  
25 similares con el análisis de transferencia Western blot para la poli(ADP-ribosa) polimerasa escindida. La tinción con ISOL en secciones de colon fijadas, impregnadas en parafina, también mostró una reducción significativa en la apoptosis con NRG4 (Figura 3C, D; disminución de 3,1 veces,  $p < 0,0001$ ). En conjunto, estos datos muestran que la activación NRG4 de ErbB4 en células epiteliales de colon las protege de la apoptosis inducida por citocinas tanto en cultivo celular como *in vivo*.

30

### Ejemplo 3

*La proliferación y la migración de colonocitos no se ven afectadas por NRG4*

35 [0070] La mayoría de los ligandos del ErbB estimulan múltiples procesos celulares, incluida la proliferación y la migración, en las células epiteliales del colon (Frey, M. R., Golovin, A. y Polk, D. B. (2004) J Biol Chem 279, 44513-44521). Para determinar si la NRG4 es igualmente amplia en sus efectos celulares, se sometieron células YAMC-B4 a ensayos de proliferación en presencia de NRG4. Después de 24 horas de estimulación con NRG4, la absorción celular del nucleósido modificado EdU no fue diferente del control, mientras que, en contraste, el EGF estimuló la proliferación en un 31,5% respecto al control (Figura 4A). *In vivo*, el número de núcleos positivos Ki67 por cripta en PBS frente a ratones inyectados con NRG4 no había cambiado 24 horas después de la inyección (Figura 4B).

40

45 [0071] Para probar el efecto potencial de la señalización NRG4-ErbB4 sobre la motilidad celular, se utilizó un ensayo de raspado modificado para la restitución/migración (Corredor, J., Yan, F., Shen, C. C., Tong, W., John, S. K., Wilson, G., Whitehead, R. y Polk, D. B. (2003) American journal of physiology. Cell physiology 284, C953-961). Durante un período de 8 h, la NRG4 no tuvo efecto sobre la velocidad a la que las células YAMC-B4 se movían hacia el área denudada de una placa de cultivo (Figura 4C), mientras que, en contraste, el EGF causó un aumento del 54% en la migración respecto al control. En conjunto, estos resultados indican que, a diferencia de muchos otros factores de crecimiento, la NRG4 promueve selectivamente la supervivencia de las células epiteliales del colon sin afectar a la proliferación o la migración celular.

50

[0072] En el modelo de colitis murina aguda inducida por dextrano sulfato de sodio, el tratamiento con NRG4 redujo la pérdida de peso, el acortamiento del colon y el daño colónico detectable histológicamente (Figura 4D). A ratones  
55 C57/BL6 machos de 6-8 semanas de edad se les administró DSS al 3% en agua potable durante 7 días y se les inyectó diariamente PBS o NRG4 (100  $\mu$ g/kg). La pérdida de peso se controló durante el transcurso del experimento (Figura 4D (i)). El día 7, los ratones fueron sacrificados; los cólonos fueron extirpados, enrollados y fijados. Las secciones tintadas con hematoxilina-eosina fueron calificadas por un patólogo ciego a las condiciones experimentales usando un sistema de puntuación adaptado del de Dieleman et al. (Dieleman, L.A., et al., Chronic experimental colitis induced by dextran sulphate sodium (DSS) is characterized by Th1 and Th2 cytokines. Clinical and experimental immunology, 1998. 114(3): p. 385-91) (Figura 4D (ii)). La NRG4 también es protectora en el intestino delgado en el modelo de alimentación con fórmula/hipoxia de la enterocolitis necrotizante. En conjunto, estos datos indican que la NRG4 es protectora en múltiples modelos de lesión intestinal, posiblemente a través de la inhibición de la apoptosis de células epiteliales.

60

### Ejemplo 4

*La señalización NRG4-ErbB4 estimula la activación de Akt*

[0073] Para identificar las vías de señalización que podrían estar involucradas en la supervivencia celular estimulada por NRG4, se expusieron las células YAMC-B4 a NRG4 o EGF y se prepararon lisados de células enteras para el análisis de transferencia Western blot. La exposición a NRG4 (100 ng/ml, 10 min) resultó en la fosforilación de Akt pero no de ERK MAPK (Figura 5A), en contraste con HRG-1 $\beta$  y EGF, que activaron ambas cascadas. Además, la expresión de COX-2, que es inducida por HRG-1 $\beta$  o EGF después de 6 h de exposición, y es necesaria para la supervivencia celular inducida por dímeros ErbB4-EGFR (Frey, M. R., Hilliard, V. C., Mullane, M. T. y Polk, D. B. (2010) *Laboratory Investigation* 90, 1415-1424), no fue inducida por NRG4. Por lo tanto, NRG4 promueve la supervivencia celular a través de vías al menos parcialmente distintas de las activadas por otros ligandos. De manera similar a los datos del cultivo celular, el análisis de transferencia Western blot de células epiteliales de colon aisladas de ratones que recibieron inyecciones de NRG4 (con o sin TNF más IFN- $\gamma$ ) mostró un aumento de la fosforilación de Akt en comparación con los controles (Figura 5B); el aumento de la fosforilación de Akt también fue detectable por análisis de inmunofluorescencia en cólores fijos de ratones inyectados con NRG4 (Figura 5C).

**Ejemplo 5***La señalización de PI 3-quinasa/Akt es necesaria para la supervivencia celular inducida por NRG4 in vitro e in vivo*

[0074] Para evaluar el papel de la señalización de PI 3-quinasa/Akt en la supervivencia de las células YAMC-B4 estimuladas por NRG4, se agregó el inhibidor de PI3K LY294002 (5  $\mu$ M) a los cultivos incubados con TNF más IFN- $\gamma$  o TNF más IFN- $\gamma$  y NRG4. El análisis de inmunofluorescencia para la caspasa-3 escindida mostró que el inhibidor de PI3K revertía el efecto protector de NRG4 en las células YAMC-B4 (Figura 6A). *In vivo*, la inyección de LY294002 (50  $\mu$ g/kg) revirtió el bloqueo de NRG4 de la apoptosis epitelial de colon inducida por citocinas medida por tinción con ISOL (Figura 6B).

**Ejemplo 6***La expresión de NRG4 se reduce en la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa*

[0075] Para investigar la relevancia clínica potencial de una vía de supervivencia de células epiteliales de colon impulsada por NRG4, se estudió la expresión del ligando en la enfermedad inflamatoria intestinal humana. El análisis qPCR de biopsias de pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa mostró reducciones de 5,6 (p <0,05) y 7,1 (p <0,01), respectivamente, en la expresión de NRG4 en comparación con controles no inflamados (Figura 7A). Por el contrario, no se detectó ningún cambio en la expresión del ligando compartido HRG-1 $\beta$  de ErbB3/ErbB4 (Figura 7B), lo que sugiere una pérdida selectiva del ligando de ErbB4 específico solamente. En el modelo de ratón IL-10-/- de colitis crónica (Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K. y Muller, W. (1993) *Cell* 75, 263-274), los niveles de proteína NRG4 se redujeron en animales colíticos según lo determinado por el análisis de Western blot de homogeneizados intestinales (Figura 7C). Además, mientras que la expresión de ErbB4 aumentó en los cólores inflamados, de manera similar a lo que se había observado previamente para la EII humana o la colitis DSS murina (Frey, M. R., Edelblum, K. L., Mullane, M. T., Liang, D. y Polk, D. B. (2009) *Gastroenterology* 136, 217-226), la fosforilación de ErbB4 no aumentó (Figura 7C). Por lo tanto, la pérdida del ligando NRG4 se asocia con la incapacidad de activar ErbB4 a pesar de la regulación positiva del receptor.

**Ejemplo 7**

[0076] *Cronobacter sakazakii* se usa como agente dañino en un modelo de enterocolitis necrosante infecciosa (ECN) de rata y se ha visto implicada en brotes de ECN provocados por fórmulas contaminadas. *In vitro*, causa apoptosis de las células epiteliales del colon. La NRG4 inhibe la muerte celular inducida por CS. La Figura 8 muestra que la NRG4 atenúa la apoptosis inducida por *Cronobacter sakazakii* en células epiteliales intestinales de rata cultivadas. La Figura 9 muestra que las crías de rata son resistentes a ECN experimental cuando se tratan con NRG4. Esta curva de supervivencia demuestra que, en el modelo de hipoxia/hipotermia de ECN en crías de rata (conforme a Barlow et al., *Journal of Pediatric Surgery* Volume 9, Issue 5, October 1974, Pages 587-595), las crías sobreviven más tiempo si se administra NRG por sonda con cada alimentación.

**Ejemplo 8**

[0077] La investigación previa sobre el papel del receptor de tirosina quinasa de ErbB4 en los tejidos epiteliales se ha basado en gran medida en resultados que utilizan ligandos como HB-EGF o HRG-1I (Frey, M. R., Hilliard, V. C., Mullane, M. T., and Polk, D. B. (2010) *Laboratory Investigation* 90, 1415-1424; Ni, C. Y., Murphy, M. P., Golde, T. E., and Carpenter, G. (2001) *Science* 294, 2179-2181), que también activan a otros miembros de la familia ErbB (por ejemplo, véase la Figura 2). En este caso, el inventor utilizó NRG4 para activar específicamente ErbB4 en colonocitos. Los resultados muestran que la activación de ErbB4 en ausencia de fosforilación detectable de EGFR, ErbB2 o ErbB3 produce un aumento en la señalización antiapoptótica *in vitro* (Figura 1) e *in vivo* (Figura 3), sin cambios en la proliferación o migración celular (Figura 4). La supresión de la apoptosis inducida por NRG4

dependió de la vía PI3K/Akt (Figuras 5 y 6). Por lo tanto, la activación selectiva de ErbB4 con NRG4 puede ser un estímulo de supervivencia celular específico.

5 [0078] Los datos muestran la fosforilación de ErbB4, pero no de otros ErbB, en respuesta a la NRG4. En conjunto con observaciones anteriores de que la NRG4 no se une directamente a otros receptores (Harari, D., Tzahar, E., Romano, J., Shelly, M., Pierce, J. H., Andrews, G. C. y Yarden, Y. (1999) *Oncogene* 18, 2681-2689), esto sugiere que los homodímeros de ErbB4 son el mediador efectivo de su señalización. Es posible formalmente que los heterodímeros asimétricos (Monsey, J., Shen, W., Schlesinger, P. y Bose, R. (2010) *J Biol Chem* 285, 7035-7044; Macdonald-Obermann, J. L., Piwnica-Worms, D. y Pike, L. J. (2012) *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 137-142) desempeñen una función en los efectos inducidos por la NRG4, pero no se ha podido detectar la asociación de ErbB4 impulsada por NRG4 con otros ErbB. Aun así, en ausencia de su fosforilación, parece poco probable que ErbB1-3 desempeñe un papel importante en la señalización *downstream* en respuesta a la NRG4.

15 [0079] En este contexto, es interesante que la NRG4, a diferencia de otros ligandos de ErbB, promueva la supervivencia pero no la proliferación o la migración de células epiteliales de colon. En estudios de unión a péptidos proteómicos, ErbB4 se asocia con un conjunto más restringido de dianas que contienen SH2 que EGFR, ErbB2 o ErbB3 (Kaushansky, A., Gordus, A., Budnik, B. A., Lane, W. S., Rush, J. y MacBeath, G. (2008) *Chem Biol* 15, 808-817). Además, en el presente informe se muestra que la activación específica de ErbB4 provoca solo un subconjunto de la señalización *downstream*, incluida la activación de Akt, pero no de ERK MAPK, en comparación con otros ligandos de ErbB que incluyen HRG-1 $\beta$  [Figura 5 y (12)], HB-EGF (26) y TGF- $\alpha$  (McCole, D. F., Keely, S. J., Coffey, R. J. y Barrett, K. E. (2002) *J Biol Chem* 277, 42603-42612). Estas observaciones son congruentes con nuestros datos que muestran que la NRG4 es selectivamente un factor de supervivencia, lo que sitúa a ErbB4 como el único miembro de la familia que puede promover la supervivencia celular sin afectar a la proliferación o la migración. Curiosamente, algunas vías (por ejemplo, COX-2) requeridas para la respuesta de supervivencia celular a HRG-1 $\beta$  aparentemente no son necesarias en el caso de NRG4; la cuestión de si la ausencia de señalización proliferativa (por ejemplo, ERK) con NRG4 reduce el requisito de protección celular contra la apoptosis o si, en cambio, se activa un conjunto superpuesto pero distinto de vías alternativas por los diferentes ligandos, es un área de estudio en curso en nuestro laboratorio.

30 [0080] La especificidad para la supervivencia celular, pero no para la división celular, concuerda con el potencial oncogénico aparente más bajo reportado en la literatura para ErbB4 frente a otros receptores de tirosina quinasas. Si bien el aumento de los niveles o la actividad de EGFR, ErbB2 o ErbB3 en general se asocian con un mayor crecimiento tumoral, el papel de ErbB4 es más incierto. Tiene sobreexpresión en cánceres de endometrio (Srinivasan, R., Benton, E., McCormick, F., Thomas, H. y Gullick, W. J. (1999) *Clin Cancer Res* 5, 2877-2883) y cánceres de pulmón de células no pequeñas (Starr, A., Greif, J., Vexler, A., Ashkenazy-Voghera, M., Gladish, V., Rubin, C., Kerber, G., Marmor, S., Lev-Ari, S., Inbar, M., Yarden, Y. y Ben-Yosef, R. (2006) *Int J Cancer* 119, 269-274), mientras que, en contraste, el carcinoma de células de transición de la vejiga (Memon, A. A., Sorensen, B. S., Melgard, P., Fokdal, L., Thykjaer, T. y Nexø, E. (2004) *Br J Cancer* 91, 2034-2041; Rotterud, R., Nesland, J. M., Berner, A. y Fossa, S. D. (2005) *BJU Int* 95, 1344-1350) y el cáncer de próstata (Edwards, J., Traynor, P., Munro, A. F., Pirret, C. F., Dunne, B. y Bartlett, J. M. (2006) *Clin Cancer Res* 12, 123-130; Robinson, D., He, F., Pretlow, T. y Kung, H. J. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5958-5962) no muestran correlación entre los niveles de ErbB4 y el comportamiento del tumor o una asociación entre la expresión y el buen pronóstico. Los estudios sobre el cáncer de mama han producido una literatura contradictoria, con diferentes artículos que sugieren que la expresión de ErbB4 está asociada con un resultado malo (Srinivasan, R., Gillett, C. E., Barnes, D. M. y Gullick, W. J. (2000) *Cancer Res* 60, 1483-1487; Junttila, T., Sundvall, M., Lundin, M., Lundin, J., Tanner, M., Harkonen, P., Joensuu, H., Isola, J. y Elenius, K. (2005) *Cancer Res* 65, 1384-1393) o favorable (Tovey, S. M., Witton, C. J., Bartlett, J. M., Stanton, P. D., Reeves, J. R. y Cooke, T. G. (2004) *Breast Cancer Res* 6, R246-251; Witton, C. J., Reeves, J. R., Going, J. J., Cooke, T. G. y Bartlett, J. M. (2003) *J Pathol* 200, 290-297). Estos resultados aparentemente incongruentes pueden explicarse en parte por nuestros resultados, si la señalización de ErbB4 per se no promueve necesariamente la proliferación celular. La activación de ErbB4 por HRG-11, que estimula múltiples receptores, activa vías asociadas al cáncer como la COX-2, pero esta respuesta depende de la asociación con EGFR (Frey, M. R., Hilliard, V. C., Mullane, M. T. y Polk, D. B. (2010) *Laboratory Investigation* 90, 1415-1424). Puede ser que ErbB4 solo promueva la tumorigénesis en asociación con otros ErbB más francamente oncogénicos, como, por ejemplo, la heterodimerización de ErbB2/4 observada en cánceres colorrectales en etapa tardía (Lee, J. C., Wang, S. T., Chow, N. H. y Yang, H. B. (2002) *Eur J Cancer* 38, 1065-1071) o los resultados de Lee et al que identificaron los dímeros ErbB3/4 como promotores tumorales (Lee, D., Yu, M., Lee, E., Kim, H., Yang, Y., Kim, K., Pannicia, C., Kurie, J. M. y Threadgill, D. W. (2009) *J Clin Invest* 119, 2702-2713).

60 [0081] La capacidad de bloquear la apoptosis de colonocitos estimulada por citocinas, combinada con la disminución del riesgo de trastornos proliferativos en comparación con otros factores de crecimiento, hace que la NRG4 sea un tratamiento potencial atractivo para afecciones como la EII que implican una apoptosis elevada en el epitelio del intestino delgado o el colon (Qiu, W., Wu, B., Wang, X., Buchanan, M. E., Regueiro, M. D., Hartman, D. J., Schoen, R. E., Yu, J. y Zhang, L. (2011) *J Clin Invest* 121, 1722-1732; Di Sabatino, A., Ciccocioppo, R., Luinetti, O., Ricevuti, L., Morera, R., Cifone, M. G., Solcia, E. y Corazza, G. R. (2003) *Diseases of the colon and rectum* 46, 1498-1507). Como ErbB4 tiene una serie de características bioquímicas (incluido ser el único receptor para la NRG4) que lo distinguen de otros miembros de la familia ErbB (Carpenter, G. (2003) *Exp Cell Res* 284, 66-77), es una diana de señalización única y específica. A este respecto, las observaciones de que (a) NRG4 es deficiente tanto

5 en la EII humana como en la colitis murina (Figura 7A), y de que (b) aunque la expresión de ErbB4 sea elevada en el modelo de colitis de murino IL-10<sup>-/-</sup>, no está fosforilado/activado (Figura 7C), aumentan la posibilidad de que la regulación negativa de la NRG4 pueda conducir a una señalización de supervivencia de células epiteliales deficientes a pesar de la regulación positiva de ErbB4. De acuerdo con esta posibilidad, el trabajo reciente de Feng et al. mostró la pérdida de NRG4 en un modelo de nutrición parenteral total (Feng, Y. y Teitelbaum, D. H. (2012) American journal of physiology. gastrointestinal and liver physiology 302, G236-249), que se asocia con un aumento de las citocinas inflamatorias y una disminución de la fosforilación de Akt (Feng, Y., Ralls, M. W., Xiao, W., Miyasaka, E., Herman, R. S. y Teitelbaum, D. H. (2012) Annals of the New York Academy of Sciences 1258, 71-77). Un equilibrio desregulado de NRG4/ErbB4 y una relación alterada entre NRG4 y otros ligandos ErbB pueden ser características importantes de la EII que pueden abordarse con ligandos exógenos.

15 [0082] Los datos de este documento muestran que la activación selectiva de la tirosina quinasa del receptor ErbB4 con su ligando específico NRG4 es una señal de supervivencia en las células epiteliales del colon. Esta vía activa la señalización de PI3K/Akt y bloquea la apoptosis inflamatoria inducida por citocinas sin afectar a la proliferación o migración celular. Sin embargo, esta vía es deficiente en la EII debido a una pérdida del ligando. Nuestras observaciones subrayan las propiedades únicas del ErbB4 en comparación con otros miembros de la familia ErbB, y sugieren que la activación selectiva de ErbB4 representa una rama divergente de la señalización del receptor de tirosina quinasa con un posible uso terapéutico en lesiones o enfermedades inflamatorias.

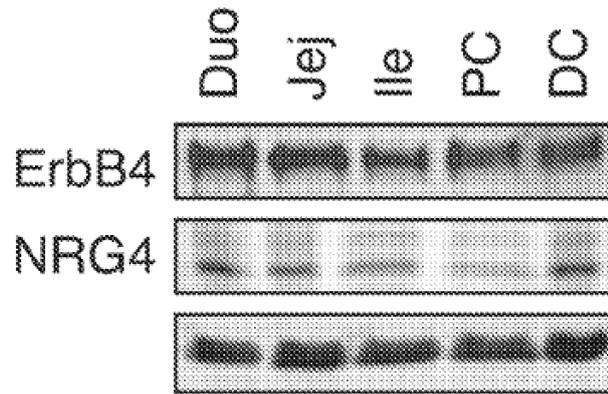
20 [0083] Anteriormente se han descrito varias formas de realización de la invención. Si bien estas descripciones describen directamente las formas de realización anteriores, se entiende que los expertos en la materia pueden concebir modificaciones y/o variaciones a las formas de realización específicas mostradas y descritas en este documento.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Composición que comprende Neuregulina-4 o un equivalente farmacéutico, análogo, derivado o una sal de la misma para usar en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal en un sujeto que lo necesite.
- 10 2. Composición que comprende Neuregulina-4 o un equivalente farmacéutico, análogo, derivado o una sal de la misma para usar en la inhibición de la muerte asociada a la inflamación de las células epiteliales del intestino delgado y del colon, en la que la inflamación es causada por la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis colágena, colitis linfocítica, colitis isquémica, colitis por derivación, enfermedad de Behcet o colitis indeterminada.
- 15 3. Composición para su uso según la reivindicación 2 para usar en la protección de células epiteliales del intestino delgado y del colon contra la muerte celular estimulada por la inflamación.
4. Composición que comprende Neuregulina-4 o un equivalente farmacéutico, análogo, derivado o una sal de la misma para usar en el tratamiento de la enterocolitis necrotizante en un sujeto que lo necesite.
- 20 5. Composición que comprende Neuregulina-4 o un equivalente farmacéutico, análogo, derivado o una sal de la misma para usar en la inhibición de la enterocolitis necrotizante en un sujeto que lo necesite.
- 25 6. Composición para su uso según la reivindicación 1 o 2, en la que la enfermedad inflamatoria intestinal o la causa de la muerte asociada a la inflamación de las células epiteliales del intestino delgado y del colon es la enfermedad de Crohn o la colitis ulcerosa.
7. Composición que comprende Neuregulina-4 o un equivalente farmacéutico, análogo, derivado o una sal de la misma para usar en la inhibición de la muerte celular inducida por *Cronobacter sakazakii* (CS).
- 30 8. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la Neuregulina-4 o un equivalente farmacéutico, análogo, derivado o una sal de la misma es para administración intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, oral o por inhalación.
- 35 9. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para administrar aproximadamente 100-200 mg/día, 200-300 mg/día, 300-400 mg/día, 400-500 mg/día, 500-600 mg/día, 600-700 mg/día, 700- 800mg/día, 800-900mg/día, 900-1000mg/día, 1000-1100mg/día, 1100-1200mg/día, 1200-1300mg/día, 1300-1400mg/día, 1400-1500mg/día, 1500-1600mg/día, 1600-1700mg/día, 1700-1800mg/día, 1800-1900mg/día o 1900-2000mg/día de Neuregulina-4 o un equivalente farmacéutico, análogo, derivado o una sal de la misma.
- 40 10. Composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para el tratamiento de un humano, un primate no humano, un mono, un simio, un perro, un gato, una vaca, un caballo, un conejo, un ratón o una rata.
- 45 11. Kit para usar en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal y/o la inhibición de la enfermedad inflamatoria intestinal en un sujeto que lo necesite, que comprende:
- (i) una composición como se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores; e  
(ii) instrucciones de uso de la composición para el tratamiento/la inhibición de la enfermedad inflamatoria intestinal.
- 50 12. Kit para su uso en el tratamiento de enterocolitis necrotizante y/o la inhibición de enterocolitis necrotizante en un sujeto que lo necesite, que comprende:
- (i) una composición como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10; y  
(ii) instrucciones de uso de la composición para el tratamiento/la inhibición de la enterocolitis necrotizante.

Figura 1

A.



B.

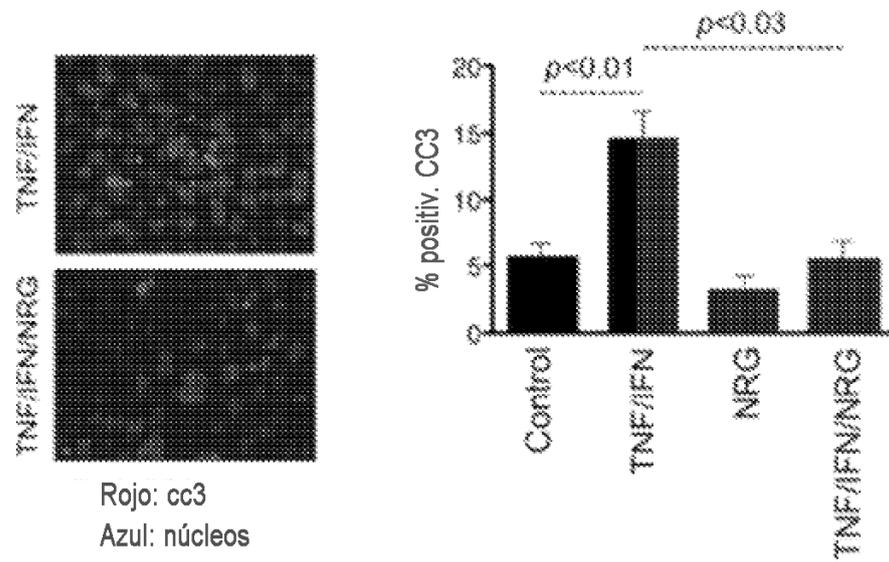


Figura 2

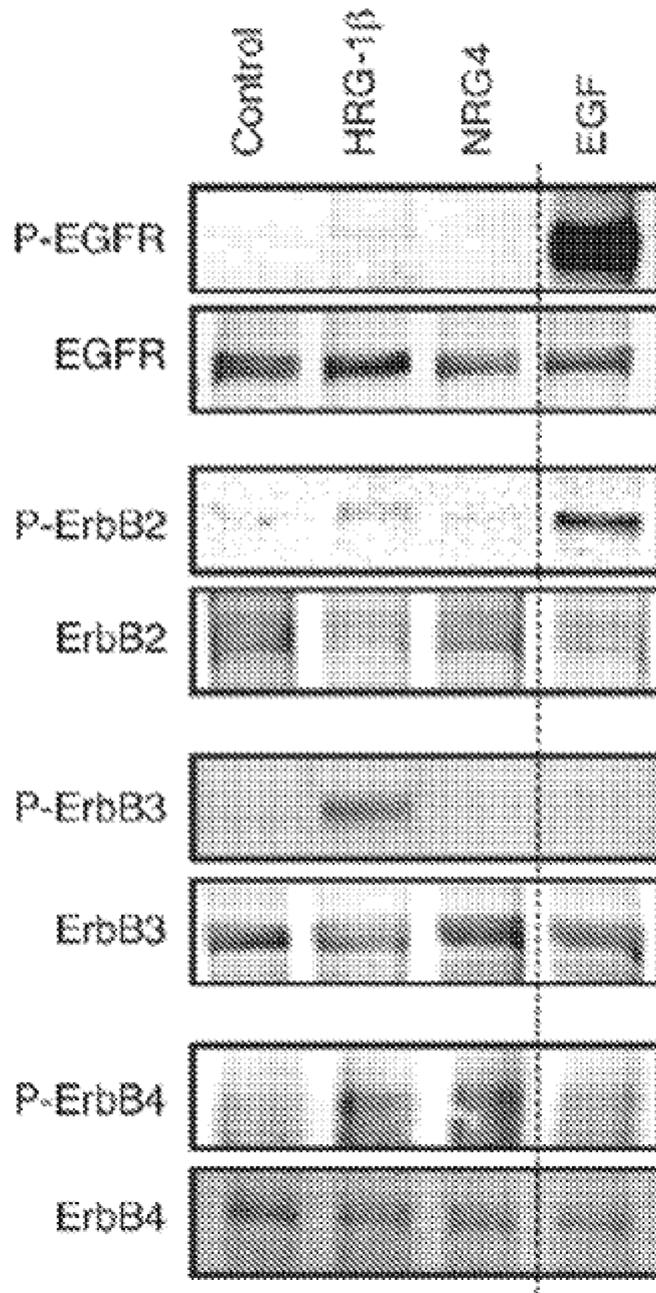


Figura 3

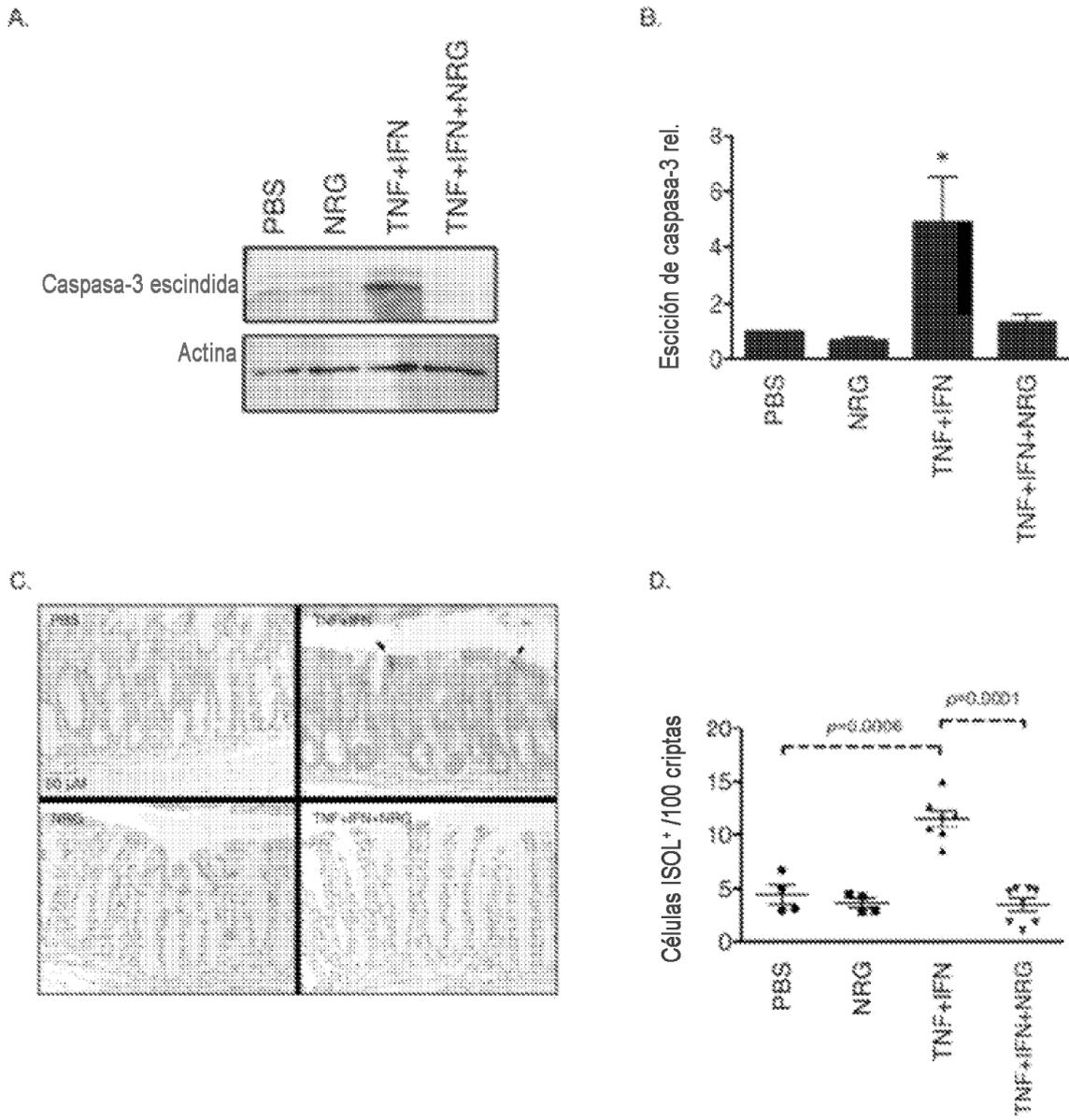


Figura 4

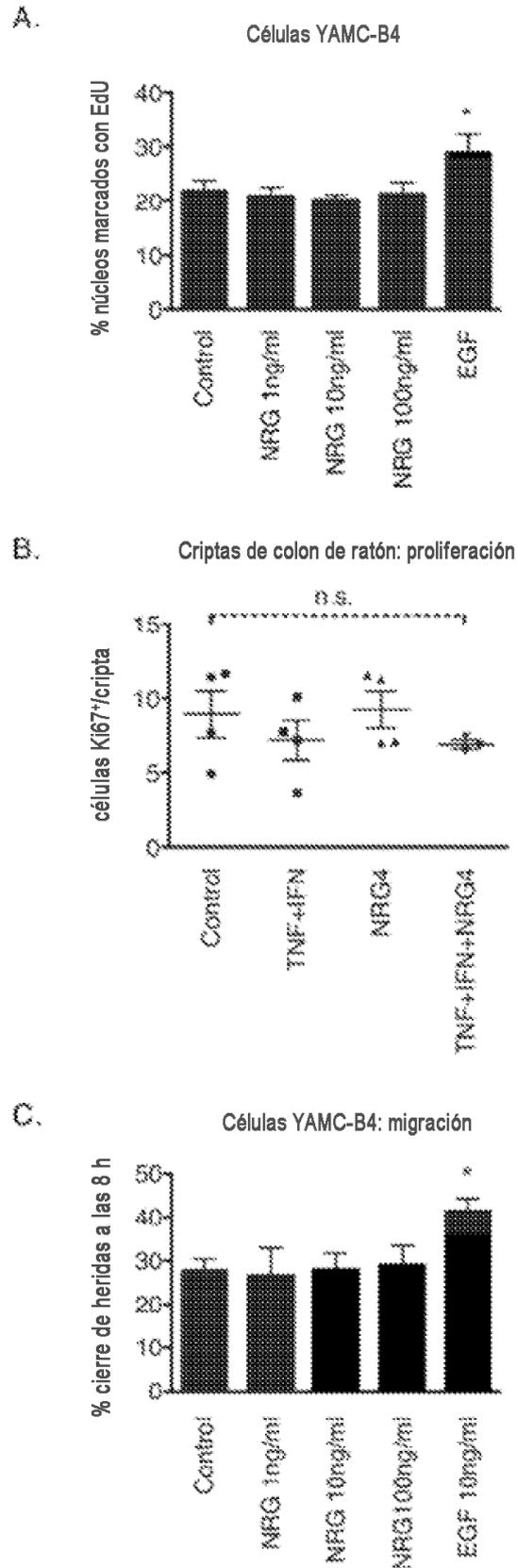


Figura 4 (cont.)

D.

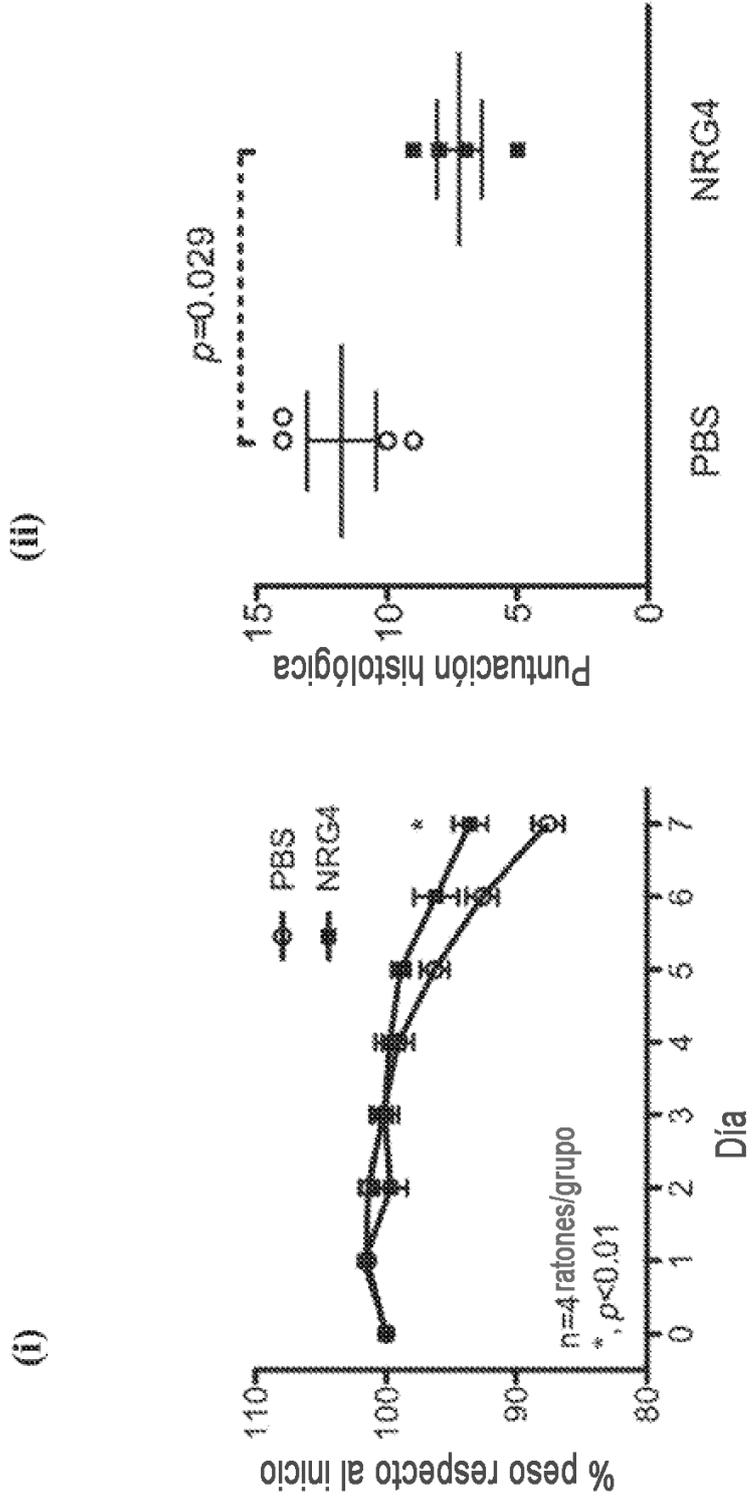


Figura 5

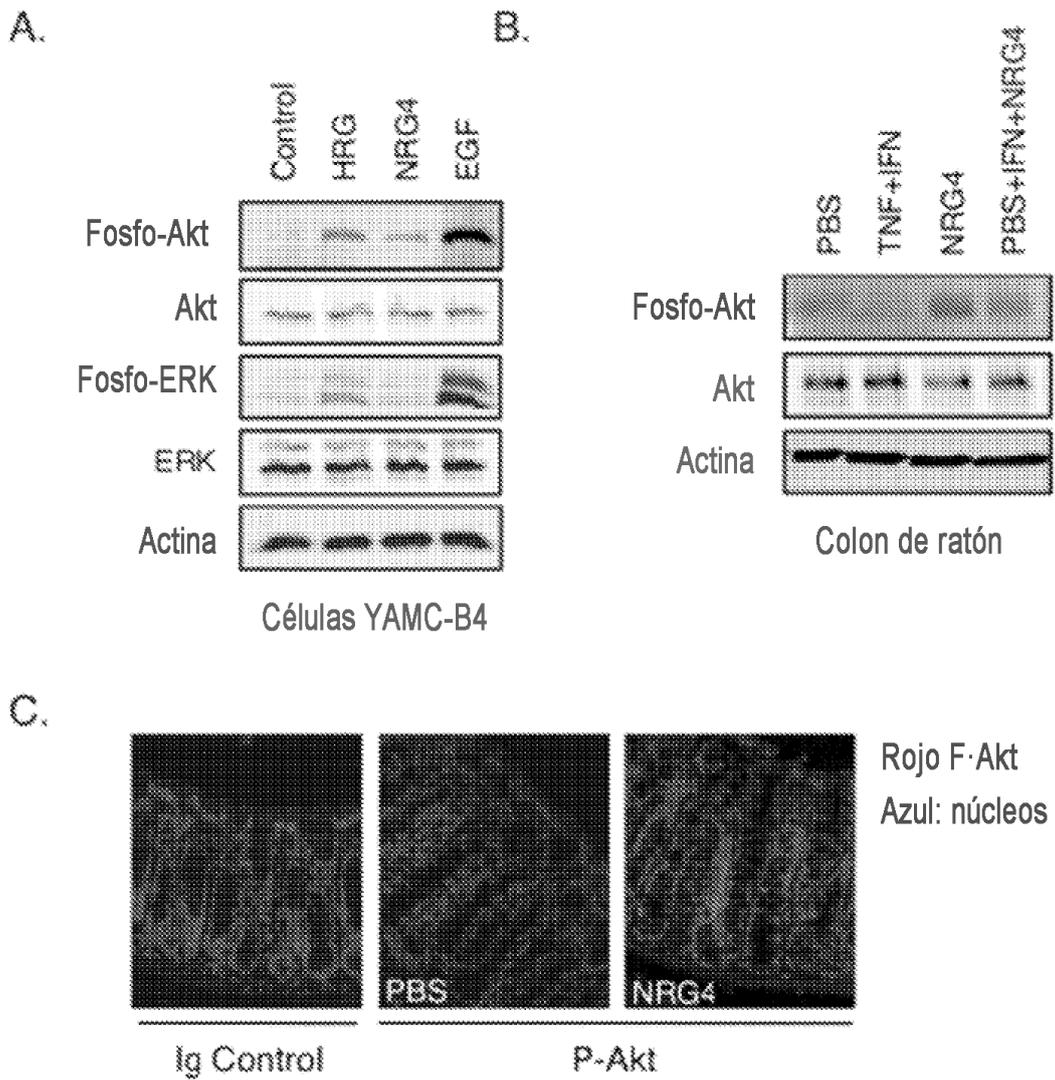


Figura 6

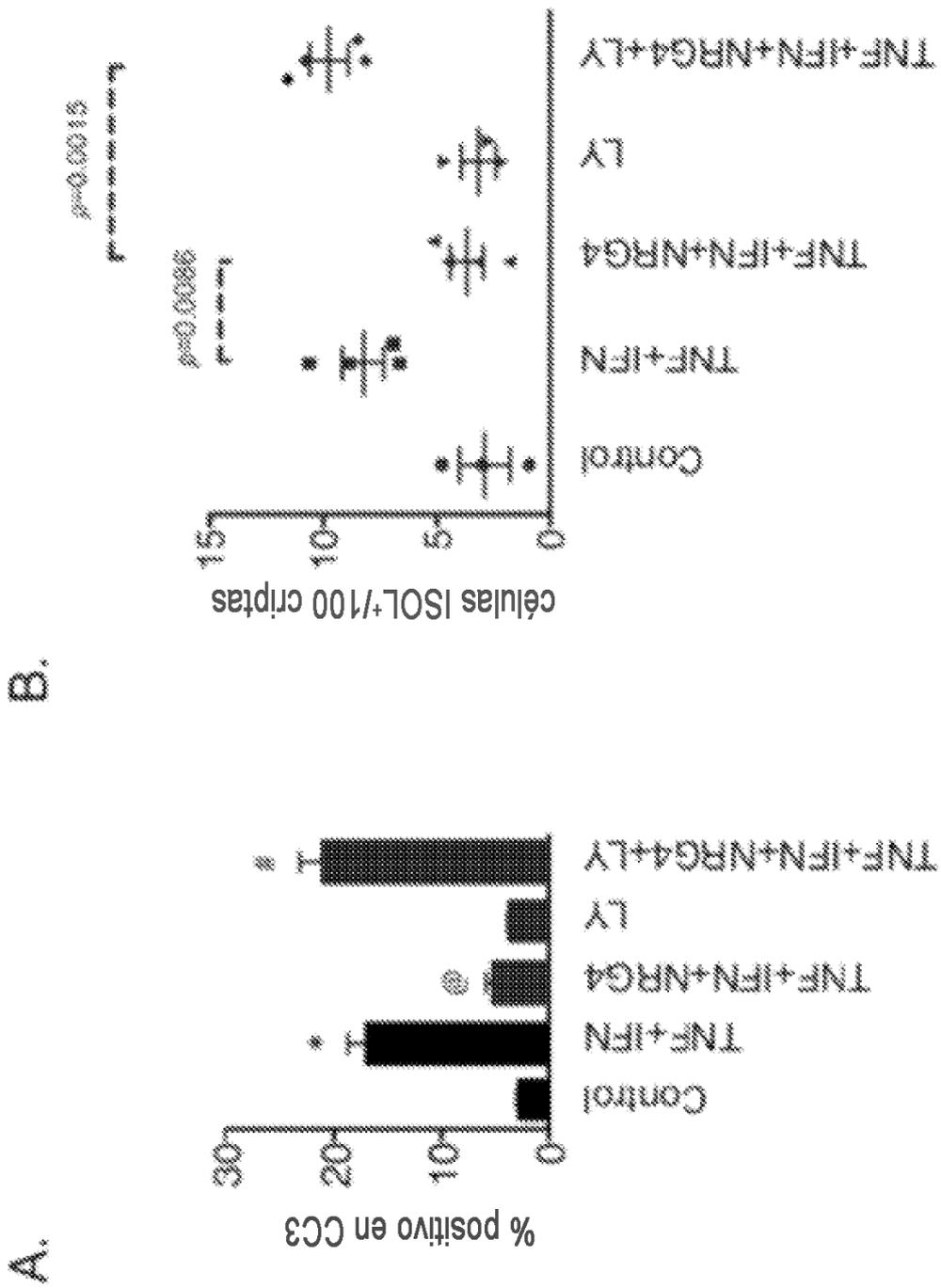


Figura 7

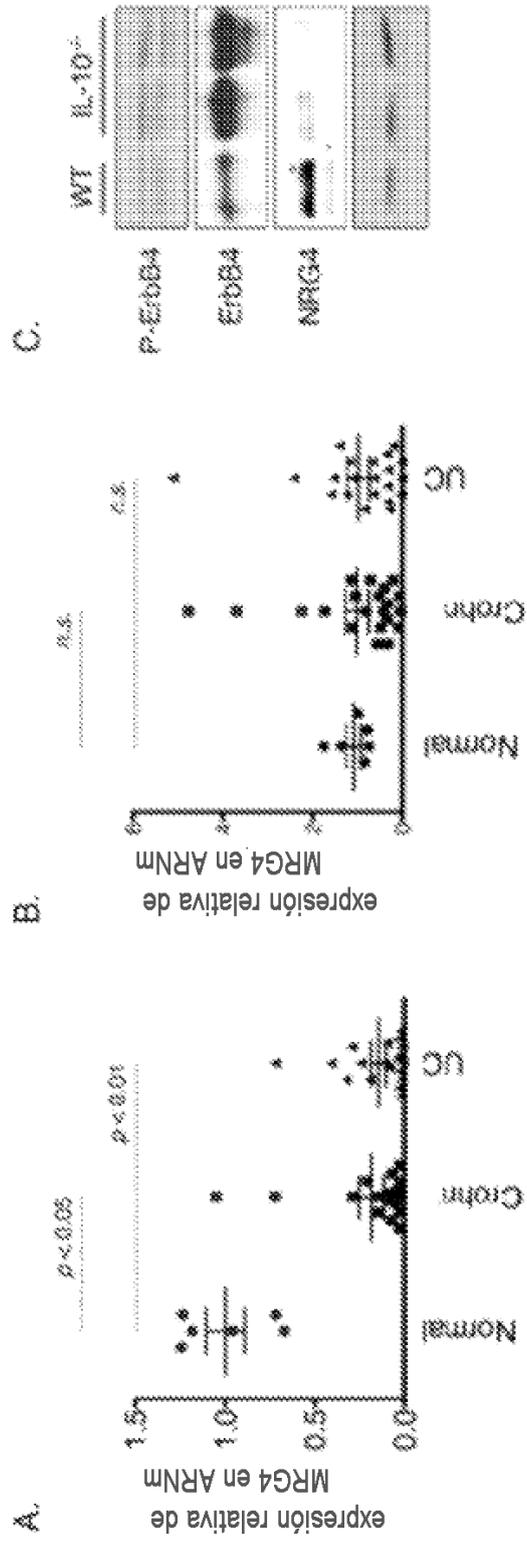


Figura 8

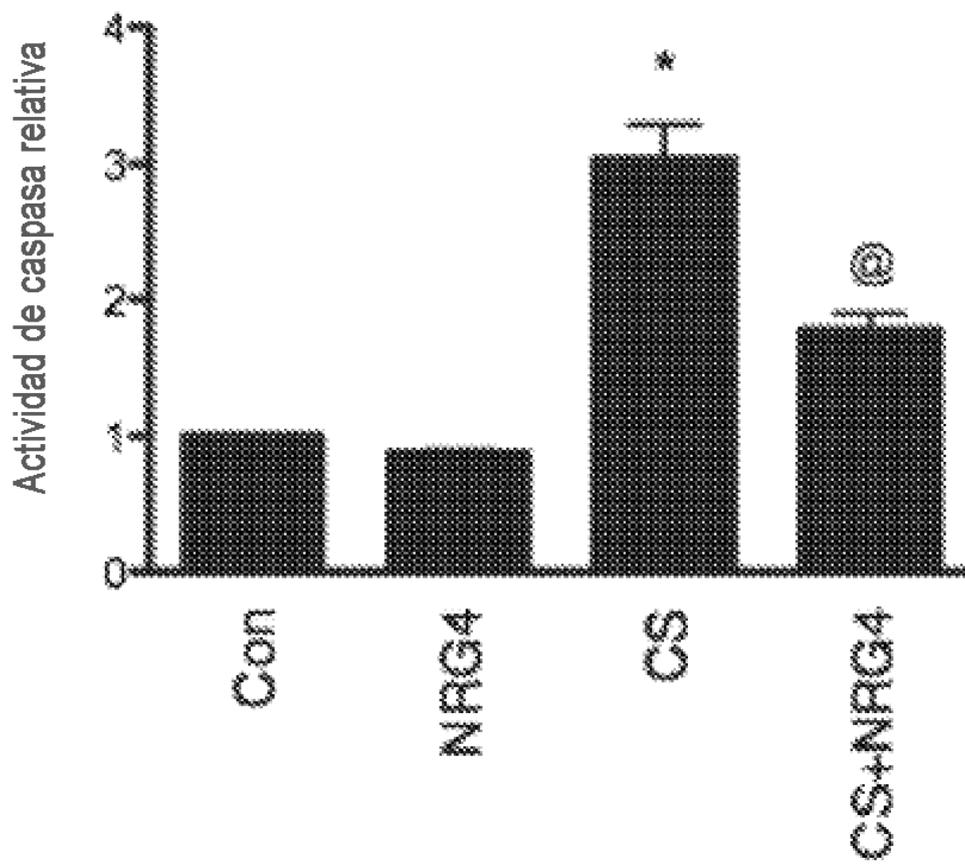
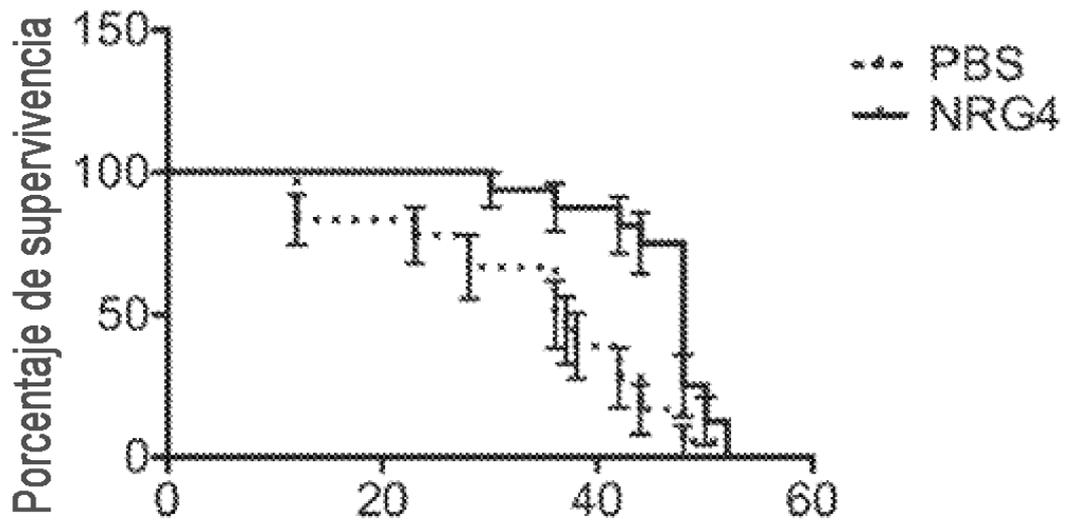


Figura 9



$p=0.0023$   
incremento del 33% en  
el tiempo de supervivencia