

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) **PI0619136-3 A2**

(22) Data de Depósito: 04/12/2006
(43) Data da Publicação: 13/09/2011
(RPI 2123)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 14/435
C12N 15/12
A61K 38/17
G01N 33/68
A61P 25/18
A61P 9/00
A61P 31/12

(54) Título: VARIANTE DE POLIPEPTÍDEO DE NEUREGULINA-1-BETA, POLINUCLEOTÍDEO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, KIT, E, MÉTODOS PARA PREVENÇÃO, TRATAMENTO, RETARDAMENTO DO DESENVOLVIMENTO DE DOENÇAS OU CONDIÇÕES, E PARA TRIAR UMA VARIANTE DE POLIPEPTÍDEO DE NEUREGULINA-1-BETA

(30) Prioridade Unionista: 02/12/2005 US 11/293,879

(73) Titular(es): Zensun (Shangai) Science & Technology Limited

(72) Inventor(es): Mingdong Zhou

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT CN2006003240 de 04/12/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/062594 de 07/06/2007

(57) Resumo: VARIANTE DE POLIPEPTÍDEO DE NEUREGULINA-1-BETA, POLINUCLEOTÍDEO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, KIT, E, MÉTODOS PARA PREVENÇÃO, TRATAMENTO, RETARDAMENTO DO DESENVOLVIMENTO DE DOENÇAS OU CONDIÇÕES, E PARA TRIAR UMA VARIANTE DE POLIPEPTÍDEO DE NEUREGULINA-1-BETA. A presente invenção proporciona variantes de polipeptídeo de neuregulina- 1 β (NRG- 1 β) têm intensificado ou decrescido a afinidade de ligação por ErbB3 e/ou ErbB4. A invenção também proporciona métodos de triagem e de produção de variantes de polipeptídeo de NRG- 1 β e métodos de uso de variantes de polipeptídeo de NRG- 1 β para tratar doenças.

“VARIANTE DE POLIPEPTÍDEO DE NEUREGULINA-1-BETA,
POLINUCLEOTÍDEO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, KIT, E,
MÉTODOS PARA PREVENÇÃO, TRATAMENTO, RETARDAMENTO DO
DESENVOLVIMENTO DE DOENÇAS OU CONDIÇÕES, E PARA TRIAR
5 UMA VARIANTE DE POLIPEPTÍDEO DE NEUREGULINA-1-BETA”

REFERÊNCIA CRUZADA AOS PEDIDOS
RELACIONADOS

Este pedido é uma continuação em parte do e reivindica o
benefício de prioridade do Pedido de Patente U.S. de Número Serial
10 11/293.879 depositado aos 2 de dezembro de 2005, que é aqui incorporado
como referência em sua inteireza.

CAMPO DA INVENÇÃO

Esta invenção refere-se em geral às variantes de neuregulina
que seletivamente ativam os receptores ErbB. A invenção proporciona
15 variantes de neuregulina e métodos para triar e usar tais variantes.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Tem sido demonstrado que a família de receptores de fator de
crescimento epidérmico, que compreende quatro membros EGFR, ErbB2,
ErbB3 e ErbB4, desempenha um papel importante em múltiplas funções
20 celulares, incluindo crescimento celular, diferenciação celular e sobrevivência
celular. São receptores de proteína-tirosina-cinase, consistindo de um domínio
de ligação de ligante extracelular, domínio de transmembrana e domínio de
tirosina-cinase citoplásmica. Têm sido identificados múltiplos ligantes de
receptor que medeiam a homo- ou heterodimerização de receptor sob ligação.
25 A associação de receptor específico resulta em padrões diferentes de
fosforilação, cascatas de sinalização complexas e múltiplas funções
biológicas, incluindo proliferação celular, prevenção de apoptose e promoção
de mobilidade, adesão e invasão de célula de tumor.

Neuregulina-1 é um ligante dos receptores ErbB3 e ErbB4.

Mais de 15 isoformas distintas de neuregulina-1 tem sido identificadas. Isoformas de neuregulina-1 podem ser divididas em dois grupos grandes, conhecidos como tipos α e β , baseando-se nas diferenças na estrutura de seus domínios de fator de crescimento epidérmico tipo-(EGF) essenciais. Tem sido

5 mostrado que os domínios de neuregulina-1 tipo EGF, variando em tamanho de 50 a 64-aminoácidos, são suficientes para ligar e ativar estes receptores. Estudos anteriores têm mostrado que neuregulina-1 β (NRG1 β) pode se ligar diretamente em ErbB3 e ErbB4 com afinidade alta. O receptor órfão, ErbB2, mantém uma conformação pré-ativada para facilitar a

10 heterodimerização com ErbB3 ou ErbB4 com afinidade aproximadamente 100 maior do que os homodímeros ErbB3 e ErbB4. Os receptores heterodiméricos atuam em tipos de célula distintos: ErbB2/ErbB3 no sistema nervoso periférico e ErbB2/ErbB4 no coração. Pesquisa em desenvolvimento neural tem indicado que a formação do sistema nervoso simpático requer um sistema

15 de sinalização de NRG-1 β , ErbB2 e ErbB3 intacto. Rompimento selecionado de NRG-1 β ou ErbB2 ou ErbB4 leva à letalidade embriônica devido aos defeitos de desenvolvimento cardíaco. Estudos recentes também realçaram os papéis de NRG1 β , ErbB2 e ErbB4 no desenvolvimento cardiovascular bem como na manutenção da função cardíaca de adulto. Tem sido mostrado que

20 NRG-1 β intensifica a organização de sarcômero em cardiomiócitos de adulto. A administração de curta duração de um domínio de NRG-1 β EGF recombinante significativamente melhora ou protege contra deterioração em desempenho do miocárdio em três modelos distintos em animal de insuficiência cardíaca. Mais importante, NRG-1 β significativamente prolonga

25 a sobrevivência de animais com insuficiência cardíaca. Estes efeitos tornam NRG-1 β promissora como um composto químico de partida ou terapêutico de amplo espectro para insuficiência cardíaca devido a uma variedade de doenças comuns. Contudo, ainda há uma necessidade de informação estrutural detalhada de NRG1 β em complexo com seus receptores para

projetar variantes de NRG-1 β para uso terapêutico.

5 Numerosos estudos computacionais empregando modelagem de homologia, simulações de dinâmica molecular e cálculos de energia livre têm sido realizados para interações de ligante-proteína e de proteína-proteína em nível atômico. Predição de energias livres de ligação de ligante-receptor absoluta é essencial em uma ampla variedade de pesquisas biofísicas tal como projeto de droga baseado em estrutura. Recentemente, uma nova abordagem computacional, a Molecular Mechanics Poisson Boltzmann Surface Area (MM-PBSA), tem sido usada para estudar interações de proteína-proteína.

10 MM-PBSA calcula as energias livres dos estados finais diretamente para se evitar a simulação consumidora de tempo dos estados intermediários. Este método combina energias mecânicas moleculares para o soluto com uma abordagem de solvente contínua e modo de análise normal para estimar as energias livres totais. Metodologia de escaneamento de alanina computacional

15 também tem sido usada para estudar as interações de proteína-proteína.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Em um aspecto, a presente invenção proporciona uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β compreendendo seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo compreende

20 um aminoácido diferente daquele em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo possui uma afinidade de ligação aumentada para ErbB3 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1, e na qual no resíduo 25 citado aminoácido diferente é A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y; no resíduo 35 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H,

25 I, L, N, M, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y; e/ou no resíduo 46 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, L, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, ou Y.

Em algumas modalidades, a variante de polipeptídeo consiste da seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:1, e na qual no resíduo 25 citado aminoácido diferente é A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q,

R, S, T, V, W, ou Y; no resíduo 35 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, L, N, M, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y; e/ou no resíduo 46 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, ou Y.

5 Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 25 citado aminoácido diferente é A; no resíduo 35 citado aminoácido diferente é A; e/ou no resíduo 46 citado aminoácido diferente é A.

10 Em algumas modalidades, a variante de polipeptídeo possui uma afinidade decrescida ou similar para ErbB4 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1. Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 25 citado aminoácido diferente é A. Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 35 citado aminoácido diferente é A. Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 46 citado aminoácido diferente é A.

15 A invenção também proporciona uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β compreendida de resíduos de aminoácido 1-52 de SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo compreende um aminoácido diferente daquele em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo possui uma afinidade de ligação aumentada para ErbB3 comparada com o
20 polipeptídeo consistindo de resíduos de aminoácido 1-52 de SEQ ID NO:1, e na qual no resíduo 25 citado aminoácido diferente é A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y; no resíduo 35 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, L, N, M, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y; e/ou no resíduo 46 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T,
25 V, W, ou Y.

Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 25 citado aminoácido diferente é A; no resíduo 35 citado aminoácido diferente é A; e/ou no resíduo 46 citado aminoácido diferente é A.

Em algumas modalidades, a variante de polipeptídeo possui

uma afinidade decrescida ou similar para um ErbB4 comparada com o polipeptídeo consistindo de resíduos de aminoácido 1-52 de SEQ ID NO:1. Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 25 citado aminoácido diferente é A. Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 35 citado aminoácido diferente é A. Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 46 citado aminoácido diferente é A.

A invenção também proporciona um polinucleotídeo compreendendo uma seqüência de ácido nucleico codificadora da variante de polipeptídeo aqui descrita que possui uma afinidade de ligação aumentada para ErbB3 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1 ou polipeptídeo consistindo de resíduos de aminoácido 1-52 de SEQ IN NO:1.

A invenção também proporciona uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade efetiva da variante de polipeptídeo aqui descrita que possui uma afinidade de ligação aumentada para ErbB3 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1 ou polipeptídeo consistindo de resíduos de aminoácido 1-52 de SEQ IN NO:1, ou o polinucleotídeo codificador da variante de polipeptídeo e um excipiente farmaceuticamente aceitável.

A invenção também proporciona um kit compreendendo a composição farmacêutica. Em algumas modalidades, o kit adicionalmente compreende uma instrução para usar a composição farmacêutica na prevenção, no tratamento, ou no retardamento de uma doença em um indivíduo via ativação de receptores ErbB2/ErbB3.

A invenção também proporciona um método para prevenção, tratamento, ou retardamento de desenvolvimento de esquizofrenia em um mamífero, compreendendo administrar a um mamífero, para o qual tal prevenção, tratamento ou retardamento é necessário ou desejável, uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade efetiva da

composição farmacêutica. Em algumas modalidades, o mamífero é um humano.

Em outro aspecto, a presente invenção proporciona uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β compreendendo seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo compreende um aminoácido diferente daquele em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo possui uma afinidade de ligação decrescida para ErbB4 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1, e na qual no resíduo 3 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y.

Em algumas modalidades, a variante de polipeptídeo consiste da seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:1, e na qual no resíduo 3 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y.

Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 3 citado aminoácido diferente é A.

Em algumas modalidades, a variante de polipeptídeo possui uma afinidade de ligação aumentada ou similar para ErbB3 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1. Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 3 citado aminoácido diferente é A.

A invenção também proporciona uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β compreendida de resíduos de aminoácido 1-52 de SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo compreende um aminoácido diferente daquele em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo possui uma afinidade de ligação decrescida para ErbB4 comparada com o polipeptídeo consistindo de resíduos de aminoácido 1-52 de SEQ ID NO:1, e na qual no resíduo 3 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y.

Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no

resíduo 3 citado aminoácido diferente é A.

Em algumas modalidades, a variante de polipeptídeo possui uma afinidade de ligação aumentada ou similar para um ErbB3 comparada com o polipeptídeo consistindo de resíduos de aminoácido 1-52 de SEQ ID NO:1. Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 3 citado aminoácido diferente é A.

A invenção também proporciona um polinucleotídeo compreendendo uma seqüência de ácido nucleico codificadora da variante de polipeptídeo aqui descrita que possui uma afinidade de ligação decrescida para ErbB4 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1 ou polipeptídeo consistindo de resíduos de aminoácido 1-52 de SEQ ID NO:1.

A invenção também proporciona uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade efetiva da variante de polipeptídeo aqui descrita que possui uma afinidade de ligação decrescida para ErbB4 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1 ou polipeptídeo consistindo de resíduos de aminoácido 1-52 de SEQ IN NO:1, ou o polinucleotídeo codificador da variante de polipeptídeo e um excipiente farmaceuticamente aceitável.

A invenção também proporciona um kit compreendendo a composição farmacêutica. Em algumas modalidades, o kit adicionalmente compreende uma instrução para usar a composição farmacêutica na prevenção, no tratamento, ou no retardamento de uma doença em um indivíduo via ativação de ErbB2/ErbB3.

A invenção também proporciona um método para prevenção, tratamento, ou retardamento de desenvolvimento de esquizofrenia em um mamífero, compreendendo administrar a um mamífero, para o qual tal prevenção, tratamento ou retardamento é necessário ou desejável, uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade efetiva da composição farmacêutica. Em algumas modalidades, o mamífero é um

humano.

Em outro aspecto, a presente invenção proporciona uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β compreendendo seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo compreende um aminoácido diferente daquele em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo possui uma afinidade de ligação aumentada para ErbB4 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1, e na qual no resíduo 16 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y; no resíduo 29 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, ou Y; no resíduo 31 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, ou Y; no resíduo 43 citado aminoácido diferente é A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y; e/ou no resíduo 47 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y.

Em algumas modalidades, a variante de polipeptídeo consiste da seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:1, e na qual no resíduo 16 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y; no resíduo 29 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, ou Y; no resíduo 31 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, ou Y; no resíduo 43 citado aminoácido diferente é A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y; e/ou no resíduo 47 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y.

Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 16 citado aminoácido diferente é A; no resíduo 29 citado aminoácido diferente é A; no resíduo 31 citado aminoácido diferente é A; no resíduo 43 citado aminoácido diferente é A; ou no resíduo 47 citado aminoácido diferente é A.

Em algumas modalidades, a variante de polipeptídeo possui

uma afinidade decrescida ou similar para um ErbB3 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1. Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 31 citado aminoácido diferente é A. Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 43 citado aminoácido diferente é A. Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 47 citado aminoácido diferente é A.

A invenção também proporciona uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β consistindo de resíduos de aminoácido 1-52 de SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo compreende um aminoácido diferente daquele em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo possui uma afinidade de ligação aumentada para ErbB4 comparada com o polipeptídeo consistindo de resíduos de aminoácido 1-52 de SEQ ID NO:1, e na qual no resíduo 16 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y; no resíduo 29 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, ou Y; no resíduo 31 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, ou Y; no resíduo 43 citado aminoácido diferente é A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y; e/ou no resíduo 47 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y.

Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 16 citado aminoácido diferente é A; no resíduo 29 citado aminoácido diferente é A; no resíduo 31 citado aminoácido diferente é A; no resíduo 43 citado aminoácido diferente é A; e/ou no resíduo 47 citado aminoácido diferente é A.

Em algumas modalidades, a variante de polipeptídeo possui uma afinidade decrescida ou similar para um ErbB3 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1. Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 31 citado aminoácido diferente é A. Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 43 citado aminoácido

diferente é A. Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 47 citado aminoácido diferente é A.

5 A invenção também proporciona uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β compreendendo seqüência de aminoácido de SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo compreende um aminoácido diferente daquele em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo possui uma afinidade de ligação decrescida para ErbB3 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1 mas possui afinidade de ligação para ErbB4 similar ao polipeptídeo de SEQ ID NO:1, e na qual no resíduo 33 citado
10 aminoácido diferente é A.

A invenção também proporciona uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β consistindo de resíduos de aminoácido 1-52 de SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo compreende um aminoácido diferente daquele em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo possui
15 uma afinidade de ligação decrescida para ErbB3 comparada com o polipeptídeo consistindo de resíduos de aminoácido 1-52 de SEQ ID NO:1 mas possui afinidade de ligação para ErbB4 similar ao polipeptídeo consistindo de resíduos de aminoácido 1-52 SEQ ID NO:1, e na qual no resíduo 33 citado aminoácido diferente é A.

20 A invenção também proporciona um polinucleotídeo compreendendo uma seqüência de ácido nucleico codificadora da variante de polipeptídeo aqui descrita que possui uma afinidade de ligação aumentada para ErbB4 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1 ou polipeptídeo consistindo de resíduos de aminoácido 1-52 de SEQ ID NO:1.

25 A invenção também proporciona uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade efetiva da variante de polipeptídeo aqui descrita que possui uma afinidade de ligação aumentada para ErbB4 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1 ou polipeptídeo consistindo de resíduos de aminoácido 1-52 de SEQ ID NO:1, ou o

polinucleotídeo codificador da variante de polipeptídeo e um excipiente farmaceuticamente aceitável.

5 A invenção também proporciona um kit compreendendo a composição farmacêutica. Em algumas modalidades, o kit adicionalmente compreende uma instrução para usar a composição farmacêutica na prevenção, no tratamento, ou no retardamento de uma doença em um indivíduo via ativação de receptores ErbB2/ErbB4.

10 A invenção também proporciona um método para prevenção, tratamento, ou retardamento de desenvolvimento de miocardite viral, cardiomiopatia (congestiva) dilatada, toxicidade cardíaca, insuficiência cardíaca, infarto do miocárdio em um indivíduo, compreendendo administrar ao indivíduo, para o qual tal prevenção, tratamento ou retardamento é necessário ou desejável, uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade efetiva da composição farmacêutica. Em algumas modalidades, o
15 mamífero é um humano.

Em outro aspecto, a invenção proporciona um método para a triagem de uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β possuindo afinidade de ligação aumentada para ErbB3, cujo método compreende: (a) estabelecer uma estrutura tridimensional de uma neuregulina-1 β ou de um seu
20 fragmento, um ErbB3, e um complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento ou do ErbB3 por modelagem de homologia; (b) estabelecer dados de mudanças conformacionais e estabilidade do complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento ou do ErbB3 em solução pelo método de simulação de dinâmica molecular; (c) calcular a energia livre de ligação subtotal ($\Delta G_{\text{subtotal}}$
25 tipo selvagem) da neuregulina-1 β ou do seu fragmento com o ErbB3 pelo método de Molecular Mechanics Poisson Boltzmann Surface Area (MM-PBSA); (d) calcular a energia livre de ligação subtotal ($\Delta G_{\text{subtotal}}$ variante alanina-substituída) de uma variante alanina-substituída da neuregulina-1 β ou do seu fragmento com o ErbB3 pelo método de Molecular Mechanics Poisson Boltzmann Surface

Area (MM-PBSA), na qual a variante alanina-substituída compreende um aminoácido da neuregulina-1 β ou do seu fragmento substituído, por uma alanina; (e) calcular $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}} = \Delta G_{\text{subtotal}} \text{ tipo selvagem} - \Delta G_{\text{subtotal}} \text{ variante alanina-substituída}$; e (f) selecionar variante alanina-substituída que possui um valor

5 positivo de $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ para o complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento ou do ErbB3; pelo qual uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β que possui afinidade de ligação aumentada para ErbB3 é identificada.

A invenção também proporciona um método para a triagem de

10 uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β possuindo atividade de ligação aumentada seletiva para ErbB3, cujo método compreende: (a) estabelecer uma estrutura tridimensional de uma neuregulina-1 β ou de um seu fragmento, um ErbB3, um ErbB4, um complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento ou do ErbB3, e um complexo da neuregulina-1 β ou do seu

15 fragmento e do ErbB4 por modelagem de homologia; (b) estabelecer dados de mudanças conformacionais e estabilidade do complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento ou do ErbB3, e do complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento e do ErbB4 em solução pelo método de simulação de dinâmica molecular; (c) calcular a energia livre de ligação subtotal ($\Delta G_{\text{subtotal}} \text{ tipo selvagem}$)

20 da neuregulina-1 β ou do seu fragmento com o ErbB3 ou o ErbB4 pelo método de Molecular Mechanics Poisson Boltzmann Surface Area (MM-PBSA); (d) calcular a energia livre de ligação subtotal ($\Delta G_{\text{subtotal}} \text{ variante alanina-substituída}$) de uma variante alanina-substituída da neuregulina-1 β ou do seu fragmento com o ErbB3 ou o ErbB4 pelo método de Molecular Mechanics Poisson

25 Boltzmann Surface Area (MM-PBSA), na qual a variante alanina-substituída compreende um aminoácido da neuregulina-1 β ou do seu fragmento substituído por uma alanina; (e) calcular $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}} = \Delta G_{\text{subtotal}} \text{ tipo selvagem} - \Delta G_{\text{subtotal}} \text{ variante alanina-substituída}$; (f) selecionar variante alanina-substituída que possui um valor positivo de $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ para o complexo da neuregulina-1 β ou

do seu fragmento ou do ErbB3, e possui um valor negativo ou um valor de cerca de zero para $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ para o complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento e do ErbB4; pelo qual uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β que possui afinidade de ligação aumentada seletiva para ErbB3 é identificada. Em algumas modalidades, uma variante alanina-substituída possuindo o valor negativo para $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ para o complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento e do ErbB4 é selecionada, pelo qual uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β que possui afinidade de ligação aumentada para ErbB3 mas afinidade de ligação decrescida para ErbB4 é identificada. Em algumas modalidades, uma variante alanina-substituída possuindo o valor de cerca de zero para $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ para o complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento e do ErbB4 é selecionada, pelo qual uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β que possui afinidade de ligação aumentada para ErbB3 mas afinidade de ligação não modificada para ErbB4 é identificada.

Em outro aspecto, a invenção proporciona um método para a triagem de uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β possuindo afinidade de ligação aumentada para ErbB4, cujo método compreende: (a) estabelecer uma estrutura tridimensional de uma neuregulina-1 β ou de um seu fragmento, um ErbB4, e um complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento e do ErbB4 por modelagem de homologia; (b) estabelecer dados de mudanças conformacionais e estabilidade do complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento e do ErbB4 em solução pelo método de simulação de dinâmica molecular; (c) calcular a energia livre de ligação subtotal ($\Delta G_{\text{subtotal}}$ tipo selvagem) da neuregulina-1 β ou do seu fragmento com o ErbB4 pelo método de Molecular Mechanics Poisson Boltzmann Surface Area (MM-PBSA); (d) calcular a energia livre de ligação subtotal ($\Delta G_{\text{subtotal}}$ variante alanina-substituída) de uma variante alanina-substituída da neuregulina-1 β ou do seu fragmento com o ErbB4 pelo método de Molecular Mechanics Poisson Boltzmann Surface

Area (MM-PBSA), na qual a variante alanina-substituída compreende um aminoácido da neuregulina-1 β ou do seu fragmento substituído por uma alanina; (e) calcular $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}} = \Delta G_{\text{subtotal}} \text{ tipo selvagem} - \Delta G_{\text{subtotal}} \text{ variante alanina-substituída}$; e (f) selecionar uma variante alanina-substituída que possui um valor

5 positivo de $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ para o complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento e do ErbB4; pelo qual uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β que possui afinidade de ligação aumentada para ErbB4 é identificada.

A invenção também proporciona um método para a triagem de

10 uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β possuindo atividade de ligação aumentada seletiva para ErbB4, cujo método compreende: (a) estabelecer uma estrutura tridimensional de uma neuregulina-1 β ou de um seu fragmento, um ErbB3, um ErbB4, um complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento ou do ErbB3, e um complexo da neuregulina-1 β ou do seu

15 fragmento e do ErbB4 por modelagem de homologia; (b) estabelecer dados de mudanças conformacionais e estabilidade do complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento ou do ErbB3, e do complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento e do ErbB4 em solução pelo método de simulação de dinâmica molecular; (c) calcular a energia livre de ligação subtotal ($\Delta G_{\text{subtotal}} \text{ tipo selvagem}$)

20 da neuregulina-1 β ou do seu fragmento com o ErbB3 ou o ErbB4 pelo método de Molecular Mechanics Poisson Boltzmann Surface Area (MM-PBSA); (d) calcular a energia livre de ligação subtotal ($\Delta G_{\text{subtotal}} \text{ variante alanina-substituída}$) de uma variante alanina-substituída da neuregulina-1 β ou do seu fragmento com o ErbB3 ou o ErbB4 pelo método de Molecular Mechanics Poisson

25 Boltzmann Surface Area (MM-PBSA), na qual a variante alanina-substituída compreende um aminoácido da neuregulina-1 β ou do seu fragmento substituído por uma alanina; (e) calcular $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}} = \Delta G_{\text{subtotal}} \text{ tipo selvagem} - \Delta G_{\text{subtotal}} \text{ variante alanina-substituída}$; (f) selecionar variante alanina-substituída que possui um valor positivo de $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ para o complexo da neuregulina-1 β ou

do seu fragmento e o ErbB4, e possui um valor negativo ou, um valor de cerca de zero para $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ para o complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento ou do ErbB3; pelo qual uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β que possui afinidade de ligação aumentada seletiva para ErbB4 é identificada. Em algumas modalidades, variante alanina-substituída possuindo um valor negativo para $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ para o complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento ou do ErbB3 é selecionada, pelo qual uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β que possui afinidade de ligação aumentada para ErbB4 mas afinidade de ligação decrescida para ErbB3 é identificada. Em algumas modalidades, variante alanina-substituída possuindo o valor de cerca de zero para $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ para o complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento ou do ErbB3 é selecionada, pelo qual uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β que possui afinidade de ligação aumentada para ErbB4 mas afinidade de ligação não modificada para ErbB3 é identificada.

A invenção também proporciona um método para a triagem de uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β possuindo afinidade de ligação não modificada para ErbB4 mas possui afinidade de ligação decrescida para ErbB3, cujo método compreende: (a) estabelecer uma estrutura tridimensional de uma neuregulina-1 β ou de um seu fragmento, um ErbB3, um ErbB4, um complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento ou do ErbB3, e um complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento e do ErbB4 por modelagem de homologia; (b) estabelecer dados de mudanças conformacionais e estabilidade do complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento ou do ErbB3, e do complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento e do ErbB4 em solução pelo método de simulação de dinâmica molecular; (c) calcular a energia livre de ligação subtotal ($\Delta G_{\text{subtotal}}$ tipo selvagem) da neuregulina-1 β ou do seu fragmento com o ErbB3 ou o ErbB4 pelo método de Molecular Mechanics Poisson Boltzmann Surface Area (MM-PBSA); (d) calcular a energia livre de ligação subtotal ($\Delta G_{\text{subtotal}}$ variante alanina-substituída) de

uma variante alanina-substituída da neuregulina-1 β ou do seu fragmento com o ErbB3 ou o ErbB4 pelo método de Molecular Mechanics Poisson Boltzmann Surface Area (MM-PBSA), na qual a variante alanina-substituída compreende um aminoácido da neuregulina-1 β ou do seu fragmento substituído por uma alanina; (e) calcular $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}} = \Delta G_{\text{subtotal}} \text{ tipo selvagem} - \Delta G_{\text{subtotal}} \text{ variante alanina-substituída}$; (t) selecionar variante alanina-substituída que possui um valor de cerca de zero para $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ para o complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento e do ErbB4 e possui um valor negativo para $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ para o complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento e o ErbB3; pelo qual uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β que possui afinidade de ligação não modificada para ErbB4 mas possui afinidade de ligação decrescida para ErbB3 é identificada.

A invenção também proporciona uma variante de polipeptídeo da neuregulina-1 β identificada pelos métodos aqui descritos.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

O depósito de patente ou pedido contém pelo menos um desenho executado em cor. Cópias desta patente ou publicação de pedido de patente com desenho(s) coloridos serão proporcionadas pelo Escritório sob solicitação e pagamento da taxa necessária.

Figura 1 mostra um alinhamento pareado entre (A) ErbB3 e EGFR, e (B) ErbB4 e EGFR usados para modelagem de homologia. Na seqüência, “*” refere-se aos resíduos idênticos, “:” refere-se às substituições conservativas; e “.” refere-se às substituições semi-conservativas. Os boxes indicam regiões estruturalmente conservadas.

Figura 2 mostra estereo-vistas de receptor refinado (A) ErbB3 (azul) e (B) ErbB4 (azul) traços C α superpostos sobre a estrutura de raios-X de EGFR (vermelho).

Figura 3 mostra diagramas de fita de modelos (A) NRG-1 β /ErbB3 e (B) NRG- β /ErbB4 (B). Cadeia de NRG-1 β em complexo é

vermelha. Domínios I, II, III, e IV no receptor estão coloridos de azul, verde, laranja e cinza, respectivamente. Os três sítios de ligação na interface estão esboçados. As figuras foram produzidas usando o programa MOLSCRIPT.

Figura 4 mostra estereo-vistas de (A) a superposição de melhor ajuste de átomos C α das coordenadas de NRG-1 β minimizadas (azul) sobre EGF (vermelho) e (B) as seqüências de aminoácidos alinhadas destas proteínas.

Figura 5 mostra desvios quadráticos médios para os átomos C α durante simulações dinâmicas de complexos de ErbB3 (linhas tracejadas) e ErbB4 (linhas sólidas) com NRG1 β .

Figura 6 mostra as interações entre ErbB3 e NRG-1 β sobre os três sítios de ligação, (A) a interface no sítio 1; (B) a interface no sítio 2; (C) a interface no sítio 3. Apenas as cadeias laterais de resíduos de interação são mostradas. Linhas tracejadas representam ligações de hidrogênio.

Figura 7 mostra as interações entre ErbB4 e NRG-1 β sobre os três sítios de ligação, (A) a interface no sítio 1; (B) a interface no sítio 2; (C) a interface no sítio 3. Apenas as cadeias laterais de resíduos de interação são mostradas. Linhas tracejadas representam ligações de hidrogênio.

Figura 8 mostra (A) a mudança da energia de ligação para os experimentos de mutagênese de escaneamento de alanina computacional para o complexo de ErbB3 com NRG1 β ; e (B) a mudança da energia de ligação para os experimentos de mutagênese de escaneamento de alanina computacional para o complexo de ErbB4 com NRG-1 β . Valores negativos em $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ indicam substituições elevadamente desfavoráveis. Valores positivos em $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ indicam as mutações de alanina de preferência para os resíduos.

Figura 9 mostra fosforilação de AKT em células COS7 co-expressando ErbB2&ErbB4 e ErbB2&ErbB3 após tratamento com neuregulina ou sua mutação (D43A). Na figura, Con significa a concentração

de neuregulina, P-AKT significa fosforilação de AKT.

Figura 10 mostra fosforilação de AKT em células COS7 co-expressando ErbB2&ErbB4 e ErbB2&ErbB3 após tratamento com neuregulina ou sua mutação (L3A). GAPDH é mostrado como controle de
5 quantidade de proteína.

Figura 11 mostra fosforilação de AKT em células COS7 co-expressando ErbB2&ErbB4 e ErbB2&ErbB3 após tratamento com neuregulina ou seu mutante duplo (8A47A). é mostrado como controle de
10 quantidade de proteína.

10 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Para claridade da descrição, e não por meio de limitação, a descrição detalhada é dividida em subseções que seguem.

A. Definições

A não ser que seja definido de outro modo, todos os termos
15 técnicos e científicos aqui usados possuem os mesmos significados como comumente entendidos por uma pessoa ordinariamente experiente na técnica à qual esta invenção pertence. Todas as patentes, pedidos, pedidos publicados e outras publicações aqui referidas são incorporadas em sua inteireza como referências. Se uma definição descrita nesta seção for contrária à ou
20 diferentemente inconsistente com uma definição descrita nas patentes, pedidos, pedidos publicados e outras publicações que são aqui incorporadas como referências, a definição descrita nesta seção prevalece sobre a definição que é aqui incorporada como referência.

Como aqui usado, “um” ou “uma” significa “pelo menos um”
25 ou “um ou mais”.

Como aqui usado, “neuregulina” ou “NRG” refere-se às proteínas ou peptídeos que podem se ligar em e ativar ErbB2/ErbB4 ou ErbB2/ErbB3 heterodímeros proteína cinases, tais como todas as isoformas de neuregulina, domínio EDF de neuregulina EGF apenas, mutantes de

neuregulina, e qualquer tipo de produtos de gene semelhante à neuregulina que também ativam os receptores acima. Neuregulina também inclui NRG-1, NRG-2, NRG-3, e NRG-4. Estas proteínas e polipeptídeos podem ativar os receptores ErbB acima e modular suas reações biológicas, e.g., estimular diferenciação de célula de câncer de mama e secreção de proteína de leite; induzir a diferenciação de célula de crista neural em célula Schwann; estimular síntese de acetilcolina em célula de músculo esquelético; e melhorar a sobrevivência de cardiócito e a síntese de DNA. Neuregulina também inclui aquelas variantes com substituições de aminoácido conservativas que na alteram substancialmente sua atividade biológica. Substituições conservativas adequadas de aminoácidos são conhecidas por aquelas pessoas experientes na técnica e podem ser feitas geralmente sem alteração da atividade biológica da molécula resultante. Aquelas pessoas experientes na técnica reconhecem que, em geral, substituições de aminoácido individuais em regiões não essenciais de um polipeptídeo não alteram substancialmente a atividade biológica (veja, e.g., Watson et al. *Molecular Biology of the Gene*, 4^a Edição, 1987, The Bejacmin/Cummings Pub. co., p.224). Proteína neuregulina inclui uma proteína e um peptídeo de neuregulina. Ácido nucleico de neuregulina inclui ácido nucleico de neuregulina e oligonucleotídeo de neuregulina.

Como aqui usado, “domínio de fator de crescimento tipo-epidérmico” ou “domínio de tipo-EGF” refere-se a um motivo de polipeptídeo codificado pelo gene de neuregulina que se liga em e ativa ErbB2, ErbB3, ErbB4, ou suas combinações, e possui uma similaridade estrutural ao domínio de ligação de receptor EGF como descrito em WO 00/64400, Holmes et al., *Science*, 256:1205-1210 (1992); Patentes U.S. de Nos. 5.530.109 e 5.716.930; 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); e WO 97/09425. Domínios de tipo-EGF podem ser derivados de NRG-1, NRG-1, NRG-3, ou

NRF-4. Domínios de tipo-EGF podem ser de subtipo α ou β .

Como aqui usado, um “fragmento ou derivado funcional” de neuregulina refere-se a um derivado ou fragmento da proteína neuregulina ou seu ácido nucleico codificador que ainda substancialmente retém sua
5 atividade viral anti-miocardite, anti-DCM, anti-cardiotóxica, ou anti-infarto do miocárdio. Normalmente, o derivado ou fragmento retém pelo menos 50% de sua atividade viral anti-miocardite, anti-DCM, anti-cardiotóxica, ou anti-infarto do miocárdio. Preferivelmente, o derivado ou fragmento retém pelo menos 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% e 100% de sua atividade viral anti-
10 miocardite, anti-DCM, anti-cardiotóxica, ou anti-infarto do miocárdio.

Como aqui usado, “erb” refere-se a dois oncogenes, erb A e erb B, associados com vírus de eritroblastose (um retrovírus de transformação aguda).

Como aqui usado, “uma quantidade efetiva do composto para
15 tratar uma doença particular” é uma quantidade que é suficiente para melhorar, ou em alguma maneira reduzir os sintomas associados com a doença. Tal quantidade pode ser administrada como uma dose única ou pode ser administrada de acordo com um regime, pelo qual ela é efetiva. A quantidade pode curar a doença mas, tipicamente, é administrada com o
20 objetivo de melhorar os sintomas da doença. Administração repetida pode ser requerida para alcançar a melhoria desejada dos sintomas.

Como aqui usado, “tratamento” ou “tratar” refere-se a qualquer maneira na qual os sintomas de uma condição, distúrbio ou doença são melhorados ou diferentemente benéficamente alterados. Tratamento
25 também inclui aqui qualquer uso farmacêutico das composições.

Como aqui usado, “melhoria” dos sintomas de um distúrbio particular pela administração da composição farmacêutica particular refere-se a qualquer diminuição, quer permanente quer temporária, duradoura ou transiente que pode ser atribuída à ou está associada com a administração da

composição.

Como aqui usado, “produção por meio recombinante” refere-se aos métodos de produção que usam métodos de ácido nucleico recombinantes que se baseiam em métodos bem conhecidos de biologia molecular para expressar proteínas codificadas por ácidos nucleicos clonados.

Como aqui usado, “complementar” quando se refere a duas moléculas de ácido nucleico, significa que as duas seqüências de nucleotídeos são capazes de hibridizar, preferivelmente com menos do que 25%, mais preferivelmente com menos do que 15 %, ainda mais preferivelmente com menos do que 5 %, muito mais preferivelmente sem más combinações entre nucleotídeos opostos. Preferivelmente as duas moléculas hibridizarão sob condições de estringência alta.

Como aqui usado: “estringência de hibridização” na determinação da má combinação percentual é como segue:

- 1) estringência alta: 0,1 x SSPE, 0,1% SDS, 65°C;
- 2) estringência média: 0,2 x SSPE, 0,1% SDS, 50°C (também referida como estringência moderada); e
- 3) estringência baixa: 1,0 x SSPE, 0,1% SDS, 50°C.

É entendido que estringências equivalentes podem ser alcançadas usando tampões, sais e temperaturas alternativas.

Como aqui usado, “vetor (ou plasmídeo)” refere-se aos elementos discretos que são usado para introduzir DNA heterólogo em células para sua expressão ou sua replicação. Seleção e uso de tais veículos são bem conhecidos pelo técnico experiente. Um vetor de expressão inclui vetores capazes expressarem DNAs que estão operacionalmente ligados com seqüências regulatórias, tais como regiões de promotor, que são capazes de efetuarem expressão de tais fragmentos de DNA. Assim, um vetor de expressão refere-se a um construto de DNA ou RNA recombinante, tal como um plasmídeo, um fago, vírus recombinante ou outro vetor que, sob

introdução em uma célula hospedeira apropriada, resulta em expressão do DNA clonado. Vetores de expressão apropriados são bem conhecidos por aquelas pessoas experientes na técnica e incluem aqueles que são replicáveis em células eucarióticas e/ou células procarióticas e aqueles que permanecem epissomais ou aqueles que se integram no genoma da célula hospedeira.

Como aqui usado, “uma região de promotor ou elemento de promotor” refere-se a um segmento de DNA ou RNA que controla a transcrição do DNA ou RNA no qual ele está operacionalmente ligado. A região de promotor inclui seqüências específicas que são suficientes para reconhecimento de RNA polimerase, ligação e iniciação de transcrição. Esta porção da região de promotor é referida como o promotor. Em adição, a região de promotor inclui seqüências que modulam esta atividade de reconhecimento, ligação e iniciação de transcrição da RNA polimerase. Estas seqüências podem ser de atuação cis ou podem ser responsivas aos fatores de atuação trans. Promotores, dependendo da natureza da regulação, podem ser constitutivos ou regulados. Promotores exemplares contemplados para uso em procariotos incluem promotores de bacteriófagos T7 e T3, e semelhantes.

Como aqui usado, “operacionalmente ligado ou operacionalmente associado” refere-se à relação funcional de DNA com seqüências regulatórias ou efetoras de nucleotídeos, tais como promotores, intensificadores, sítios de terminação de transcrição e de tradução, e outras seqüências de sinal. Por exemplo, ligação operativa de DNA em um promotor refere-se à relação física e funcional entre o DNA e o promotor de tal modo que a transcrição de tal DNA seja iniciada do promotor por uma RNA polimerase que especificamente reconhece, se liga em e transcreve o DNA. Com o objetivo de otimizar a expressão e/ou a transcrição in vitro, pode ser necessário remover, adicionar ou alterar porções não-traduzidas 5’ dos clones para eliminar códon (e.g., de iniciação) ou outras seqüências de iniciação de tradução extra, potencial inapropriada alternativa que podem interferir com ou

reduzir a expressão, em qualquer nível de transcrição ou tradução. Alternativamente, sítios de ligação de ribossomo de consenso (veja, e.g., Kozak, J. Biol. Chem., 266:19867-19870 (1991)) podem ser inseridos imediatamente 5' do códon de iniciação e podem intensificar a expressão. O

5 desejo de (ou a necessidade para) tal modificação pode ser empiricamente determinada.

Como aqui usado, “infarto do miocárdio” refere-se a um bloqueio de uma artéria coronária ou à uma interrupção do fluxo de sangue acarretando necrose focal de parte do miocárdio causada por isquemia severa

10 e persistente.

B. Variantes de NRG-1 β e composições farmacêuticas

[0076]A presente invenção proporciona variantes de polipeptídeo de NRG-1 polinucleotídeo codificador da variante de polipeptídeos e composições farmacêuticas.

15 Um fragmento de NRG-1 funcional de humano possui a sequência de aminoácidos:

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
20 Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr Gln (SEQ ID NO:1) que
corresponde aos aminoácidos 177-237 de NRG-1 de humano.

A sequência de ácido nucleico de humano codificadora do
fragmento é agccatcttg taaaatgtgc ggagaaggag aaaactttct gtgtgaatgg
aggggagtgcttcatggtga aagaccttgc aaaccctcgc agatacttgt gcaagtgcgc aaatgagttt
25 actggtgatc gctgcaaaaa ctacgtaatg gcgagcttct acaaggcgga ggagctgtaccag (SEQ
ID NO:2)

A presente invenção proporciona variantes de variantes de neuregulina-1 β que compreendem sequência de aminoácidos de SEQ ID NO:1 e compreendem um aminoácido diferente daquele em SEQ ID NO:1 no

resíduo 3, 8, 16, 25, 29, 31, 33, 35, 43, 46, ou 47. Em certas modalidades, variantes de neuregulina-1 β da presente invenção contêm um único substituto de aminoácido no resíduo 3, 8, 16, 25, 29, 31, 33, 35, 43, 46, ou 47 de SEQ ID NO:1. Em certas modalidades, variantes de neuregulina-1 β da presente invenção contêm múltiplas substituições de aminoácido no resíduo 3, 8, 16, 25, 29, 31, 33, 35, 43, 46, ou 47 de SEQ ID NO:1. Em algumas modalidades, variantes de neuregulina-1 β da presente invenção contêm duas, três, quatro, cinco ou seus substituições de aminoácido no resíduo 3, 8, 16, 25, 29, 31, 33, 35, 43, 46, ou 47 de SEQ ID NO:1.

10 Em um aspecto, a presente invenção refere-se a uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β compreendendo seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo compreende um aminoácido diferente daquele em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo possui uma afinidade de ligação aumentada para ErbB3 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1, e na qual no resíduo 25 citado aminoácido diferente é A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y; no resíduo 35 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, L, N, M, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y; e/ou no resíduo 46 citado aminoácido diferente é A, C, D; E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, ou Y.

20 Em algumas modalidades, a variante de polipeptídeo consiste da seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:1, e na qual no resíduo 25 citado aminoácido diferente é A, L, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W ou Y- no resíduo 35 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, L, N, M, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y; e/ou no resíduo 46 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, ou Y.

Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 25 citado aminoácido diferente é A; no resíduo 35 citado aminoácido diferente é A; e/ou no resíduo 46 citado aminoácido diferente é A.

Em algumas modalidades, a variante de polipeptídeo possui

uma afinidade de ligação decrescida ou similar para um ErbB4 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1. Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 25 citado aminoácido diferente é A. Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 35 citado aminoácido diferente é A. Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 46 citado aminoácido diferente é A.

A invenção também proporciona uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β consistindo de resíduos de aminoácido 1-52 de SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo compreende um aminoácido diferente daquele em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo possui uma afinidade de ligação aumentada para ErbB3 comparada com o polipeptídeo consistindo de resíduos de aminoácido 1-52 de SEQ ID NO:1, e na qual no resíduo 25 citado aminoácido diferente é A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y; no resíduo 35 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, L, N, M, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y; e/ou no resíduo 46 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, ou Y.

Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 25 citado aminoácido diferente é A; no resíduo 35 citado aminoácido diferente é A; e/ou no resíduo 46 citado aminoácido diferente é A.

Em algumas modalidades, a variante de polipeptídeo possui uma afinidade decrescida ou similar para um ErbB4 comparada com o polipeptídeo consistindo de resíduos de aminoácido 1-52 de SEQ ID NO:1. Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 25 citado aminoácido diferente é A. Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 35 citado aminoácido diferente é A. Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 46 citado aminoácido diferente é A.

Em outro aspecto, a presente invenção proporciona uma

variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β compreendendo seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo compreende um aminoácido diferente daquele em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo possui uma afinidade de ligação decrescida para ErbB4 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1, e na qual no resíduo 3 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y.

Em algumas modalidades, a variante de polipeptídeo consiste da seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:1, e na qual no resíduo 3 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y.

Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 3 citado aminoácido diferente é A.

Em algumas modalidades, a variante de polipeptídeo possui uma afinidade de ligação aumentada ou similar para ErbB3 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1. Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 3 citado aminoácido diferente é A.

A invenção também proporciona uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β compreendida de resíduos de aminoácido 1-52 de SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo compreende um aminoácido diferente daquele em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo possui uma afinidade de ligação decrescida para ErbB4 comparada com o polipeptídeo consistindo de resíduos de aminoácido 1-52 de SEQ ID NO:1, e na qual no resíduo 3 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y.

Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 3 citado aminoácido diferente é A.

Em algumas modalidades, a variante de polipeptídeo possui uma afinidade de ligação aumentada ou similar para um ErbB3 comparada

com o polipeptídeo consistindo de resíduos de aminoácido 1-52 de SEQ ID NO:1. Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 3 citado aminoácido diferente é A.

5 A invenção também proporciona um polinucleotídeo compreendendo uma sequência de ácido nucleico codificadora da variante de polipeptídeo aqui descrita que possui uma afinidade de ligação decrescida para ErbB4 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1 ou polipeptídeo consistindo de resíduos de aminoácido 1-52 de SEQ IN NO:1.

10 A invenção também proporciona uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade efetiva da variante de polipeptídeo aqui descrita que possui uma afinidade de ligação decrescida para ErbB4 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1 ou polipeptídeo consistindo de resíduos de aminoácido 1-52 de SEQ IN NO:1, ou o polinucleotídeo codificador da variante de polipeptídeo e um excipiente
15 farmaceuticamente aceitável.

A invenção também proporciona um kit compreendendo a composição farmacêutica. Em algumas modalidades, o kit adicionalmente compreende uma instrução para usar a composição farmacêutica na prevenção, no tratamento, ou no retardamento de uma doença em um
20 indivíduo via ativação de ErbB2/ErbB3.

A invenção também proporciona uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β compreendendo sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo compreende um aminoácido diferente daquele em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo possui
25 uma afinidade de ligação aumentada para ErbB4 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1, e na qual no resíduo 16 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y; no resíduo 29 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, ou Y; no resíduo 31 citado aminoácido diferente é A, C, D,

E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, ou Y; no resíduo 43 citado aminoácido diferente é A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y; e/ou no resíduo 47 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y.

5 Em algumas modalidades, a variante de polipeptídeo consiste da sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:1, e na qual no resíduo 16 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y; no resíduo 29 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, ou Y; no resíduo 31 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, ou Y; no resíduo 43 citado aminoácido diferente é A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y; e/ou no resíduo 47 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y.

15 Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 16 citado aminoácido diferente é A; no resíduo 29 citado aminoácido diferente é A; no resíduo 31 citado aminoácido diferente é A; no resíduo 43 citado aminoácido diferente é A; ou no resíduo 47 citado aminoácido diferente é A.

20 Em algumas modalidades, a variante de polipeptídeo possui uma afinidade decrescida ou similar para um ErbB3 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1. Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 31 citado aminoácido diferente é A. Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 43 citado aminoácido diferente é A. Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 47 citado aminoácido diferente é A.

25 A invenção também proporciona uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β consistindo de resíduos de aminoácido 1-52 de SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo compreende um aminoácido diferente daquele em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo possui

uma afinidade de ligação aumentada para ErbB4 comparada com o polipeptídeo consistindo de resíduos de aminoácido 1-52 os SEQ. ID NO: 1 e na qual no resíduo 16 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y; no resíduo 29 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, ou Y; no resíduo 31 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, ou Y; no resíduo 43 citado aminoácido diferente é A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, Q, S, T, V, W, ou Y; e/ou no resíduo 47 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y.

10 Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 16 citado aminoácido diferente é A; no resíduo 29 citado aminoácido diferente é A; no resíduo 31 citado aminoácido diferente é A; no resíduo 43 citado aminoácido diferente é A; ou no resíduo 47 citado aminoácido diferente é A.

15 Em algumas modalidades, a variante de polipeptídeo possui uma afinidade decrescida ou similar para um ErbB3 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1. Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 31 citado aminoácido diferente é A. Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 43 citado aminoácido diferente é A. Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 47 citado aminoácido diferente é A.

25 A invenção também proporciona uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β compreendendo seqüência de aminoácidos de SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo compreende um aminoácido diferente daquele em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo possui uma afinidade de ligação decrescida para ErbB3 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1 mas possui afinidade de ligação para ErbB4 similar ao polipeptídeo de SEQ ID NO:1, e na qual no resíduo 33 citado aminoácido diferente é A.

A invenção também proporciona uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β consistindo de resíduos de aminoácido 1-52 de SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo compreende um aminoácido diferente daquele em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo possui uma afinidade de ligação decrescida para ErbB3 comparada com o polipeptídeo consistindo de resíduos de aminoácido 1-52 de SEQ ID NO:1 mas possui afinidade de ligação para ErbB4 similar ao polipeptídeo consistindo de resíduos de aminoácido 1-52 SEQ ID NO:1, e na qual no resíduo 33 citado aminoácido diferente é A.

Os polipeptídeos da invenção podem ser produzidos por síntese química ou métodos recombinantes. Métodos de síntese química de polipeptídeos são bem conhecidos na técnica. Síntese de polipeptídeos usando métodos recombinantes é bem conhecida na técnica e é aqui mais adiante descrita. Os polipeptídeos gerados podem ser testados para sua afinidade de ligação para o receptor e ativação do receptor usando métodos conhecidos na técnica.

A invenção também proporciona um polinucleotídeo compreendendo uma seqüência de ácido nucleico codificadora de qualquer uma das variantes de polipeptídeo aqui descritas. Polinucleotídeos complementares a qualquer uma das seqüências também estão incluídos na presente invenção. Polinucleotídeos podem ser de fita única (codificadores ou de anti-senso) ou de fita dupla, e podem ser moléculas de DNA (genômico, cDNA ou sintético) ou RNA. Moléculas de RNA incluem moléculas de HnRNA, que contêm íntrons e correspondem a uma molécula de DNA em uma maneira de uma-para-uma, e moléculas de mRNA, que não contem íntrons. Seqüências codificadoras ou não-codificadoras adicionais podem, mas não necessitam, estar presentes dentro de um polinucleotídeo da presente invenção, e um polinucleotídeo pode, mas não necessita, estar ligado em outras moléculas e/ou materiais de suporte. Os polinucleotídeos desta

invenção podem ser obtidos usando síntese química, métodos recombinantes, ou PCR.

5 A invenção será apreciada por aquelas pessoas experientes na técnica, como um resultado da degeneração do código genético, pode haver seqüências de nucleotídeos que codificam polipeptídeo como aqui descrito. Polinucleotídeos que variam devido às diferenças em uso de códon são especificamente contemplados pela presente invenção.

10 Os polinucleotídeos aqui descritos podem ser clonados em vetores (tais como vetores de expressão) e transferidos para células hospedeiras para a produção de polipeptídeos. Embora o vetor de clonagem selecionado possa variar de acordo com a célula hospedeira intencionada para ser usada, vetores de clonagem úteis geralmente possuirão a capacidade para auto-replicarem, podem possuir um alvo único para uma endonuclease de restrição particular, e/ou podem trazer genes para um marcador que pode ser
15 usado em seleção de clones contendo o vetor. Exemplos adequados incluem plasmídeos e vírus bacterianos, e.g., pUC18, pUC19, Bluescript (e.g., pBS SK+) e seus derivados, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, DNAs de fago, e vetores bifuncionais tais como pSA3 e pAT28. Estes e muitos outros vetores de clonagem estão disponíveis em vendedores
20 comerciais tais como BioRad, Strategene, e Invitrogen.

Vetores de expressão geralmente são construtos de polinucleotídeo replicáveis que contêm um polinucleotídeo de acordo com a invenção. Está implicado que um vetor de expressão pode ser replicável nas células hospedeiras como epissomos ou como uma parte integral do DNA
25 cromossômico. Vetores de expressão adequados incluem mas não são limitados a plasmídeos, vetores virais, incluindo adenovírus, vírus adeno-associados, retrovírus, cosmídeos, e vetor(es) de expressão descrito(s) em Publicação PCT de No. WO 87/04462. Componentes de vetor podem geralmente incluir, mas não são limitados a, um ou mais dos seguintes: uma

seqüência de sinal; uma origem de replicação; um ou mais genes marcadores; elementos de controle de transcrição adequados (tais como promotores, intensificadores e terminador). Para expressão (i.e., tradução), um ou mais elementos de controle de tradução são normalmente requeridos, tais como

5 sítios de ligação de ribossomo, sítios de iniciação de tradução, e códons de terminação.

Os vetores contendo os polinucleotídeos de interesse podem ser introduzidos na célula hospedeira por qualquer um dos numerosos meios apropriados, incluindo eletroporação, transfecção empregando cloreto de

10 cálcio, cloreto de rubídio, fosfato de cálcio, DEAE-dextrano, ou outras substâncias; bombardeio de microprojétil; lipofecção; e infecção (e.g., onde o vetor é um agente infeccioso tal como vírus da vacínia). A escolha de introdução de vetores ou polinucleotídeos muitas vezes dependerá das características da célula hospedeira.

15 A invenção também proporciona células hospedeiras compreendendo qualquer um dos polinucleotídeos aqui descritos. Exemplos de células hospedeiras de mamífero incluem, mas não são limitados a, células COS, HeLa, e CHO. Veja também Publicação PCT de No. WO 87/04462. Células hospedeiras de não-mamífero adequadas incluem procariotes (tal

20 como *E. coli* ou *B. subtilis*) e levedura (tais como *S. cerevisiae*, *S. pombe*; ou *K. lactis*).

A invenção também proporciona uma composições farmacêuticas compreendendo qualquer uma das variantes de polipeptídeo de NRG-1 ou polinucleotídeos codificadores das variantes de polipeptídeo aqui

25 descritas e um veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável. Como aqui usado, “veículo ou excipiente farmacêuticamente aceitável” inclui qualquer material que, quando combinado com um ingrediente ativo, permite que o ingrediente retenha atividade biológica e seja não-reativo com o sistema imune do indivíduo. Exemplos incluem, mas não são limitados a, qualquer um

dos veículos farmacêuticos padrão tais como solução salina tamponada com fosfato, água, emulsões tal como emulsão de óleo/água, e vários tipos de agentes umectantes. Diluentes preferidos para administração parenteral ou de aerossol são solução salina tamponada com fosfato ou solução salina normal (0,9%). Composições compreendendo tais veículos são formuladas por métodos convencionais bem conhecidos (veja, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a edição, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; e Remington, The Science e Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing, 2000). Tipicamente, uma quantidade apropriada de um sal farmaceuticamente aceitável é usada na formulação para tornar a formulação isotônica. Exemplos de veículo incluem solução salina, solução de Ringer e solução de dextrose. O pH da solução é preferivelmente de cerca de 5 a cerca de 8, e mais preferivelmente de cerca de 7 a cerca de 7,5. Outros veículos incluem preparações de liberação prolongada tais como matrizes semipermeáveis de polímeros hidrofóbicos sólidos contendo o anticorpo, cujas matrizes estão na forma de artigos moldados, e.g., filmes, lipossomos ou micropartículas. Será aparente para aquelas pessoas experientes na técnica que certos veículos podem ser mais preferíveis dependendo de, por exemplo, da rota de administração e da concentração do polipeptídeo e do polinucleotídeo sendo administrado.

C. Métodos de triagem de variantes de polipeptídeo de NRG-1 β

A presente invenção também proporciona métodos de triagem de variantes de polipeptídeo de NRG-1. Por exemplo, modelos solvante-equilibrados dos complexos NRG-1 β /ErbB3 e NRG1 β /ErbB4 podem ser construídos usando uma estrutura de co-cristal de EGF/EGFR (veja Ogiso, H., et al., Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor e receptor extracellular domains. Cell 110, 775-787 (2002), cujo conteúdo é aqui incorporado como referência), como um ponto inicial, devido à

homologia alta deste ligante e família de receptores. Análise detalhada das interações atômicas entre as interfaces de NRG-1 β /ErbB3 e NRG1 β /ErbB4 é então conduzida. O método MM-PBSA é usado para calcular as energia livres para a ligação de ErbB3 e ErbB4 em NRG1 β . Em adição, mutagênese de escaneamento de alanina computacional de resíduos selecionados no sítio de ligação é realizada para racionalizar as afinidades dos dois receptores para NRG1 β . Os modelos computacionais criados de NRG-1 β /ErbB 3 e NRG1 β /ErbB4 devem permitir o planejamento de variantes de NRG1 β com afinidade e seletividades aumentadas para ErbB4, melhorando assim suas propriedades terapêuticas.

A invenção proporciona um método para a triagem de uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β possuindo afinidade de ligação aumentada para ErbB3, cujo método compreende: (a) estabelecer uma estrutura tridimensional de uma neuregulina-1 β ou de um seu fragmento, um ErbB3, e um complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento ou do ErbB3 por modelagem de homologia; (b) estabelecer dados de mudanças conformacionais e estabilidade do complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento ou do ErbB3 em solução pelo método de simulação de dinâmica molecular; (c) calcular a energia livre de ligação subtotal ($\Delta G_{\text{subtotal}}$ tipo selvagem) da neuregulina-1 β ou do seu fragmento com o ErbB3 pelo método de Molecular Mechanics Poisson Boltzmann Surface Area (MM-PBSA); (d) calcular a energia livre de ligação subtotal ($\Delta G_{\text{subtotal}}$ variante alanina-substituída) de uma variante alanina-substituída da neuregulina-1 β ou do seu fragmento com o ErbB3 pelo método de Molecular Mechanics Poisson Boltzmann Surface Area (MM-PBSA), na qual a variante alanina-substituída compreende um aminoácido da neuregulina-1 β ou o seu fragmento substituído por uma alanina; (e) calcular $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}} = \Delta G_{\text{subtotal}} \text{ tipo selvagem} - \Delta G_{\text{subtotal}} \text{ variante alanina-substituída}$; e (f) selecionar variante alanina-substituída que possui um valor positivo de $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ para o complexo da neuregulina-1 β ou o seu fragmento ou o

ErbB3; pelo qual uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β que possui afinidade de ligação aumentada para ErbB3 é identificada.

A invenção também proporciona um método para a triagem de uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β possuindo atividade de ligação aumentada seletiva para ErbB3, cujo método compreende: (a) estabelecer uma estrutura tridimensional de uma neuregulina-1 β ou de um seu fragmento, um ErbB3, um ErbB4, um complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento e do ErbB3, e um complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento e do ErbB4 por modelagem de homologia; (b) estabelecer dados de mudanças conformacionais e estabilidade do complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento ou do ErbB3, e do complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento e do ErbB4 em solução pelo método de simulação de dinâmica molecular; (c) calcular a energia livre de ligação subtotal ($\Delta G_{\text{subtotal}}$ tipo selvagem) da neuregulina-1 β ou do seu fragmento com o ErbB3 ou o ErbB4 pelo método de Molecular Mechanics Poisson Boltzmann Surface Area (MM-PBSA); (d) calcular a energia livre de ligação subtotal. ($\Delta G_{\text{subtotal}}$ variante alanina-substituída) de uma variante alanina-substituída da neuregulina-1 β ou do seu fragmento com o ErbB3 ou o ErbB4 pelo método de Molecular Mechanics Poisson Boltzmann Surface Area (MM-PBSA), na qual a variante alanina-substituída compreende um aminoácido da neuregulina-1 β ou o seu fragmento substituído por uma alanina; (e) calcular $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}} = \Delta G_{\text{subtotal}}$ tipo selvagem - $\Delta G_{\text{subtotal}}$ variante alanina-substituída; (f) selecionar variante alanina-substituída que possui um valor positivo de $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ para o complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento ou do ErbB3, e possui um valor negativo ou um valor de cerca de zero para $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ para o complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento e o ErbB4; pelo qual uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β que possui afinidade de ligação aumentada seletiva para ErbB3 é identificada. Em algumas modalidades, variante alanina-substituída possuindo um valor negativo para $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ para o complexo da neuregulina-1 β ou do

seu fragmento e do ErbB4 é selecionada, pelo qual uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β que possui afinidade de ligação aumentada para ErbB3 mas afinidade de ligação decrescida para ErbB4 é identificada. Em algumas modalidades, uma variante alanina-substituída possuindo o valor

5 de cerca de zero para $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ para o complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento e do ErbB4 é selecionada, pelo qual uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β que possui afinidade de ligação aumentada para ErbB3 mas afinidade de ligação não modificada para ErbB4 é identificada.

Em outro aspecto, a invenção proporciona um método para a

10 triagem de uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β possuindo afinidade de ligação aumentada para ErbB4, cujo método compreende: (a) estabelecer uma estrutura tridimensional de uma neuregulina-1 β ou de um seu fragmento, um ErbB4, e um complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento e do ErbB4 por modelagem de homologia; (b) estabelecer dados de mudanças

15 conformacionais e estabilidade do complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento e do ErbB4 em solução pelo método de simulação de dinâmica molecular; (c) calcular a energia livre de ligação subtotal ($\Delta G_{\text{subtotal}}$ tipo selvagem) da neuregulina-1 β ou do seu fragmento com o ErbB4 pelo método de Molecular Mechanics Poisson Boltzmann Surface Area (MM-PBSA); (d)

20 calcular a energia livre de ligação subtotal ($\Delta G_{\text{subtotal}}$ variante alanina-substituída) de uma variante alanina-substituída da neuregulina-1 β ou do seu fragmento com o ErbB4 pelo método de Molecular Mechanics Poisson Boltzmann Surface Area (MM-PBSA), na qual a variante alanina-substituída compreende um aminoácido da neuregulina-1 β ou do seu fragmento substituído por uma

25 alanina; (e) calcular $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}} = \Delta G_{\text{subtotal}} \text{ tipo selvagem} - \Delta G_{\text{subtotal}} \text{ variante alanina-substituída}$; e (f) selecionar variante alanina-substituída que possui um valor positivo de $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ para o complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento e do ErbB4; pelo qual uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β que possui afinidade de ligação aumentada para ErbB4 é

identificada.

A invenção também proporciona um método para a triagem de uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β possuindo atividade de ligação aumentada seletiva para ErbB4, cujo método compreende: (a) estabelecer uma estrutura tridimensional de uma neuregulina-1 β ou de um seu fragmento, um ErbB3, um ErbB4, um complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento ou do ErbB3, e um complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento e do ErbB4 por modelagem de homologia; (b) estabelecer dados de mudanças conformacionais e estabilidade do complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento ou do ErbB3, e do complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento e do ErbB4 em solução pelo método de simulação de dinâmica molecular; (c) calcular a energia livre de ligação subtotal ($\Delta G_{\text{subtotal}}$ tipo selvagem) da neuregulina-1 β ou do seu fragmento com o ErbB3 ou o ErbB4 pelo método de Molecular Mechanics Poisson Boltzmann Surface Area (MM-PBSA); (d) calcular a energia livre de ligação subtotal ($\Delta G_{\text{subtotal}}$ variante alanina-substituída) de uma variante alanina-substituída da neuregulina-1 β ou do seu fragmento com o ErbB3 ou o ErbB4 pelo método de Molecular Mechanics Poisson Boltzmann Surface Area (MM-PBSA), na qual a variante alanina-substituída compreende um aminoácido da neuregulina-1 β ou do seu fragmento substituído por uma alanina; (e) calcular $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}} = \Delta G_{\text{subtotal}}$ tipo selvagem - $\Delta G_{\text{subtotal}}$ variante alanina-substituída; (f) selecionar variante alanina-substituída que possui um valor positivo de $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ para o complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento e do ErbB4, e possui um valor negativo ou um valor de cerca de zero para $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ para o complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento ou do ErbB3; pelo qual uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β que possui afinidade de ligação aumentada seletiva para ErbB4 é identificada. Em algumas modalidades, uma variante alanina-substituída possuindo um valor negativo para $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ para o complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento ou do ErbB3 é selecionada, pelo qual

uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β que possui afinidade de ligação aumentada para ErbB4 mas afinidade de ligação decrescida para ErbB3 é identificada. Em algumas modalidades, uma variante alanina-substituída possuindo o valor de cerca de zero para $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ para o complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento ou do ErbB3 é selecionada, pelo qual uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β que possui afinidade de ligação aumentada para ErbB4 mas afinidade de ligação não modificada para ErbB3 é identificada.

A invenção também proporciona um método para a triagem de uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β possuindo afinidade de ligação não modificada para ErbB4 mas possui afinidade de ligação decrescida para ErbB3, cujo método compreende: (a) estabelecer uma estrutura tridimensional de uma neuregulina-1 β ou de um seu fragmento, um ErbB3, um ErbB4, um complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento ou do ErbB3, e um complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento e do ErbB4 por modelagem de homologia; (b) estabelecer dados de mudanças conformacionais e estabilidade do complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento e do ErbB3, e do complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento e do ErbB4 em solução pelo método de simulação de dinâmica molecular; (c) calcular a energia livre de ligação subtotal ($\Delta G_{\text{subtotal}}$ tipo selvagem) da neuregulina-1 β ou do seu fragmento com o ErbB3 ou o ErbB4 pelo método de Molecular Mechanics Poisson Boltzmann Surface Area (MM-PBSA); (d) calcular a energia livre de ligação subtotal ($\Delta G_{\text{subtotal}}$ variante alanina-substituída) de uma variante alanina-substituída da neuregulina-1 β ou do seu fragmento com o ErbB3 ou o ErbB4 pelo método de Molecular Mechanics Poisson Boltzmann Surface Area (MM-PBSA), na qual a variante alanina-substituída compreende um aminoácido da neuregulina-1 β ou do seu fragmento substituído por uma alanina; (e) calcular $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}} = \Delta G_{\text{subtotal}}$ tipo selvagem $\Delta G_{\text{subtotal}}$ variante alanina-substituída; (f) selecionar uma variante alanina-substituída que possui um valor de cerca

de zero para $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ para o complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento e do ErbB4 e possui um valor negativo para $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ para o complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento ou do ErbB3; pelo qual uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β que possui afinidade de
 5 ligação não modificada para ErbB4 mas possui afinidade de ligação decrescida para ErbB3 é identificada.

A invenção também proporciona uma variante de polipeptídeo da neuregulina-1 β identificada pelos métodos aqui descritos.

D. Métodos de uso de variantes de NRG-1 β

10 A invenção também proporciona métodos para a prevenção, o tratamento, ou o retardamento de doenças em um indivíduo compreendendo administrar ao indivíduo uma composição farmacêutica compreendendo uma variante de polipeptídeo de NRG-1 β aqui descrita via ativação de ErbB2/ErbB3 e/ou receptores ErbB2/ErbB4.

15 As doenças que podem ser prevenidas, tratadas, ou retardadas para o desenvolvimento incluem doenças ocorrendo em osso, ouvido, olho, pálpebra, cabeça, pescoço, coração, garganta, maxilar inferior; côndilo, mandíbula superior, boca, nariz, faringe nasal, cavidade oral, pâncreas, glândula parótida, pina, glândula pituitária, próstata, retina, glândula salivar,
 20 pele, músculo, medula óssea, glândula tireóide, amígdala, sistema neuronal, sistema respiratório, sistema digestivo, sistema circulatório, sistema reprodutivo, sistema urinário, sistema endócrino, sistema cardiovascular e o sistema hemopoiético.

25 Como aqui usado, um “indivíduo” é um mamífero, mais preferivelmente um humano. Mamíferos incluem, mas não são limitados a, animais de fazenda (tais como vacas, porcos, ovelhas, cabras), animais de esporte, animais de estimação (tais como gatos, cães, cavalos), primatas, camundongos e ratos.

Em algumas modalidades, as variantes de polipeptídeo de

neuregulina-1 β usadas para a prevenção, o tratamento ou o retardamento de uma doença possuem uma afinidade de ligação aumentada para receptores ErbB2/ErbB3. Em algumas modalidades, as variantes de polipeptídeo de neuregulina-1 β compreendem a seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo compreende um aminoácido diferente daquele em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo possui uma afinidade de ligação aumentada para ErbB3 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1, e na qual no resíduo 25 citado aminoácido diferente é A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y; no resíduo 35 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, L, N, M, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y; e/ou no resíduo 46 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, ou Y. Em algumas modalidades, a variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β consiste de resíduos de aminoácido 1-52 de SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo compreende um aminoácido diferente daquele em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo possui uma afinidade de ligação aumentada para ErbB3 comparada com o polipeptídeo consistindo de resíduos de aminoácido 1-52 de SEQ ID NO:1, e na qual no resíduo 25 citado aminoácido diferente é A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y; no resíduo 35 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, L, N, M, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y; ou no resíduo 46 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, ou Y. Em algumas modalidades da variante de polipeptídeos, no resíduo 25 citado aminoácido diferente é A; no resíduo 35 citado aminoácido diferente é A; e/ou no resíduo 46 citado aminoácido diferente é A.

As doenças que podem ser prevenidas, tratadas, ou retardadas para o desenvolvimento via preferivelmente ativação de receptores ErbB2/ErbB3 incluem doenças do sistema nervoso (tais como do sistema nervoso central, sistema nervoso periférico), esquizofrenia, doenças da

medula óssea, doenças de membrana, doenças desmielinizantes, doenças do sistema extrapiramidal. Em algumas modalidades, a doença do sistema nervoso é esquizofrenia.

Em algumas modalidades, as variantes de polipeptídeo de neuregulina-1 β usadas para a prevenção, o tratamento ou o retardamento de uma doença possui uma afinidade de ligação aumentada para receptores ErbB2/ErbB4. Em algumas modalidades, a variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β compreende a seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo compreende um aminoácido diferente daquele em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo possui uma afinidade de ligação aumentada para ErbB4 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1, e na qual no resíduo 16 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y; no resíduo 29 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, ou Y; no resíduo 31 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, ou Y; no resíduo 43 citado aminoácido diferente é A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y; e/ou no resíduo 47 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y. Em algumas modalidades, a variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β consiste de resíduos de aminoácido 1-52 de SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo compreende um aminoácido diferente daquele em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo possui uma afinidade de ligação aumentada para ErbB4 comparada com um polipeptídeo consistindo de resíduos de aminoácido 1-52 de SEQ ID NO:1, e na qual no resíduo 16 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y; no resíduo 29 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, ou Y; no resíduo 31 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, ou Y; no resíduo 43 citado aminoácido diferente é A, C, E, F, G, H, I,

K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y; e/ou no resíduo 47 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y. Em algumas modalidades da variante de polipeptídeo, no resíduo 16 citado aminoácido diferente é A; no resíduo 29 citado aminoácido diferente é A; no resíduo 31 citado aminoácido diferente é A; ou no resíduo 47 citado aminoácido diferente é A. Em algumas modalidades, as variantes de polipeptídeo de neuregulina-1 β usadas para a prevenção, o tratamento ou o retardamento de uma doença possui uma afinidade de ligação para receptores ErbB2/ErbB4 similar ao polipeptídeo de SEQ ID NO:1 ou ao polipeptídeo consistindo de resíduos de aminoácido 1-52 de SEQ ID NO:1, mas possui afinidade de ligação decrescida para ErbB3 do que o polipeptídeo de SEQ ID NO:1 ou o polipeptídeo consistindo de resíduos de aminoácido 1-52 de SEQ ID NO:1. Em algumas modalidades, a variante de polipeptídeo compreende a seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo compreende um aminoácido diferente daquele em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo possui uma afinidade de ligação decrescida para ErbB3 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1 mas possui afinidade de ligação para ErbB4 similar ao polipeptídeo de SEQ ID NO:1, e na qual no resíduo 33 citado aminoácido diferente é A.

Em algumas modalidades, as variantes de polipeptídeo de neuregulina-1 β usadas para a prevenção, o tratamento ou o retardamento de uma doença possui uma afinidade de ligação decrescida para receptores ErbB2/ErbB4. Em algumas modalidades, a variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β compreende a seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeos possui uma afinidade de ligação decrescida para ErbB4 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1, e na qual no resíduo 3 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y. Em algumas modalidades, a variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β consiste de resíduos de aminoácido 1-52 de

SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo compreende um aminoácido diferente daquele em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo possui uma afinidade de ligação aumentada para ErbB4 comparada com um polipeptídeo consistindo de resíduos de aminoácido 1-52 de SEQ ID NO:1, e
5 na qual no resíduo 3 citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y. Em algumas modalidades da variante de polipeptídeo, no resíduo 16 citado aminoácido diferente é A;

As doenças que podem ser prevenidas, tratadas, ou retardadas para desenvolvimento de ativação de receptores ErbB2/ErbB4 incluem, mas
10 não são limitadas a, insuficiência cardíaca, infarto do miocárdio, cardiomiopatia dilatada, e miocardite (e.g., miocardite viral), toxicidade cardíaca.

A formulação, dosagem e rota de administração de uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β aqui descrita, ou ácido nucleico
15 codificador de uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β , preferivelmente na forma de composições farmacêuticas, podem ser determinadas de acordo com métodos conhecidos na técnica (veja e.g., Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Alfonso R. Gennaro (Editor) Mack Publishing Company, April 1997; Therapeutic Peptides e
20 Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems, Banga, 1999; e Pharmaceutical Formulation. Development of Peptides and Proteins, Hovgaard e Frkjr (Ed.), Taylor & Francis, Inc., 2000; Medical Applications of Liposomes, Lasic e Papahadjopoulos (Ed.), Elsevier Science, 1998; Textbook of Gene Therapy, Jain, Hogrefe & Huber Publishers, 1998; Adenoviruses:
25 Basic Biology to Gene Therapy, Vol. 15, Seth, Landes Bioscience, 1999; Biopharmaceutical Drug Design and Development, Wu-Pong e Rojanasakul (Ed.), Humana Press, 1999; Therapeutic Angiogenesis: From Basic Science to the Clinic, Vol. 28, Dole et al. (Ed.), Springer-Verlag Nova Iorque, 1999). Uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β aqui descrita, ou um ácido

nucleico codificador de uma variante de polipeptídeo, podem ser formulados para administração oral, retal, tópica, de inalação, bucal (e.g., sublingual), parenteral (e.g., subcutânea, intramuscular, intradermal, ou intravenosa), transdermal ou qualquer outra rota de administração adequada. A rota mais adequada em qualquer caso dado dependerá da natureza e da severidade da condição sendo tratada e da natureza da variante de polipeptídeo particular de NRG-1 , ou do ácido nucleico codificador de uma variante de polipeptídeo, que está sendo usada.

Uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β como aqui descrita, ou um ácido nucleico codificador de uma variante de polipeptídeo, pode ser administrada(o) sozinha(o). Alternativa e preferivelmente, a variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β , ou ácido nucleico codificador de uma variante de polipeptídeo, é co-administrada(o) com um excipiente ou veículo farmaceuticamente aceitável. Qualquer excipiente ou veículo farmaceuticamente aceitável pode ser usado no presente método (veja e.g., Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Alfonso R. Gennaro (Editor) Mack Publishing Company, Abril 1997).

O ácido nucleico codificador de uma variante de polipeptídeo de NRG-1 β pode ser usado na forma de DNA nu, DNA complexado, DNA plasmídeo, RNA ou outras misturas dos mesmos como componentes do sistema de liberação de gene. Em outra modalidade, o ácido nucleico codificador de uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β , está incluído em um vetor viral. Quaisquer vetores virais que são adequados para terapia genética podem ser usados. Por exemplo, um vetor de adenovírus (Patente U.S. de No. 5.869.305), um vetor de vírus de símio (Patente U.S. de No. 5.962.274), um vetor viral de imunodeficiência de humano condicionalmente replicante (Patente U.S. de No. 5.888.767), retrovírus, SV40, vetores de amplicon virais do Herpes simples e vetores do vírus da Vacínia podem ser usados. Em adição, os genes podem ser liberados em um sistema de vetor

não-viral tal como um lipossomo no qual o lipídeo protege o DNA ou outros biomateriais da oxidação durante a coagulação.

De acordo com a presente invenção, uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β aqui descrita, ou um ácido nucleico
5 codificador de uma variante de polipeptídeo, sozinha(o) ou em combinação com outros agentes, veículos ou excipientes, pode ser formulada(o) para qualquer rota de administração adequada, tal como injeção intracarverna, injeção subcutânea, injeção intravenosa, injeção intramuscular, injeção intradermal, administração oral ou tópica. O método pode empregar
10 formulações para administração injetável em forma de dosagem unitária, em ampolas ou em recipientes de multidoses, com um conservante adicionado. As formulações pode tomar tais formas como suspensões, soluções, ou emulsões em veículos aquosos ou oleosos, e pode conter agentes de formulação tais como agentes de suspensão, de estabilização e/ou de
15 dispersão. Alternativamente, o ingrediente ativo pode estar na forma de pó para constituição com um veículo adequado, água estéril livre de pirogênio ou outros solventes, antes do uso. Administração tópica na presente invenção podem empregar o uso de uma espuma, um gel, um creme, uma pomada, um emplastro transdermal, ou uma pasta.

20 Composições farmacêuticas e métodos para sua administração que podem ser empregados para uso nesta invenção incluem, mas não são limitados àqueles descritos em Patentes U.S. de Nos. 5.736.154; 6.197.801 B1; 5.741.511; 5.886.039; 5.941.868; 6.258.374 B1; e 5.686.102.

A magnitude de uma dose terapêutica no tratamento ou na
25 prevenção variará com a severidade da condição a ser tratada e com a rota de administração. A dose, e talvez a frequência de dose, também variarão de acordo com a idade, o peso corporal, a condição e a resposta do paciente individual.

Deve ser notado que o médico atendente saberá como e

quando terminar, interromper ou ajustar a terapia para dosagem mais baixa devido à toxicidade, ou aos efeitos adversos. Inversamente, o médico também saberá como e quando ajustar o tratamento para níveis mais altos se a resposta clínica for inadequada (evitando efeitos colaterais tóxicos).

5 Qualquer rota de administração adequada pode ser usada. Formas de dosagem incluem tabletes, pastilhas, microcápsula, dispersões, suspensões, soluções, cápsulas, emplastros, e semelhante. Veja, Remington's Pharmaceutical Sciences.

10 Em uso prático, uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β , ou um ácido nucleico codificador de uma variante de polipeptídeo, sozinha(o) ou em combinação com outros agentes, pode ser combinada(o) como o ingrediente ativo em mistura íntima com um excipiente ou veículo farmaceuticamente aceitável, tal como beta-ciclodextrina e 2-hidróxi-propil-beta-ciclodextrina, de acordo com as técnicas de composição farmacêutica
15 convencionais. O veículo pode tomar uma forma ampla de preparação desejada para administração, tópica ou parenteral. Na preparação de composições para a forma de dosagem parenteral, tal injeção ou infusão intravenosa, meios farmacêuticos similares podem ser empregados, água, glicóis, óleos, tampões, açúcar, conservantes, lipossomos, e semelhante
20 conhecidos por aquelas pessoas experientes na técnica. Exemplos de tais composições parenterais incluem, mas não são limitados à dextrose 5 % p/v, solução salina normal ou outras soluções. A dose total da variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β , ou de ácido nucleico codificador de uma variante de polipeptídeo, sozinha(o) ou em combinação com outros agentes
25 pode ser administrada em um frasco de fluido intravenoso, variando de cerca de 1 mL a 2.000 mL. O volume de fluido de diluição variará de acordo com a dose total administrada.

A invenção também proporciona kits para realização de regimes terapêuticos da invenção. Tais kits compreendem em um ou mais

recipientes quantidades terapeuticamente efetivas de uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β aqui descrita, ou de ácido nucleico codificador de uma variante de polipeptídeo, sozinha(o) ou em combinação com outros agentes, em forma farmacêuticamente aceitável. Formas farmacêuticas preferidas estariam em combinação com solução salina estéril, solução de dextrose, ou solução tamponada, ou outro fluido estéril farmacêuticamente aceitável. Alternativamente, a composição pode ser liofilizada ou dessecada; neste caso, o kit opcionalmente compreende adicionalmente em um recipiente uma solução farmacêuticamente aceitável, preferivelmente estéril, para reconstituir o complexo para formar uma solução para propósitos de injeção.. Soluções farmacêuticamente aceitáveis exemplares são solução salina e solução de dextrose.

Em outra modalidade, um kit da invenção adicionalmente compreende uma agulha ou seringa, preferivelmente embalada na forma estéril, para injetar a composição, e/ou uma almofada de álcool embalada. Instruções são opcionalmente incluídas para administração de composição por um médico ou pelo paciente.

E. Exemplos

Os seguintes exemplos são incluídos apenas para propósitos ilustrativos e não são intencionados para limitarem o escopo da invenção.

Exemplo 1. Triagem para variantes de NRG-1 β que seletivamente ativam um receptor ErbB

Métodos

1. Construção de modelos em 3D das proteínas

A estrutura cristalina por raios-X de EGF de humano e de receptores extracelulares de receptor (PDB entrada 1IVO) e estrutura por NMR de domínio de fator de crescimento epidérmico tipo-(EGF) de neuregulina-alfa (NRG- α) (PDB entrada 1HAF) foram obtidas do Banco de Dados de Proteína. As seqüências de aminoácidos de ErbB3

(ERB3_HUMAN), ErbB4 (ERB4 HUMAN), e NRG1 β (NRG1 HUMAN) foram obtidas do banco de dados Swiss_Prot/TrEMBL.

Todos os modelos foram gerados usando o módulo de Homologia do programa de computador Insight II (Accelrys Corporate, San Diego, CA). As coordenadas de NMR de neuregulina- α foram usadas para modelar a estrutura inicial de neuregulina-1 β (NRG-1 β _{177.229}). Os alinhamentos de seqüências pareadas entre as seqüências alvo de ErbB3 e ErbB4 e a seqüência modelo EGFR foram realizados contra cada uma das seqüências de homologia, respectivamente. A posição da ligações de dissulfeto entre os resíduos de cisteína foi realizada usando os resíduos de cisteína alinhados do alvo e das pontes de dissulfeto correspondentes no modelo. As lacunas foram inseridas nas seqüências para encontrar um alinhamento ótimo com uma penalidade de lacuna independente de comprimento de 6. Os alinhamentos de seqüência final de ErbB3 e ErbB4 com EGFR são mostrados em Figura 1. Regiões de similaridade estrutural foram selecionadas e empregadas para construir um molde para a estrutura modelo. Sempre que dois resíduos alinhados foram os mesmos, a geometria de cadeira lateral de modelo foi adotada no alvo. Caso contrário, a cadeia lateral no modelo foi substituída por aquela do resíduo alvo correspondente pelo alinhamento das ligações de C α -C β . Regiões de lacuna foram geradas pela pesquisa de um fragmento adequado da triagem de banco de dados de proteínas e do banco de dados de casa. A conformação de alça final foi escolhida de uma das 10 estruturas de topo que tinham os menores valores de média quadrática (RMS) com as geometria compatíveis entre o alvo e um fragmento adequado. Alguns átomos faltantes também foram adicionados nas cadeias laterais incompletas de cada um destes modelos usando o módulo Biopolymer em Sybyl para garantir a designação apropriada de hidrogênios e carga atômica. Os modelos preliminares foram então submetidos para avaliação por PROCHECK e Perfis-3D para examinar a qualidade

estereoquímica e a estrutura de proteína dos modelos. Na avaliação de modelo por Perfis-3D, foi determinado um escore de auto-compatibilidade (S) para cada resíduo na sequência.

Após os modelos iniciais de ErbB3, ErbB4 e NRG1 β serem
5 construídos separadamente, complexos NRG-1 β /ErbB3 e NRG1 β /ErbB4
foram constituídos por sobreposição dos modelos com o complexo
EGF/EGFR. As estruturas resultantes foram otimizadas por minimização de
energia usando o campo de força Amber implementado no pacote de
programa de computador Sybyl. Os átomos de estrutura principal de todos os
10 resíduos de modelo foram primeiro fixados durante os estágios iniciais de
refinamento para prevenir a deformação significativa da estrutura principal.
Então o número de restrições aplicadas no modelo foi reduzido durante os
ciclos subseqüentes. Para minimização os seguintes parâmetros foram
utilizados: campo de força de átomo-unido-de Kollman e carga de átomo-
15 unido, constante dielétrica dependente de distância de 4,0R, corte de 9,5 Å
para cálculos não-ligados, e minimização de gradiente conjugado até o
gradiente de média quadrática (RMS) na energia fosse menor do que 0,05
kcal/mol.Å. Os modelos refinados foram então submetidos às simulações de
dinâmica molecular.

20 2. Estimativa da contribuição de ligação de ligante pelas
simulações dinâmicas moleculares de NRG-1 β em complexo com o receptor

Foram realizados várias simulações de dinâmica molecular
(MD) sobre complexos de proteína e estruturas mutantes separadamente
usando o pacote de simulação AMBER 7.0 e o campo de força Parm99. As
25 estruturas complexas foram solucionadas usando uma caixa de moléculas de
água TIP3P se estendendo pelo menos 10 Å além do limite de quaisquer
átomos de proteína. A estrutura de NRG-1 β /ErbB3 foi solucionada em uma
caixa de 100 x 96 x 83 Å de 7976 moléculas de água TIP3P, e a estrutura de
NRG-1 β /ErbB4 foi solucionada em uma caixa de 104 x 102 x 87 Å de 8075

moléculas de água TIP3P. Um número apropriado de contra-íons foi adicionado para neutralizar o sistema. O método de Particle Mesh Ewald (PME) foi empregado para calcular as interações eletrostáticas de longo alcance. Todas as corridas de MD foram configuradas usando o mesmo protocolo. Primeiro, os complexos de solvente foram submetidos a 200 etapas de minimização usando o método de descida mais íngreme seguido pelo gradiente conjugado para remover contatos próximos de van der Waals. Então, foi realizada uma segunda minimização de 500 etapas sobre os complexos inteiros de água-ligante-proteína.

As estruturas relaxadas foram então submetidas às simulações de MD. Cada sistema foi gradualmente aquecido de 0 para 300 K em 15 ps com três intervalos, e então equilibrado por 25 ps a 300 K, seguido pela corrida de coleta de dados, dando um tempo de simulação total de 1100 ps para NRG1 β /ErbB3 e 900 ps para NRG-1 β /ErbB4. O corte de não-ligado foi ajustado em 8,0 Å e os pares não-ligados foram atualizados a cada 25 etapas. O método SHAKE foi aplicado para restringir todas as ligações covalentes envolvendo os átomos de hidrogênio. Cada simulação foi acoplada em um banho térmico de 300K tem pressão de 101,325 kPa pela aplicação do algoritmo de Berendsen. Os parâmetros de acoplamento de temperatura e pressão foram ajustados como 0,2 ps e 0,05 ps, respectivamente. Uma etapa de tempo de integração para os cálculos de dinâmica molecular foi de 2 fs. Nas minimizações de energia e simulações de dinâmica molecular, condições limites periódicas foram aplicadas em todas as direções. Simulações MD foram corridas em um computador SGI Origin3800 no Shanghai Institute of Materia Medica.

As análises das simulações focalizaram os estágios de produção. Os desvios quadráticos médios (RMSDs) da estrutura principal foram calculados das trajetórias de intervalos de 1 ps, com a estrutura inicial como a referência. A flutuação da média quadrática (RMSF) de cada resíduo

foi calculada similarmente. As interações de ligação entre receptores e ligante foram analisadas nos modelos completos usando o programa LIGPLOT. 3. Cálculo de energia livre de NRG-1 β em complexo com o receptor pelo método MM-PBS[00147] Coordenadas da trajetória dinâmica foram usadas a
 5 cada 4 ps (100 instantâneos de 400 ps foram processados), e o cálculo de MM-PBSA foi realizado em cada uma delas usando o programa AMBER 7.0. Para cada instantâneo coletado durante a simulação, a energia livre de ligação de ligante-proteína ($\Delta G_{\text{ligação}}$) foi calculada usando a Eq. (1):

$$\Delta G_{\text{ligação}} = \Delta G_{\text{complexo}} - [\Delta G_{\text{proteína}} + \Delta G_{\text{ligante}}] \quad (1)$$

10 onde $\Delta G_{\text{complexo}}$, $\Delta G_{\text{proteína}}$ e $\Delta G_{\text{ligante}}$ são as energias livres do complexo, da proteína e do ligante. Cada termo de energia livre em Eq. (1) foi calculado com a energia livre absoluta da espécie (proteína, ligante e seu complexo) na fase gasosa (E_{gas}), a energia livre de solvatação ($\Delta G_{\text{solvatação}}$) e o termo entropia ($T\Delta S$) usando Eq. (2):

$$\Delta G = E_{\text{gas}} + \Delta G_{\text{solvatação}} - T\Delta S \quad (2)$$

15 E_{gas} é a soma da energia de tensão interna (E_{int}), energia de van der Waals (E_{vdw}) e energia eletrostática ($E_{\text{eletrostática}}$) (Eq. (3)) E_{int} é a energia associada com vibrações de ligações covalentes e ângulos de ligação, rotação de ângulos de torção de ligação simples (Eq. (4)).

$$E_{\text{gas}} = E_{\text{int}} + E_{\text{vdw}} + E_{\text{eletrostática}} \quad (3)$$

$$E_{\text{int}} = E_{\text{ligação}} + E_{\text{ângulo}} + E_{\text{torsão}} \quad (4)$$

A energia livre de solvatação, $\Delta G_{\text{solvatação}}$, é aproximada como a soma da contribuição polar (G_{PB}) e contribuição não-polar ($G_{\text{não-polar}}$) usando uma representação contínua do solvente:

$$\Delta G_{\text{solvatação}} = G_{\text{PB}} + G_{\text{não-polar}} \quad (5)$$

25 A contribuição polar (G_{PB}) para a energia de solvatação foi calculada usando o programa DELFI com os raios de átomo PARSE e as cargas padrão Parm94 para aminoácidos. O tamanho de grade usado foi 0,5 Å. A constante dielétrica foi ajustada em 1 para o soluto interno e em 80 para

a água externa. Um total de 1.000 interações foi realizado para cada cálculo de G_{PB} para alcançar uma convergência melhor. As contribuições não-polares ($G_{\text{não-polar}}$) foram estimadas usando uma equação simples:: $G_{\text{não-polar}} = \gamma \times \text{SASA} + b$ kcal/mol. SASA é a área de superfície acessível de solvente que foi
 5 estimada usando o algoritmo MSMS com o raio de prova de 1,4 Å. A constante de proporcionalidade de tensão superficial γ e a energia livre de solvatação para um soluto pontual b foram ajustadas em 0,00542 kcal.mol⁻¹Å² e 0,092 kcal.mol⁻¹, respectivamente.

O cálculo de entropia é extremamente consumidor de tempo
 10 para sistemas grandes. Neste estudo, apenas $\Delta G_{\text{subtotal}}$ (sem o termo $-T\Delta S$) foi estimada para solucionar o efeito de mutação para a energia livre de ligação.

4. Análise de mutagênese de escaneamento de alanina computacional

O método de escaneamento de alanina computacional foi
 15 aplicado para estimar a afinidade de ligação relativa de diferentes variantes de NRG-1 β para ErbB3 e ErbB4, respectivamente. Dois métodos foram usados para calcular a força de ligação relativa de diferentes mutantes de peptídeo. Na primeira abordagem, as estruturas de complexo, proteína e peptídeo foram tomadas de mesmo instantâneo das trajetórias de complexo. As estruturas
 20 mutantes de alanina foram geradas pela alteração das coordenadas da trajetória de tipo selvagem. Este método envolveu deleção de átomos e truncamento do resíduo mutado em C γ pela substituição por um átomo de hidrogênio. Todos os parâmetros nos arquivos de topologia para os resíduos mutados foram conseqüentemente substituídos por parâmetros de resíduo de
 25 alanina. Um total de 100 instantâneos de 400 ps (cada quarto instantâneo) foi obtido para cálculo de energia. A energia livre de ligação relativa é a diferença de energia livre entre o tipo selvagem e o mutado com alanina.

No segundo método para calcular a energia livre de ligação relativa, conduzimos vários conjuntos de simulações de dinâmica separadas

para peptídeos de NRG-1 β mutados com alanina nos complexos com ErbB3 e ErbB4, respectivamente. Então os componentes de energia foram calculados de 100 instantâneos de trajetórias coletadas de 400 ps (cada quarto instantâneo) e análises estatísticas foram realizadas.

5 Resultados

1. Resultados de modelagem e avaliação

Os modelos 3D de ErbB3 e ErbB4 foram construídos por modelagem de homologia baseado em estrutura cristalina de raios-x do complexo formado entre fator de crescimento epidérmico (EGF) de humano e o domínio extracelular do receptor de EGF (EGFR). Pesquisas FASTA e BLAST dos bancos de dados seqüências produziram várias estruturas que são homólogas a ErbB3 e ErbB4. Dentro da EGFR, verificamos que as estruturas de raios-x de ErbB3 não-ligado (PDB entrada 1M6B), EGFR inativado em complexo com EGF (PDB entrada 1NQ1), ErbB2 ligado por Herceptin Fab (PDB entrada 1N8Z) e o complexo de EGF/EGFR (PDB entrada 1IVO) estavam entre as proteínas homólogas com identidades de seqüência maiores para ErbB3 e ErbB4. ErbB2 é um receptor incomum da família EGFR para o qual não tem sido encontrado afinidade alta. O ErbB3 não-ligado possui uma seqüência idêntica comparado com o receptor de complexo NRG1 β /ErbB3.

Para focar sobre interações de ligante /receptor, a estrutura do complexo EGF/EGFR foi selecionada como o modelo para modelagem estrutural. [00152]Na base da conservação de seqüência interna e identidade entre os membros de família de receptores de EGF, o domínio extracelular tem sido classificado em quatro domínios (I a IV). Domínios II e IV são mais ricos em resíduos de cisteína, contendo 24 e 21 cisteínas, respectivamente. Na estrutura de cristal de EGFR, a maior parte de domínio IV (resíduos 513 a 619) está estruturalmente desordenada. Portanto, a região de domínio IV foi excluída em nossa modelagem de homologia. As seqüências de ErbB3 (resíduos 8-511) e ErbB4 (resíduos 25-533) possuem 44% e 48% de identidade com

EGFR (resíduos 3-512). Ademais, outros 40% destes resíduos foram substituições conservativas, dando uma similaridade de seqüência total de cerca de 80% para ambos ErbB3 e ErbB4 para como mostrado em Figura 1.

A acurácia de um modelo pode variar significativamente até mesmo dentro de regiões diferentes da mesma proteína: normalmente regiões elevadamente conservadas podem ser modeladas muito mais confiavelmente do que as alças variáveis ou os resíduos de superfície. Um total de 7 e 4 regiões estruturalmente conservadas (SCRs) foi deduzido para ErbB3 e ErbB4 respectivamente, que constituiu segmentos maiores das seqüências totais (Figura 1). Coordenadas para as partes restantes da seqüência, designadas regiões estruturalmente variáveis (SVRs), foram geradas pela pesquisa de um banco de dados de estruturas de proteína como descrito acima nos Métodos. Figura 2 mostra estereo-plotagens dos dois modelos refinados sobrepostos com a estrutura de raios-x de EGFR. Está claro que a topologia total da proteína modelo tem sido herdada enquanto algumas mudanças conformacionais locais significativas estão presentes nas regiões variáveis. Os desvios quadráticos médios (RMSDs) de estrutura principal C α dos modelos refinados de seu molde são pequenos, 0,55 Å para ErbB3 e 0,39 Å para ErbB4, indicando um grau alto de similaridade estrutural, como esperado de seu alto grau de homologia de seqüência.

Vários resíduos chave desta família de receptores tais como Leu69, Leu98, Val350, Asp355 e Phe357 em EGFR que interagem hidrofobicamente com os resíduos de EGF são também conservados em ErbB3 e ErbB4. EGFR possui uma grande quantidade de resíduos de glicina nas posições 39, 63, 85, e 122 em domínio I e 343, 379, 404, e 435 em domínio III. Estes resíduos são conservativamente retidos em conformações correspondentes nos modelos de ErbB3 e ErbB4. Como EGFR, ambos os domínios I e III de ErbB3 e ErbB4 compreendem seis volta de uma hélice- β bloqueada em cada terminal por uma hélice e uma ligação de dissulfeto. Em

domínios I e III de ErbB3 e ErbB4, também há triptofanos conservados (Trp176, Trp492 para ErbB3 e Trp198, Trp513 para ErbB4) inseridos nas quarta e quinta voltas da hélice- β . Domínio II dos receptores possui uma dobra similar à do segundo domínio de EGFR, que é composto de vários módulos com conectividades de ligação de dissulfeto similares.

Os modelos foram então avaliados por um teste de validação de estrutura de plotagem de Ramachandran usando PROCHECK. A plotagem de Ramachandran analisa os ângulos de torção ϕ (ϕ), ψ (ψ) da estrutura principal de uma proteína e calcula as ocupações percentuais para regiões “favorecidas”, “permitidas”, “generosamente permitidas”, e “rejeitadas” como uma medição de qualidade de uma estrutura de proteína. Os valores obtidos para os modelos de ErbB3 e ErbB4 são sumariados em Tabela 1 abaixo. No total 96,2% e 97,5% dos resíduos estavam em regiões favorecidas e permitidas para os modelos de ErbB3 e ErbB4, respectivamente. Em adição à avaliação da qualidade estereoquímica para os modelos, também realizados análises de Perfis-3D para adicionalmente avaliar os modelos pela checagem da qualidade do empacotamento de cadeia lateral. Os escores de qualidade total para ErbB3 e ErbB4 são 230,51/257,48 e 216/256,56 respectivamente, onde o denominador denota o escore esperado para uma proteína deste comprimento baseado em estruturas conhecidas. Para comparação, escores de 115,87/257,48 e 115,45/256,56 ou menos, sugeriam que a estrutura está quase inteiramente correta. Após validação bem sucedida, a qualidade de estruturas de ErbB3 e ErbB4 pareceu ser aceitável para estudo adicional. a

Tabela 1. Cálculos de plotagem de Ramachandran sobre modelos 3D de ErbB3 e ErbB4 computados com o programa PROCHECK.

	ErbB3	ErbB4
% de resíduos nas regiões mais favorecidas	68,0	73,9
% de resíduos em zonas permitidas adicionais	28,2	23,6
% de resíduos em regiões generosamente permitidas	2,3	0,8
% de resíduos em regiões rejeitadas	1,5	1,6
% de resíduos de não-glicina e não-prolina	100,0	100,0

Um modelo de homologia para NRG-1 β _(177.229) foi construído

a partir da estrutura de NRG- α (PDB entrada 1HAF) com uma identidade de sequência total de 80%. Por conveniência, escolhemos numerar os resíduos neste domínio NRG- α sequencialmente de 1 a 63. Os resíduos C-terminais 51 a 63 estão desordenados e são flexíveis na estrutura de solução de NRG- α .

5 Tem sido mostrado que a região mais ordenada (resíduos 1-50) é a subunidade mínima requerida para ligação em receptores celulares. Assim, um modelo truncado de NRG1 β , consistindo de resíduos 1-52, foi construído como descrito no método. O modelo inclui um subdomínio N-terminal contendo uma folha- β de três fitas central, uma região helicoidal, e uma folha-
10 β curta no subdomínio C-terminal. NRG1 β é estabilizada por três pontes de dissulfeto, Cys6-Cys20, Cys14-Cys34 e Cys36-Cys45.

2. Modelagem de ligação de NRG-1 β em receptores

Os modelos 3D finais dos complexos NRG1 β /ErbB3 e NRG-1/ErbB4 são mostrados em Figura 3. Em cada complexo, domínios I, II e III dos receptores estão arranjados em uma forma C, e NRG-1 β é acomodada entre os domínios I e III em um modo similar de ligação de EGF em EGFR (Figura 3). Isto está consistente com os resultados bioquímicos prévios que
15 domínios I e III de ErbB3 podem estar envolvidos na ligação de NRG-1 β . Os estudos de afinidade de ligação sugerem que os determinantes de ligação sobre os receptores ErbB3 e ErbB4 foram muito similares embora eles
20 possuam diversidade de sequência total substancial. Estudos de mutagênese também revelaram que ambos as terminações-N e -C de NRG-1 β são importantes para ligação de ligante-receptor. Estas duas regiões estão bastante distantes uma da outra na proteína dobrada, confirmando o papel de regiões
25 múltiplas de interação de ligante-receptor. Os resíduos de intervenção, em particular aqueles que estão conservados entre NRG1 β e EGF, podem desempenhar papéis puramente estruturais pela manutenção das distância e orientação apropriadas entre estas duas regiões. A estrutura de raios-X de ErbB3 não ligado mostra que o tamanho do sítio de ligação de ligante entre os

domínios I e III é o dobro do tamanho de ligante quando os domínios II e IV interagem. O contado de domínios II e IV parece restringir as orientações relativas de domínios I e III para ligação de ligante. Assim, um ligante que contata apenas em domínio I (ou domínio III) ligaria o receptor mas falharia em induzir o arranjo de domínio que parece necessário para a sinalização. Baseado nestes resultados, podemos concluir que há pelo menos dois sítios de ligação requeridos para sinal requerido de transdução.

Comparação da estrutura de NRG-1 β com EGF revelou um grau alto de similaridade estrutural (Figura 4). Excluindo a região N-terminal (Ser1-Lys5), a alça- Ω -desordenada (Lys24-Ser30) e região C-terminal (Met50-Ser52), os átomos C α de NRG-1 β alinham-se bem com aqueles de EGF, com uma RMSD de $\sim 1,3$ Å. NRG-1 β possui uma inserção de três resíduos relativa à sequência de EGF. Contudo, a substituição de resíduos 21-33 na NRG-1 β por resíduos 21-30 de EGF não tem efeito sobre a ligação de receptor de neuregulina ou a sua capacidade de estimular a fosforilação de receptor. Os resultados experimentais sugeriram que a significância funcional da inserção de três resíduos (resíduos 28-30) na NRG-1 β é mínima, apesar das diferenças estruturais significativas naquela região. Portanto, a orientação da alça estendida em NRG-1 β não afetaria a modelagem da ligação de NRG1 β nos receptores.

3. Simulações de dinâmica molecular

O comportamento dos complexos de receptor-ligante foi estudado por simulações de dinâmica molecular para considerar as mudanças conformacionais e flexibilidade de proteína. Os modelos iniciais de NRG-1 β /ErbB3 e NRG-1 β /ErbB4 foram submetidos a 1,1 ns e 0,9 ns de simulações de MD, respectivamente. Os desvios quadráticos médios (RMSDs) de átomos C α de suas posições iniciais ($t = 0$ ps) têm sido usados para medir a estabilidade e para ganhar compreensão sobre a possível flutuação de estrutura.

A avaliação de tempo das RMSDs de átomo Ca de complexos NRG-1 β /ErbB3 e NRG-1 β /ErbB4 é apresentada em Figura 5. Na plotagem, uma elevação intensa foi observada durante os primeiros 100 ps em todas as RMSDs residual e então ela tende a aplainar. A magnitude destas curvas de RMSD, contudo, não continua a aumentar durante o período de coleta de dados, implicando que as estruturas de NRG-1 β /ErbB3 e NRG1 β /ErbB4 eram estáveis durante esta escala de tempo. As RMSDs médias foram abaixo de 3,0 Å durante a simulação inteira para ambos os complexos NRG-1 β /ErbB3 e NRG1 β /ErbB4. Particularmente, as trajetórias de simulação do ErbB4 com o ligante NRG-1 β pareceram bem equilibradas com um valor médio de RMSD de 2,6 Å durante os últimos 400 ps. A estrutura de ErbB3 ligado em NRG-1 β mostrou uma RMSD mais alta com um valor médio de 3,7 Å durante os últimos 400 ps de simulação. Isto é indicativo da estabilidade relativa das estruturas ligadas em NRG-1 β . Esta tendência foi de novo aparente na análise das flutuações de RMS no modo de resíduo. Os resíduos de ErbB3 na estrutura ligada em NRG-1 β flutuam mais ao redor de suas posições médias do que os resíduos no complexo ErbB4.

Sobreposição das estruturas médias de todas as trajetórias com suas estruturas iniciais respectivas revelou regiões de mudança conformacional maior. Resíduos que mostraram os desvios mais altos em estrutura de NRG1 β /ErbB3 (resíduos 243-256) são os mesmos que no complexo NRG-1 β /ErbB4 (resíduos 265-278), mas em uma extensão grande. Estes resíduos são uma parte da alça grampo-de-cabelo- β que se estende quase 20 Å do domínio II na estrutura de raios-x de ErbB3. Esta alça de grampo-de-cabelo- β está elevadamente conservada dentro de família EGFR e desempenha um papel dominante não apenas em contato intramolecular entre os domínios II e IV mas também em interação intermolecular de receptor-receptor. Nossos modelos de complexo truncado 1:1 que são faltantes de interações entre domínios II e IV bem como os contatos de receptor-receptor

podem resultar em RMSDs consideravelmente altos nesta região. Mas análises totais mostram que as estruturas modeladas permanecem estáveis durante as simulações sem sofrerem de mudanças estruturais notáveis.

4. Interações de ligante-receptores

A interação de ligante-receptor sobre cada receptor consiste de três sítios como na interação em EGF/EGFR, que é designada daqui em diante como sítio 1 em domínio I e sítios 2 e 3 em domínio III do receptor (Figura 3). Resíduos 20-35 e Leu3 de NRG1 β interagem com o sítio 1. A região contendo resíduos 10-19 e Arg44 de NRG1 β interage com o sítio 2. A região C-terminal ao redor do resíduo Tyr48 interage como o sítio 3. Estes resíduos de ligante formam uma variedade de interações de ligação eletrostática, hidrofóbica, e de ligação de hidrogênio no receptor.

Da análise das trajetórias de ligação de hidrogênio entre o ligante e o receptor, têm sido detectadas umas poucas interações chave mediadas pelas ligações de hidrogênio entre os resíduos de cadeia lateral de NRG1 β /ErbB3 e NRG-1 β /ErbB4. Estas ligações de hidrogênio são listadas juntamente com distâncias em Tabela 2. Desta Tabela 2, pode ser visto que são retidas as interações cruciais incluindo aquelas dos resíduos Arg44 e Tyr48 em NRG1 β (Arg41 e Arg45 em EGF) com os receptores. A cadeia lateral de Arg44 de NRG-1 β faz uma ligação de hidrogênio com a cadeia lateral de Asp352 de ErbB3 e a cadeia lateral de Asp376 de ErbB4, respectivamente. Isto resultado é confirmado pela descoberta experimental de que a substituição de Arg44 por alanina significativamente reduziu a atividade de ligação de ErbB3 e ErbB4 de NRG1 β .

Tabela 2. Ligações de hidrogênio entre as cadeias laterais de resíduo de ligante e receptor.

Parceiros de ligação de hidrogênio			
NRG-1 β		ErbB3	
Resíduo	Grupo	Grupo de Resíduo	Distância (Å) [1 Å = 0,1 nm]
Asn47	ND2	Tyr405OH	2,93
Tyr48	OH	Asn379ND2	3,12

Tyr48	OH	Asn379OD1	3,10
Arg44	NH2	Asp352OD2	2,61
Arg44	NH1	Asp352OD1	2,67
Asn47	ND2	Asp343OD1	2,90
Arg31	NH2	Glu131OE2	2,75
Arg31	NH1	Glu131OE1	2,92
Asn38	ND2	Asn25OD1	3,25
NRG1 β		ErbB4	
Resíduo	Grupo	Grupo de Resíduo	Distância (Å) [1 Å = 0,1 nm]
Glu39	OE2	Lys438NZ	2,87
Tyr48	OH	Asn403OD1	2,73
Arg44	NH2	Asp376OD1	3,04
Arg44	NH1	Asp376OD1	3,12
Ser27	OG	Asp150OD1	3,59
Asn28	ND2	Tyr148OH	3,16
Lys35	NZ	Ser40OG	2,82
Asp43	OD2	Lys35NZ	2,81

Além das ligações de hidrogênio, são extensivas as interações hidrofóbicas entre NRG-1 β e as interfaces de sítios 1, 2 e 3 de ErbB3 e ErbB4.

Em complexo NRG-1 β /ErbB3, as cadeias laterais de Val47, Leu48, Met72, e Leu102 em sítio 1 de ErbB3 interagem hidrofobicamente com Leu3, Val23 e Leu33 de NRG-1 β (Figura 6A). A cadeia lateral de Trp354 em sítio 2 de ErbB3 interage hidrofobicamente com Phe13 e Tyr32 of NRG-1 β (Figura 6B). Ademais, a porção alifática longa da cadeia lateral de Arg44 (NRG-1 β) também proporciona contatos de van der Waals com a cadeia lateral de Trp354 (ErbB3). As cadeia laterais de Tyr405, Phe409 e Ile413 em sítio 3 de ErbB3 formam uma rede de interação hidrofóbica com aquela de resíduos ao redor de Tyr48 de NRG-1 β (Figura 6C).

Interações hidrofóbicas similares são observadas no complexo NRG-1 β /ErbB4. Como um resultado destas interações, três redes de interação hidrofóbica são formadas nas interfaces entre NRG-1 β e ErbB4. As cadeias laterais de Leu3, Val23 e Leu33 de NRG-1 β formam contatos de van der Waals com Leu36, Leu91 e Leu121 em sítio 1 de ErbB4 (Figura 7A). As cadeias laterais de Phe13, Val15 e resíduos ao redor de Tyr48 de NRG-1 β possuem interações similares com os sítios 2 e 3 de ErbB4 (Figuras 7B e 7C),

respectivamente. Ambas as interações putativas identificadas dos modelos refinados estão de acordo com os estudos de mutagênese de NRG-1 β na presença de ErbB3 ou ErbB4.

A análise de ligação de NRG-1 β com receptores apresentados acima proporciona-nos rica informação sobre o mecanismo pelo qual ErbB3 e ErbB4 interage com NRG-1 β . Isto por sua vez facilita nossa capacidade para entender e adicionalmente otimizar os componentes de interação para ligação de NRG-1 β e estabilidade no receptor por abordagem de mutagênese computacional.

5. Mutagênese de escaneamento de alanina computacional de NRG-1 β pelo método MM-PBSA

Para determinar a contribuição de cada resíduo na interface de interação na ligação de ligante-receptor e para identificar os resíduos chave no ligante que poderia potencialmente aumentar sua afinidade de ligação sob mutação, mutagênese de escaneamento de alanina computacional foi realizada sobre NRG-1 β , e as energias livres de ligação dos ligantes mutados nos receptores foram calculadas usando o método MM-PBSA. Para reduzir o tempo computacional, a contribuição de entropia ($T\Delta S$) para a energia livre de ligação não foi calculada neste estudo. É esperado que as contribuições de entropia sejam canceladas quando as diferenças nas energias livres de ligação são calculadas entre o tipo selvagem e os mutantes. Esta suposição parece razoável, como demonstrado pelo cálculo de Massova e Kollman de $T\Delta S$ para um peptídeo de 12 resíduos derivados de p53 de humano e seus mutantes. Portanto, apenas $\Delta G_{\text{subtotal}}$ (sem o termo $-T\Delta S$) foi usado como o critério para as estimativas de $\Delta G_{\text{ligação}}$.

Tabela 3 mostra todos os termos de energia e as energias livres de ligação subtotais de NRG1 β e seus mutantes para ErbB3 e ErbB4, respectivamente. Como visto na Tabela 3, a interação intermolecular de van der Waals e o termo de solvatação não-polar proporcionam a força motriz

para a ligação. Ambas as formações de complexo levam a interações eletrostáticas fortemente favoráveis (E_{ele}), opostas pelas contribuições desfavoráveis devido à parte polar da energia livre de solvatação (G_{PB}). Resultados similares podem ser encontrados em vários outros estudos. As contribuições eletrostáticas totais ($E_{ele} + G_{PB}$) para NRG-1 β /ErbB3 e NRG-1 β /ErbB4 são 110,2 kcal mol⁻¹ e 112,5 kcal mol⁻¹, respectivamente, e assim desfavorecem a formação de complexo, de novo de acordo com os estudos relacionados citados acima.

Tabela 3. Resultados de cálculo de energia livre de NRG-1 β com receptores ErbB por MM-PBSA^a

	NRG-1 β /EAB3		ErbB3		NRG-1 β		Delta ^b	
Contribuição EP ^d	Média ^c	EP ^d	Média ^c	EP ^d	Média ^c	EP ^d	Média ^c	EP ^d
E_{ele}	-16753,91	112,64	-14940,46	102,75	-1361,15	22,58	-452,30	25,80
E_{vdw}	-2006,94	32,49	-1739,60	31,19	-123,33	10,46	-144,02	7,29
E_{int}	10831,80	63,57	9798,05	60,27	1033,75	20,77	0,00	0,00
E_{gs}	-7929,04	133,98	-6882,00	123,65	-450,73	25,50	-596,31	25,25
$G_{n\acute{o}o-polar}$	143,01	1,19	132,17	1,01	19,13	0,18	-8,28	0,44
G_{PB}	-7440,22	101,09	-6863,61	88,32	-1139,12	18,86	562,52	25,27
G_{sol}	-7297,21	100,53	-6731,44	87,93	-1120,00	18,84	554,23	25,12
$G_{subtotal}$	-15226,25	66,86	-13613,45	65,36	-1570,72	18,19	-42,08	7,21
-TAS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	NRG-1 β /ErbB4		ErbB3		NRG-1 β		Delta ^b	
Contribuição EP ^d	Média ^c	EP ^d	Média ^c	EP ^d	Média ^c	EP ^d	Média ^c	EP ^d
E_{ele}	-16888,05	94,37	-15171,74	66,74	-1343,04	33,13	-373,27	27,41
E_{vdw}	-2068,19	31,77	-1815,76	29,10	-119,74	10,70	-132,69	6,88
E_{int}	10794,92	61,48	9749,46	56,82	1045,46	19,44	0,00	0,00
E_{gs}	-8161,32	117,81	-7238,04	90,27	-417,32	43,40	-505,97	26,96
$G_{n\acute{o}o-polar}$	138,41	1,45	126,65	1,24	19,44	0,41	-7,68	0,52
G_{PB}	-7327,22	94,47	-6658,67	67,14	-1153,33	36,53	485,77	25,23
G_{sol}	-7188,82	93,77	-6532,02	66,67	-1134,89	36,22	478,09	25,09
$G_{subtotal}$	-15359,14	68,76	-13770,06	63,84	-1552,20	20,79	-27,88	10,09
-TAS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

^a Todos os valores são dados em kcal mol⁻¹ [1 kcal mol⁻¹ = 4,184 kJ mol⁻¹].

^b Contribuição (Complexo)-Contribuição (Receptor)-Contribuição (ligante).

^c Média sobre 400 instantâneos.

^d Erro padrão de valores médios.

Baseado nas simulações de dinâmica molecular de interações de ligante-receptor, temos identificado resíduos chave de NRG-1 β responsáveis pela ligação em resíduos de receptor. Tabela 4 mostra os resultados da abordagem de mutagênese de escaneamento de alanina computacional para 20 resíduos do total de 52 resíduos de NRG-1 β que contribuem para a ligação de ErbB3 e ErbB4. Os valores positivos e negativos

de $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ ($\Delta G_{\text{tipo selvagem}} - \Delta G_{\text{mutante}}$) indicam as substituições favoráveis e desfavoráveis, respectivamente. Dados também são mostrados como um gráfico em Figura 8. Os resultados em Figura 8 mostram que vários mutantes de alanina de NRG-1 β têm significativamente reduzido as energias de interação de ligante com ErbB3 e ErbB4, especialmente em posições 44,48 e 50. Isto pode ser explicado estruturalmente. Resíduos Arg44 e Tyr48 formam ligações de hidrogênio com resíduos polares dos receptores (veja Figuras 6 e 7), que são refletidas pela contribuição maior de interações eletrostáticas para a energia livre de ligação (termo $\Delta\Delta E_{\text{ele}}$; veja Tabelas 1 e 2 suplementares).

Mutações de Arg44Ala e Tyr48Ala abolem as ligações de hidrogênio importantes entre o ligante e os receptores. Mutações de Tyr48Ala e Met50Ala causam perda significativa de interações de van der Waals favoráveis entre o ligante e os receptores (termo $\Delta\Delta E_{\text{vdw}}$; veja Tabelas 1 e 2 suplementares).

Tabela 4. Resultados de mutagênese de escaneamento de alanina computacional para complexo de NRG-1 β com ErbB3 e ErbB4 ($\Delta\Delta G_{\text{subtotal}} = \Delta G_{\text{tipo selvagem}} - \Delta G_{\text{mutante}}$)

NRG1 β P Posição	NRG-13/ErbB3 $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ (kcal/mol) [1 kcal/mol = 4,184 kJ/mol]	NRG1 β /ErbB4 $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ (kcal/mol) [1 kcal/mol = 4,184 kJ/mol]
His2Ala	-0,10 $\pm$ 0,54	0,13 $\pm$ 1,90
Leu3Ala	-1,14 $\pm$ 1,24	-0,87 $\pm$ 1,19
Phel3Ala	-1,06 $\pm$ 0,76	-0,25 $\pm$ 0,90
Vall5Ala	-0,78 $\pm$ 0,86	-1,19 $\pm$ 0,63
Asn16Ala	0,78 $\pm$ 0,85	1,90 $\pm$ 2,94
Val23Ala	-0,50 $\pm$ 1,60	-1,53 $\pm$ 1,00
Asp25Ala	2,26 $\pm$ 0,66	-2,20 $\pm$ 3,71
Arg31Ala	-5,90 $\pm$ 1,14	1,83 $\pm$ 4,21
Tyr32Ala	0,32 $\pm$ 0,57	-0,34 $\pm$ 0,01
Leu33Ala	-3,31 $\pm$ 0,38	-0,32 $\pm$ 1,27
Lys35Ala	1,13 $\pm$ 0,93	0,00 $\pm$ 2,09
Asn38Ala	0,59 $\pm$ 0,76	1,31 $\pm$ 0,89
Glu39Ala	0,75 $\pm$ 2,09	-0,51 $\pm$ 2,67
Phe40Ala	1,59 $\pm$ 2,12	1,08 $\pm$ 3,50
Arg44Ala	-5,43 $\pm$ 4,79	-5,30 $\pm$ 2,77
Gln46Ala	3,57 $\pm$ 2,69	-1,01 $\pm$ 1,62
Asn47Ala	-0,07 $\pm$ 2,22	2,03 $\pm$ 1,72
Tyr48Ala	-2,99 $\pm$ 2,45	-3,05 $\pm$ 2,40
Met50Ala	-3,45 $\pm$ 0,54	-1,92 $\pm$ 1,45
Ser52Ala	-0,21 $\pm$ 1,77	0,49 $\pm$ 2,25

Para adquirir compreensão adicional sobre as contribuições de cada mutação de alanina, a mudança das interações eletrostáticas e intermoleculares de van der Waals mais as energias livres de solvatação polar sobre a mutação de alanina é mostrada em Figura 8. Na maioria dos casos a mudança de energias eletrostáticas intermoleculares é anticorrelacionada com a mudança de energias livres de solvatação. Portanto, é importante combinar $\Delta\Delta E_{\text{ele}}$ e $\Delta\Delta G_{\text{PB}}$ juntas baseado na origem eletrostática comum das contribuições. Da Figura 8, a $\Delta G_{\text{não-polar}}$ é muito pequena comparada com as mudanças em outros componentes de energia livre. As contribuições de $\Delta\Delta E_{\text{vdw}}$ são mais negativas, o que indica que a substituição de alanina reduz os contatos de van der Waals sobre as interfaces de ligação. Por outro lado, os termos que são a combinação de ΔE_{ele} e $\Delta\Delta G_{\text{PB}}$ são mais favorecidos pela mutações de Ala. Uma expectativa é a substituição de Arg44, que perde ambas as interações de van der Waals e eletrostáticas ($\Delta\Delta E_{\text{ele}} + \Delta G_{\text{PB}}$). As interações intermoleculares entre a Arg44 positivamente carregada de NRG1 β e Asp352 negativamente carregada de ErbB3 e Asp376 de ErbB4 são fortemente favorecidas nos complexos de tipo selvagem. Um resultado similar é observado para a substituição de Arg31Ala de interação de NRG1 β com ErbB3 (Figura 8A), mas não com ErbB4 (Figura 8B). A estrutura de NRG-1 β /ErbB3 revela que a cadeia lateral de Arg31 forma duas ligações de hidrogênio na cadeia lateral de Glu131 de ErbB3 (Tabela 2). Portanto, o mutante Arg31Ala é faltante de interação de ligação de hidrogênio. Contudo, Arg31 de NRG1 β não está envolvido em ligação de hidrogênio no receptor de ErbB4 (Tabela 2).

6. Estudos comparativos de $\Delta\Delta G_{\text{ligação}}$ de trajetórias separadas de mutações de NRG-1 β Arg31Ala e Asn47Ala

Para checar a validade da suposição de que se mutações de alanina não causam grandes mudanças conformacionais na estrutura global de complexos NRG-1 β /ErbB3 e NRG1 β /ErbB4, foram realizadas duas

simulações de dinâmica molecular para mutantes Arg31Ala e Asn47Ala de NRG-1 β no complexo ErbB3 e ErbB4. Os valores de RMSD de átomos C α entre a estrutura média das trajetórias dos complexos mutantes e a estrutura de modelo inicial são pequenos, flutuando entre 1,9 e 2,1 Å. Valores de $\Delta G_{\text{subtotal}}$ recalculados baseados nas trajetórias novas dos complexos mutantes, como listados em Tabela 5, são quase idênticos aos resultados derivados das trajetórias modificadas dos complexos de tipo selvagem. As diferenças entre os valores de $\Delta G_{\text{subtotal}}$ calculados usando os dois métodos são menores do que 1 kcal.mol⁻¹ (Tabela 5). Isto indica que as conformações globais de NRG1 β /ErbB3 e NRG-1 β /ErbB4 não mudam dramaticamente após a mutação de uma alanina.

Tabela 5. Comparação dos componentes da energia livre de ligação do complexo Arg31Ala e Asn47Ala com os receptores ErbB calculada da trajetória modificada de tipo selvagem e das trajetórias colhidas dos mutantes NRG-1 β Arg31Ala e Asn47Ala.

	Trajetória do tipo selvagem modificada com Arg31Ala ^a		Trajetória do mutante Arg31Ala ^b		Trajetória do tipo selvagem modificada com Asn47Ala ^a		Trajetória do mutante Asn47Ala ^b	
ErbB3 Contribuição	Média	Erro Padrão	Média	Erro Padrão	Média	Erro Padrão	Média	Erro Padrão
ΔE_{ele}	-375,84	25,66	-481,47	28,15	-443,90	27,79	-547,58	15,65
ΔE_{vdw}	-141,02	7,16	-143,31	7,28	-140,22	6,72	-151,41	5,89
ΔE_{gas}	-516,86	25,50	-624,78	27,24	-584,12	27,45	-698,99	15,56
$\Delta G_{\text{não-polar}}$	-7,80	0,39	-8,51	0,60	-7,99	0,50	-9,44	0,34
ΔG_{PB}	488,48	25,81	596,67	28,29	550,12	26,29	646,72	15,97
ΔG_{sol}	480,68	25,65	586,16	28,12	542,13	26,11	657,27	15,93
$\Delta G_{\text{subtotal}}$	-36,18	7,30	-36,62	7,55	-42,01	6,86	-41,71	7,82
	Trajetória do tipo selvagem modificada com Arg31Ala ^a		Trajetória do mutante Arg31Ala ^b		Trajetória do tipo selvagem modificada com Asn47Ala ^a		Trajetória do mutante Asn47Ala ^b	
ErbB4 Contribuição	Média	Erro Padrão	Média	Erro Padrão	Média	Erro Padrão	Média	Erro Padrão
ΔE_{ele}	-341,13	27,04	-382,51	20,14	-371,70	27,00	-476,51	9,18
ΔE_{vdw}	-128,92	6,64	-151,00	6,14	-130,88	6,78	-139,35	5,93
ΔE_{gas}	-470,04	26,18	-533,51	19,18	-502,58	26,43	-615,88	18,92
$\Delta G_{\text{não-polar}}$	-7,26	0,52	-8,46	1,29	-7,58	0,51	-8,09	0,41
ΔG_{PB}	447,59	25,20	511,86	19,34	480,25	25,32	593,59	14,90
ΔG_{sol}	440,33	25,08	503,40	19,65	472,67	25,19	585,51	14,80
$\Delta G_{\text{subtotal}}$	-29,71	9,14	-30,11	22,59	-29,91	10,24	-30,37	13,36

^a Calculado para as trajetórias modificadas do tipo selvagem por experimentos de mutagênese de escaneamento de alanina computacional.

^b Calculado para as trajetórias separadas coletadas para os mutantes de NRG-1 β .

7. Estudos comparativos da afinidade de ligação de receptor e capacidade de transdução de sinal de neuregulina e suas mutações

Para estudar a capacidade de ligação em receptor de neuregulina e suas mutações, são usadas células COS7 co-expressando ErbB2&ErbB3 ou ErbB2&ErbB4. As células são crescidas para confluência de 80%. À tarde, após as células terem alcançado a confluência de 80%, o meio é mudado para média livre de soro. Então, após 24 horas, as células são colhidas para ensaios de afinidade de ligação.

Similarmente, para estudar a capacidade de transdução de sinal de neuregulina e suas mutações, são usadas células COS7 co-expressando ErbB2&ErbB3 ou ErbB2&ErbB4. As células são crescidas para confluência de 80%. À tarde, após as células terem alcançado a confluência de 80%, o meio é mudado para média livre de soro. Então, após 24 horas, quantidades diferentes de neuregulina ou variantes de neuregulina são adicionadas em cavidades separadas contendo as células. Após 10 minutos, tampão de carregamento é adicionado para lisar as células. A amostra é então colhida e carregada para dentro de uma cavidade separada de gel para eletroforese e análise de western blot.

Os resultados para neuregulina (o fragmento de 177-237 aminoácidos de neuregulina-1 β 2) e variantes de neuregulina L3A e D43A (os 3º e 43º aminoácidos são substituídos por alanina, respectivamente, do fragmento de neuregulina) são mostrados em Tabela 6, Tabela 7, Fig 9 e Fig 10. Os dados em Tabela 6 e Tabela 7 mostram que L3A e D43A possuem quase a mesma afinidade de ligação de receptor para células co-expressando ErbB2&ErbB3 como neuregulina (se o valor de EC50 ou KD for maior, então a afinidade de ligação de receptor é menor), enquanto que D43A possui uma afinidade de ligação de receptor muito mais alta (Tabela 6) e L3A possui uma afinidade de ligação de receptor muito mais baixa (Tabela 7) para células co-expressando ErbB2&ErbB4 do que neuregulina. Similarmente, Figuras 9 e 10

mostram que ligação de que L3A e D43A induz mais fosforilação AKT do que neuregulina em células co-expressando ErbB2&ErbB4, mas menos fosforilação AKT do que neuregulina em células co-expressando ErbB2&ErbB3. Estes resultados mostram que ligação de L3A e D43A pode fortemente ativar a rota de sinalização de AKT em células co-expressando ErbB2&ErbB4, mas apenas ativam um pouco em células co-expressando ErbB2&ErbB3. Estes resultados são significativos porque células cardíacas primariamente expressam ErbB2&ErbB4, e variantes, tais como D43A e L3A, podem ser portanto usadas para tratar doenças cardiovasculares enquanto reduzem o efeito colateral de ligação de neuregulina diferente de células expressando ErbB2&ErbB3.

Tabela 6. Comparação da afinidade de ligação de receptor de neuregulina e variante D43A sobre células COS7 expressando ErbB2/ErbB3 e ErbB2/ErbB4, respectivamente.

Nome	EC50 (nM)	
	células COS7 (co-expressão de ErbB2&ErbB3)	células COS7 (co-expressão de ErbB2&ErbB4)
NRG	112,9	132,4
D43A	149,2	40,66

EC50 é a concentração de ligantes que podem competir por 50% dos ligantes radiorrotulados ligados de complexo receptor.

Tabela 7. Comparação da afinidade de ligação de receptor de neuregulina e variante L3A sobre células COS7 expressando ErbB2/ErbB3 e ErbB2/ErbB4, respectivamente.

Nome	KD (pM)	
	células COS7 (co-expressão ErbB2&ErbB3)	células COS7 (co-expressão ErbB2&ErbB4)
NRG	1407	281,6
L3A	1151	1060

KD é igual a $\frac{[ligante] \times [receptor]}{[complexo\ ligante \cdot receptor]}$, reflete a taxa de dissociação de ligante do receptor.

[ligante] refere-se à concentração de ligante.

Foi construído mutante duplo de neuregulina 8A47A (os 8º e 47º aminoácidos do fragmento de neuregulina substituídos por alanina). O

mesmo método que o usado acima foi empregado para estudar a capacidade de transdução de sinal de neuregulina e seus mutantes duplos. Os resultados para neuregulina (o fragmento de 177-237 aminoácidos de neuregulina-1 β 2) e mutante duplo de neuregulina 8A47A (os 8^o e 47^o aminoácidos do fragmento de neuregulina simultaneamente substituídos por alanina) são mostrados em Fig 11. Figura 11 mostra que ligação de 8A47A induz muito mais fosforilação de AKT do que neuregulina em células co-expressando ErbB2&ErbB4, mas quase a mesma fosforilação de AKT que a neuregulina em células co-expressando ErbB2&ErbB3. O resultado mostra que a ligação de 8A47A pode fortemente ativar a rota de sinalização de AKT em células co-expressando ErbB2&ErbB4, enquanto que apenas normalmente ativa a rota em células co-expressando ErbB2&ErbB3. O resultado é muito importante porque células cardíacas primariamente expressam ErbB2&ErbB4, assim 8A47A pode ser usado para tratar doenças cardiovasculares enquanto mantém o efeito colateral de ligação de neuregulina de outras células expressando ErbB2&ErbB3.

Conclusões

Métodos de modelagem de homologia, dinâmica molecular e cálculo de energia livre foram usados para estudar as interações entre NRG-1 β e seus receptores, ErbB3 e ErbB4. Características de ligação de NRG1 β em ErbB3 e ErbB4 foram relatadas usando simulações de dinâmica molecular (MD). As energias livres de ligação entre o ligante e o receptor foram calculadas pelo método MM-PBSA. Simulações de MD revelaram que numerosos resíduos estruturalmente importantes de NRG1 β , tais como Leu33, Arg44, Tyr48 e Met 50, são mantidos para a ligação nos receptores comparando com resíduos de EGF correspondentes e seu receptor. Os cálculos de energia livre entre o ligante e os receptores ajudaram a dissecar a origem de afinidades de ligação de NRG-1 β nos receptores.

Além disso, o método de escaneamento de alanina

computacional foi usado para mapear a contribuição de cada resíduo nas interfaces de interação para a afinidade de ligação, e para validar os modelos construídos dos complexos de ligante-receptor pelo exame das funções de resíduos individuais nos sítios de ligação. Os resultados de escaneamento de alanina computacional identificaram pares de resíduos de interação importantes, por exemplo nas ligações de NRG-1 β em ErbB3 e ErbB4, que mostram boa concordância com os resultados de mutagênese experimental. Isto indica que os modelos estruturais correntes de complexos NRG-1 β /ErbB3 e NRG1 β /ErbB4 são confiáveis e são valiosos para selecionar mutações desejáveis em NRG-1 β para aumentar a afinidade de ligação e a seletividade para o receptor e a descoberta de novos agentes terapêuticos para o tratamento de insuficiência cardíaca, e mutações de neuregulina L3A e D43A fortemente confirmam esta idéia.

Os exemplos acima são incluídos apenas para propósitos ilustrativos e não são intencionados para limitarem o escopo da invenção. Muitas variações naquelas descritas acima são possíveis. Visto que modificações e variações nos exemplos descritos acima serão evidentes para aquelas pessoas experientes na técnica, é intencionado que esta invenção seja limitada apenas pelo escopo das reivindicações anexadas.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Mingdong Zhou

<120> VARIANTES DE NEUREGULINA E MÉTODOS DE TRIAGEM E DE USO DAS MESMAS

<130> 11748-007-228

<140> US 11/293,879

<141> 2005-12-02

<160> 4

<170> FastSEQ para versão do Windows 4.0 <210> 1

<211> 61

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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>2

<211>183

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400>2

agccatcttg	taaaatgtgc	ggagaaggag	aaaactttct	gtgtgaatgg	aggggagtg	60
ttcatgtga	aagaccttc	aaaccctcg	agatactgt	gcaagtgcc	aatgagtt	120
actggtgatc	gctgccaaaa	ctacgtaatg	gccagcttct	acaaggcgga	ggagctgtac	180
cag						183

<210>3

<211>61

<212>PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> mutação de tipo selvagem

<400>3

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 Leu Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 20 25 30

Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Ala 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>4

<211>61

<212>PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> mutação de tipo selvagem

<400>4

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

REIVINDICAÇÕES

1. Variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β , caracterizada pelo fato de compreender seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo compreende um aminoácido diferente daquele em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo possui uma afinidade de ligação aumentada para ErbB3 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1, e na qual

no resíduo 25 o citado aminoácido diferente é A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y; ou

10 no resíduo 35 o citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, L, N, M, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y; ou

no resíduo 46 o citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, ou Y.

2. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a variante de polipeptídeo consiste da seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:1, e na qual

no resíduo 25 o citado aminoácido diferente é A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y; ou

20 no resíduo 35 o citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, L, N, M, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y; ou

no resíduo 46 o citado aminoácido diferente é A., C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, ou Y.

3. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que

25 no resíduo 25 o citado aminoácido diferente é A;

no resíduo 35 o citado aminoácido diferente é A; ou

no resíduo 46 o citado aminoácido diferente é A.

4. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que

no resíduo 25 o citado aminoácido diferente é A;
no resíduo 35 o citado aminoácido diferente é A; ou
no resíduo 46 o citado aminoácido diferente é A.

5 5. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 1,
caracterizada pelo fato de que a variante de polipeptídeo possui uma afinidade
de ligação diminuída ou similar por um ErbB4 comparada com o polipeptídeo
de SEQ ID NO:1.

10 6. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 5,
caracterizada pelo fato de que no resíduo 25 o citado aminoácido diferente é
A.

7. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 5,
caracterizada pelo fato de que no resíduo 35 o citado aminoácido diferente é
A.

15 8. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 5,
caracterizada pelo fato de que no resíduo 46 o citado aminoácido diferente é
A.

9. Polinucleotídeo, caracterizado pelo fato de compreender
uma seqüência de ácido nucleico codificadora da variante de polipeptídeo
como definido na reivindicação 1.

20 10. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de
compreender uma quantidade eficaz da variante de polipeptídeo como
definido na reivindicação 1 e um excipiente farmacêuticamente aceitável.

25 11. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de
compreender uma quantidade eficaz da variante de polipeptídeo como
definida na reivindicação 5 e um excipiente farmacêuticamente aceitável.

12. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de
compreender uma quantidade eficaz do polinucleotídeo como definido na
reivindicação 9 e um excipiente farmacêuticamente aceitável.

13. Kit, caracterizado pelo fato de compreender a composição

farmacêutica como definida na reivindicação 10 e uma instrução para usar a composição farmacêutica na prevenção, no tratamento, ou no retardamento de uma doença em um indivíduo via ativação de receptores ErbB2/ErbB3.

5 14. Kit, caracterizado pelo fato de compreender a composição farmacêutica como definida na reivindicação 11 e uma instrução para usar a composição farmacêutica na prevenção, no tratamento, ou no retardamento de uma doença em um indivíduo via ativação de receptores ErbB2/ErbB3.

10 15. Método para prevenção, tratamento, retardamento do desenvolvimento de doenças ou condições, tais como, esquizofrenia em um indivíduo, caracterizado pelo fato de compreender administrar ao indivíduo, para o qual tal prevenção, tratamento ou retardamento é necessário ou desejável, uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade eficaz da variante de polipeptídeo como definida na reivindicação 1 e um excipiente farmacêuticamente aceitável.

15 16. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que o mamífero é um humano.

20 17. Variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β , caracterizada pelo fato de compreender seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo compreende um aminoácido diferente daquele em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo possui uma afinidade de ligação aumentada para ErbB4 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1, e na qual

no resíduo 16 o citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y;

25 no resíduo 31 o citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, ou Y; ou

no resíduo 47 o citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y.

18. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação

17, caracterizada pelo fato de que a variante de polipeptídeo consiste da sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:1, e

na qual no resíduo 16 o citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y;

5 no resíduo 31 o citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, ou Y; ou

no resíduo 47 o citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y.

19. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação

10 17, caracterizada pelo fato de que no resíduo 16 o citado aminoácido diferente é A.

20. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação

18, caracterizada pelo fato de que no resíduo 16 o citado aminoácido diferente é A.

15 21. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato de que no resíduo 31 o citado aminoácido diferente é A.

22. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação

18, caracterizada pelo fato de que no resíduo 31 o citado aminoácido diferente
20 é A.

23. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação

17, caracterizada pelo fato de que no resíduo 47 o citado aminoácido diferente é A.

24. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação

25 18, caracterizada pelo fato de que no resíduo 47 o citado aminoácido diferente é A.

25. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação

23, caracterizada pelo fato de adicionalmente compreender um aminoácido diferente daquele em SEQ ID NO:1, na qual no resíduo 8, o citado

aminoácido diferente é A.

26. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 24, caracterizada pelo fato de compreender ainda um aminoácido diferente daquele em SEQ ID NO:1, na qual no resíduo 8, o citado aminoácido
5 diferente é A.

27. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 25, caracterizada pelo fato de que a variante de polipeptídeo induz mais fosforilação Akt em células expressando ErbB2/ErbB4 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1.

10 28. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 26, caracterizada pelo fato de que a variante de polipeptídeo induz mais fosforilação Akt em células expressando ErbB2/ErbB4 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1.

15 29. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato de que a variante de polipeptídeo possui uma afinidade de ligação diminuída ou similar por um ErbB3 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1.

20 30. Polinucleotídeo, caracterizado pelo fato de compreender uma seqüência de ácido nucleico codificadora da variante de polipeptídeo como definida na reivindicação 17.

31. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de compreender uma quantidade eficaz da variante de polipeptídeo como definida na reivindicação 17 e um excipiente farmacêuticamente aceitável.

25 32. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de compreender uma quantidade eficaz da variante de polipeptídeo como definida na reivindicação 29 e um excipiente farmacêuticamente aceitável.

33. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de compreender uma quantidade eficaz do polinucleotídeo como definida na reivindicação 30 e um excipiente farmacêuticamente aceitável.

34. Kit, caracterizado pelo fato de compreender a composição farmacêutica como definida na reivindicação 31 e uma instrução para usar a composição farmacêutica na prevenção, no tratamento, ou no retardamento de uma doença em um indivíduo via ativação de receptores ErbB2/ErbB4.

5 35. Kit, caracterizado pelo fato de compreender a composição farmacêutica como definida na reivindicação 32 e uma instrução para usar a composição farmacêutica na prevenção, no tratamento, ou no retardamento de uma doença em um indivíduo via ativação de receptores ErbB2/ErbB4.

10 36. Método para prevenção, tratamento, retardamento do desenvolvimento de doenças ou condições, tais como, miocardite viral, cardiomiopatia dilatada (congestiva), toxicidade cardíaca, ou infarto do miocárdio em um indivíduo, caracterizado pelo fato de compreender administrar ao indivíduo, para o qual tal prevenção, tratamento ou retardamento é necessário ou desejável, uma composição farmacêutica
15 compreendendo uma quantidade eficaz da variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 17 e um excipiente farmacêuticamente aceitável.

37. Método de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que o mamífero é um humano.

20 38. Método para triar uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β possuindo afinidade de ligação aumentada para ErbB3, caracterizado pelo fato de compreender:

25 (a) estabelecer uma estrutura tridimensional de uma neuregulina-1 β ou de um seu fragmento, um ErbB3, um ErbB4, um complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento ou do ErbB3, e um complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento e do ErbB4 por modelagem de homologia;

 (b) estabelecer dados de mudanças conformacionais e estabilidade do complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento ou do ErbB3, e do complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento e do ErbB4 em

solução pelo método de simulação de dinâmica molecular;

(c) calcular a energia livre de ligação subtotal ($\langle G_{\text{subtotal tipo selvagem}} \rangle$) da neuregulina-1 β ou do seu fragmento com o ErbB3 ou o ErbB4 pelo método de Molecular Mechanics Poisson Boltzmann Surface Area (MM-PBSA);

(d) calcular a energia livre de ligação subtotal ($\langle G_{\text{subtotal variante alanina-substituída}} \rangle$) de uma variante alanina-substituída da neuregulina-1 β ou do seu fragmento com o ErbB3 ou o ErbB4 pelo método de Molecular Mechanics Poisson Boltzmann Surface Area (MM-PBSA), na qual a variante alanina-substituída compreende um aminoácido da neuregulina-1 β ou do seu fragmento substituído por uma alanina;

(e) calcular $\Delta\langle G_{\text{subtotal}} \rangle = \langle G_{\text{subtotal tipo selvagem}} \rangle - \langle G_{\text{subtotal variante alanina-substituída}} \rangle$;

(f) selecionar variante alanina-substituída que possui um valor positivo de $\Delta\langle G_{\text{subtotal}} \rangle$ para o complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento ou do ErbB3, e possui um valor negativo ou um valor de cerca de zero para $\Delta\langle G_{\text{subtotal}} \rangle$ para o complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento e do ErbB4;

pelo qual a variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β que possui afinidade de ligação aumentada seletiva para ErbB3 é identificada.

39. Variante de polipeptídeo da neuregulina-1 β , caracterizada pelo fato de ser identificada pelo método de acordo com a reivindicação 38.

40. Método para triar uma variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β possuindo afinidade de ligação aumentada para ErbB4, caracterizado pelo fato de compreender:

(a) estabelecer uma estrutura tridimensional de uma neuregulina-1 β ou de um seu fragmento, um ErbB3, um ErbB4, um complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento ou do ErbB3, e um complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento e do ErbB4 por modelagem de

homologia;

(b) estabelecer dados de mudanças conformacionais e estabilidade do complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento ou do ErbB3, e do complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento e do ErbB4 em
5 solução pelo método de simulação de dinâmica molecular;

(c) calcular a energia livre de ligação subtotal ($\langle G_{\text{subtotal tipo selvagem}} \rangle$) da neuregulina-1 β ou do seu fragmento com o ErbB3 ou o ErbB4 pelo método de Molecular Mechanics Poisson Boltzmann Surface Area (MM-PBSA);

10 (d) calcular a energia livre de ligação subtotal ($\langle G_{\text{subtotal variante alanina-substituída}} \rangle$) de uma variante alanina-substituída da neuregulina-1 β ou do seu fragmento com o ErbB3 ou o ErbB4 pelo método de Molecular Mechanics Poisson Boltzmann Surface Area (MM-PBSA), na qual a variante alanina-substituída compreende um aminoácido da neuregulina-1 β ou do seu
15 fragmento substituído por uma alanina;

(e) calcular $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}} = \langle G_{\text{subtotal tipo selvagem}} \rangle - \langle G_{\text{subtotal variante alanina-substituída}} \rangle$;

(f) selecionar variante alanina-substituída que possui um valor positivo de $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ para o complexo da neuregulina-1 β ou do seu
20 fragmento e do ErbB4, e possui um valor negativo ou um valor de cerca de zero para $\Delta\Delta G_{\text{subtotal}}$ para o complexo da neuregulina-1 β ou do seu fragmento e do ErbB3;

pelo qual a variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β que possui afinidade de ligação aumentada seletiva para ErbB4 é identificada.

25 41. Variante de polipeptídeo da neuregulina-1 β , caracterizada pelo fato de ser identificada pelo método como definido na reivindicação 40.

42. Variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β , caracterizada pelo fato de compreender seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo compreende um aminoácido

diferente daquele em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo possui uma afinidade de ligação aumentada para receptores ErbB2/ErbB4 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1, e na qual no resíduo 43 o citado aminoácido diferente é A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y.

43. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 42, caracterizada pelo fato de que a variante de polipeptídeo consiste da sequência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:1, e na qual no resíduo 43 o citado aminoácido diferente é A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y.

44. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 42, caracterizada pelo fato de que no resíduo 43 o citado aminoácido diferente é A.

45. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 43, caracterizada pelo fato de que no resíduo 43 o citado aminoácido diferente é A.

46. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 44, caracterizada pelo fato de que a variante de polipeptídeo induz mais fosforilação Akt em células expressando ErbB2/ErbB4 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1.

47. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 2545, caracterizada pelo fato de que a variante de polipeptídeo induz mais fosforilação Akt em células expressando ErbB2/ErbB4 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1.

48. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 42, caracterizada pelo fato de adicionalmente compreender um aminoácido diferente daquele em SEQ ID NO:1, na qual no resíduo 8, o citado aminoácido diferente é A.

49. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 43

caracterizada pelo fato de compreender ainda um aminoácido diferente daquele em SEQ ID NO:1, na qual no resíduo 8, o citado aminoácido diferente é A.

50. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 48, caracterizada pelo fato de adicionalmente compreender um aminoácido diferente daquele em SEQ ID NO:1, na qual no resíduo 47, o citado aminoácido diferente é A.

51. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 49, caracterizada pelo fato de adicionalmente compreender um aminoácido diferente daquele em SEQ ID NO:1, na qual no resíduo 47, o citado aminoácido diferente é A.

52. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 42, caracterizada pelo fato de adicionalmente compreender um aminoácido diferente daquele em SEQ ID NO:1, na qual no resíduo 47, o citado aminoácido diferente é A.

53. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 43, caracterizada pelo fato de adicionalmente compreender um aminoácido diferente daquele em SEQ ID NO:1, na qual no resíduo 47, o citado aminoácido diferente é A.

54. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 42, caracterizada pelo fato de que a variante de polipeptídeo possui uma afinidade diminuída ou similar para receptores ErbB2/ErbB3 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1.

55. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 54, caracterizada pelo fato de que no resíduo 43 o citado aminoácido diferente é A.

56. Polinucleotídeo, caracterizado pelo fato de compreender uma seqüência de ácido nucleico codificadora da variante de polipeptídeo como definida na reivindicação 42.

57. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de compreender uma quantidade eficaz da variante de polipeptídeo como definida na reivindicação 42 e um excipiente farmaceuticamente aceitável.

5 58. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de compreender uma quantidade eficaz da variante de polipeptídeo como definida na reivindicação 43 e um excipiente farmaceuticamente aceitável.

59. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de compreender uma quantidade eficaz do polinucleotídeo como definido na reivindicação 56 e um excipiente farmaceuticamente aceitável.

10 60. Kit, caracterizado pelo fato de compreender a composição farmacêutica como definida na reivindicação 57 e uma instrução para usar a composição farmacêutica na prevenção, no tratamento, ou no retardamento de uma doença em um indivíduo via ativação de receptores ErbB2/ErbB4.

15 61. Kit, caracterizado pelo fato de compreender a composição farmacêutica como definida na reivindicação 58 e uma instrução para usar a composição farmacêutica na prevenção, no tratamento, ou no retardamento de uma doença em um indivíduo via ativação de receptores ErbB2/ErbB4.

20 62. Método para prevenção, tratamento, retardamento do desenvolvimento de doenças ou condições, tais como, esquizofrenia em um mamífero, caracterizado pelo fato de compreender administrar a um mamífero, para o qual tal prevenção, tratamento ou retardamento é necessário ou desejável, uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade eficaz da variante de polipeptídeo como definida na reivindicação 42 e um excipiente farmaceuticamente aceitável.

25 63. Método de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que o mamífero é um humano.

64. Método para prevenção, tratamento, retardamento do desenvolvimento de doenças ou condições, tais como, miocardite viral, cardiomiopatia dilatada (congestiva), toxicidade cardíaca, infarto do

miocárdio ou doença cardiovascular em um mamífero, caracterizado pelo fato de compreender administrar a um mamífero, para o qual tal prevenção, tratamento ou retardamento é necessário ou desejável, uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade eficaz da variante de polipeptídeo como definido na reivindicação 42 e um excipiente farmaceuticamente aceitável.

65. Método de acordo com a reivindicação 64, caracterizado pelo fato de que o mamífero é um humano.

66. Variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β , caracterizada pelo fato de compreender seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo compreende um aminoácido diferente daquele em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo possui uma afinidade de ligação diminuída para receptores ErbB2/ErbB4 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1, e na qual no resíduo 3 o citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y.

67. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 66, caracterizada pelo fato de que a variante de polipeptídeo consiste da seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:1, e na qual no resíduo 3 o citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y.

68. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 66, caracterizada pelo fato de que no resíduo 3 o citado aminoácido diferente é A.

69. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 67, caracterizada pelo fato de que no resíduo 3 o citado aminoácido diferente é A.

70. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 68, caracterizada pelo fato de que a variante de polipeptídeo induz mais

fosforilação Akt em células expressando ErbB2/ErbB4 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1.

71. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 69, caracterizada pelo fato de que a variante de polipeptídeo induz mais fosforilação Akt em células expressando ErbB2/ErbB4 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1.

72. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 66, caracterizada pelo fato de que a variante de polipeptídeo possui uma afinidade de ligação aumentada ou similar para ErbB2/ErbB3 comparada com o polipeptídeo de SEQ ID NO:1.

73. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 72, caracterizada pelo fato de que no resíduo 3 o citado aminoácido diferente é A.

74. Polinucleotídeo, caracterizado pelo fato de compreender uma seqüência de ácido nucleico codificado da variante de polipeptídeo como definida na reivindicação 66.

75. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de compreender uma quantidade eficaz da variante de polipeptídeo como definida na reivindicação 66 e um excipiente farmacêuticamente aceitável.

76. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de compreender uma quantidade eficaz da variante de polipeptídeo como definida na reivindicação 67 e um excipiente farmacêuticamente aceitável.

77. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de compreender uma quantidade eficaz do polinucleotídeo como definido na reivindicação 74 e um excipiente farmacêuticamente aceitável.

78. Kit, caracterizado pelo fato de compreender a composição farmacêutica como definida na reivindicação 75 e uma instrução para usar a composição farmacêutica na prevenção, no tratamento, ou no retardamento de uma doença em um indivíduo via ativação de receptores ErbB2/ErbB3.

79. Kit, caracterizado pelo fato de compreender a composição farmacêutica como definida na reivindicação 76 e uma instrução para usar a composição farmacêutica na prevenção, no tratamento, ou no retardamento de uma doença em um indivíduo via ativação de receptores ErbB2/ErbB3.

5 80. Método para prevenção, tratamento, retardamento do desenvolvimento de doenças ou condições, tais como, esquizofrenia em um mamífero, caracterizado pelo fato de administrar a um mamífero, para o qual tal prevenção, tratamento ou retardamento é necessário ou desejável, uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade eficaz da variante de polipeptídeo como definida na reivindicação 66 e um excipiente
10 farmaceuticamente aceitável.

81. Método de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de que o mamífero é um humano.

15 82. Método para prevenção, tratamento, retardamento do desenvolvimento de doenças ou condições, tais como, miocardite viral, cardiomiopatia dilatada (congestiva), toxicidade cardíaca, doença cardiovascular ou infarto do miocárdio em um mamífero, caracterizado pelo fato de compreender administrar a um mamífero, para o qual tal prevenção, tratamento ou retardamento é necessário ou desejável, uma composição
20 farmacêutica compreendendo uma quantidade eficaz da variante de polipeptídeo como definida na reivindicação 66 e um excipiente farmaceuticamente aceitável.

83. Método de acordo com a reivindicação 82, caracterizado pelo fato de que o mamífero é um humano.

25 84. Variante de polipeptídeo de neuregulina-1 β , caracterizada pelo fato de compreender seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo compreende um aminoácido diferente daquele em SEQ ID NO:1, na qual a variante de polipeptídeo possui uma afinidade de ligação aumentada para ErbB3 comparada com o

polipeptídeo de SEQ ID NO:1, e na qual no resíduo 8 o citado aminoácido diferente é A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y; e/ou no resíduo 43 o citado aminoácido diferente é A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y; e/ou no resíduo 47 o citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y.

85. Variante de polipeptídeo de acordo com a reivindicação 84, caracterizada pelo fato de que a variante de polipeptídeo consiste da seqüência de aminoácidos mostrada em SEQ ID NO:1, e na qual

no resíduo 8 o citado aminoácido diferente é A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y; e/ou

no resíduo 43 o citado aminoácido diferente é A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y; e/ou

no resíduo 47 o citado aminoácido diferente é A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, ou Y.

Fig.1A

EGFR	<u>FAKCCGGSNKLTLQGTIFEDHFLSLQRHFNRCVVLGNLETTYVQRNYDLSFLKTIQEVA</u>
Erbb3	<u>--AVCPGTLNGLSVTGDANQVQITLYKLYERCEVVMGNLEIVLTGHADLSFLQWREVY</u>
	** ** * * : * * : : * : : : . * * * * : * * * * : : * * :
EGFR	<u>GYVLTALNTVERIFLENLQITIRGNMYENSALAVLSNTDANKT--KELPHEMLQETLH</u>
Erbb3	<u>GYVLAMNEFSTLPIPHLRVVRGTQVYDGTALFVHLNYTNSS--LRQLRLTQLTEIS</u>
	*** : * * : : * * * : : * * . * : : * : * : * : * : : * * * :
EGFR	<u>GAVRFSNRPALCNVESTQWRDIVSSDFLSMSMDFQNLGSCQKCDPSCFNGSCWAGGE</u>
Erbb3	<u>GGVYIEKNKLCNMDTIDWRDIV--RQDAKIVVKNGRSCPPCHEVC--KGRCHGPGSE</u>
	* . * : : * * * : : * * * * : : : : * * * . * : * * * * . *
EGFR	<u>HCQLTKITCAQQSGRCRGSFSDCCNQCAGCTGPRESDCLVCRKFRDEATCEDTCP</u>
Erbb3	<u>DCQILTITICAPQCNGHCPGPNPQCCHDCAGGCSGPQDTDCFACRMENDSGACYPBCF</u>
	: * . * * * * * * * * : * . * * * : * * * : * * * : * * * : * * *
EGFR	<u>PLMLYNPTTYQHDVNPFGKYSFGATCVKCPENYVTDHSCVRACGADSYEMEDGVK</u>
Erbb3	<u>QLLYNKLITGLEPNPHTKYGGVCVASCPIHFW--PQSCVRACPPDKNEVDKNGELM</u>
	: : * * * : * : * . * * . * * * : * * * : * * * : * * * : * * :
EGFR	<u>CKRCGPCKVCHGIGLHFKDSISINATRIKHFNCYTSISGDLHILPVAFRGDSFTHP</u>
Erbb3	<u>CEPCGGLCPKACGEGSG--SRFQTVDSHIDGFVCTIKLGNLDFLTGLNGDFHKLIP</u>
	* : * * * . * * * * : : : : * * . * * * . * * : * * : * * : * *
EGFR	<u>PLDPQELDILKTVKELTGFLITQAWPENRTDLAFENLILRGRTKQHQGFSLAVV--SLN</u>
Erbb3	<u>ALDPKLVVFAIVKELTGFLINQSWPPMHNFSVPSNLTIGGRSLYNRGESLIMAGLN</u>
	. * * : : * : : * * * * : * * * : : . * * * * : * * : * * : * *
EGFR	<u>ITSLGLRSLKETSIDGVITISGHNLCYANTLNH--MLPETSQKTKIISNRGENSKATG</u>
Erbb3	<u>VTSLGFRSLKETSAGRIYISANRQLCYHMSLNH--TAVLRPTZERLDIKHNRPRICVAEG</u>
	: * * * : * * * * * : * * . * : * * : : * * * * : : * * * . * * *
EGFR	<u>QVCHALCSPEGCHGFPEDCVSCNYSRGRECI--</u>
Erbb3	<u>KVCDPLCSSGGCHGPGGQLSCNYSRGGVCH--</u>
	: * . * * . * * * * * : * : * * * * * *

Fig.1B

EGFR	<u>EKRVCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNCEVVLGHLEITTVQRNYDLSFLKTIQEVA</u>
Er-bB4	<u>SQSYCAGTENKLSLSHLEQQYRALRKYVENCEVWGHLEITTSIEHNRDLSFLRSVREVT</u>
	..** **.*.***.:. * :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*: :*:
EGFR	<u>GYVLIALNTVERIFLENLQITRGHMYEENSYALAVLSNYD</u> 4- <u>KK7</u> <u>FLKRLPNNHQETLM</u>
Er-bB4	<u>GYVLVALNDFRYLPLENLRITRGTKLYEDRYALATFLNYR</u> 40 <u>GNP</u> <u>FLQELGLKRLTEILN</u>
	: .. :***:***. ** :***: ** .. **:*** :*** **:
EGFR	<u>GAVRFSRNPALCHVPSIQWRDIVSSDFLSNRSHDFQNLGSCQKCDPSC</u> 7 <u>PGS</u> <u>WAGAGEE</u>
Er-bB4	<u>GGVYVDQNRFLCYADTIDHQDIVENFWPSNLTLYSTNGSSGCGRCHUSC</u> -7 <u>GAG</u> <u>RGPTEN</u>
	*. * . . * ** . :*:***. ! **: : * . . * . * . * . * . * . *
EGFR	<u>NCQKLTKITCAQQCSGRCRGKSESDCCHNQCAAGCTGPRESDCLVCRIFRDEATCDTCP</u>
Er-bB4	<u>NCQILTRIVCAHQCDGRCYGFYVSDCCNRECAGGSGPKDIDCFACHNFNDSGALVTQCF</u>
	:**:** :***:*** * ****. **:***:***:***. * . * . . * **
EGFR	<u>PLNLYNPTTYQMDVMEGRYSFGATCVKRCPEHVV</u> 77 <u>SSCVRACGADSTHEEDGVK</u>
Er-bB4	<u>STFVYNPTTFGLERHFNKYTYGAFVKKCPHFW</u> -25 <u>SSCVRACPSSKNEVKEGKLN</u>
	:***:***: * . * . :*** ****:*** * ****. .. :***: :
EGFR	<u>CEKCEGFCRRVCNGRGIGCFEDSLSNATNLKPFNCTSLSGDLHLPVAFRGDSFTHP</u>
Er-bB4	<u>CKPCTDLCPKACDGGTGSLSAQTVDSSHDKFINDCTKNGHLIFLVTDGAGPYRAIE</u>
	** * . * . * . *** * . : : :*:***. * **.*. * . * . :*:***. :
EGFR	<u>PLDPQRLDYLKTVKRTGFLITQAWPENRTDLHAFENLITRGRTQHGQPSLAWSLHT</u>
Er-bB4	<u>AIDPEKLNVERIVREITGFLNIQSFPNATDYSVFSNLTIGGRVLYSGLSLLILKQGGI</u>
	:***:***:***:***:*** **:* * **: . * . * . * . * . * . *
EGFR	<u>TSLGLRSLKRISDGNVLIISGNKRLCYANTLHWKLPGISGQRTKLLSNRGENSECKATGV</u>
Er-bB4	<u>TSLOFQSLKRISAGHYITDMSHLCYHNTLHWITLSTINGRTVIRDNRKAERCIAEGHV</u>
	*** :***:*** * : . * . *** :***. **: * . * . * . * . *
EGFR	<u>CHALCSPEGCGPEPRDCVSCENVSRRGECV</u>
Er-bB4	<u>CHMLCSSDGCWGPDPQCLSCRRFSRGRICI</u>
	*: ***. :***: * :*:***. *** *

Fig.2A

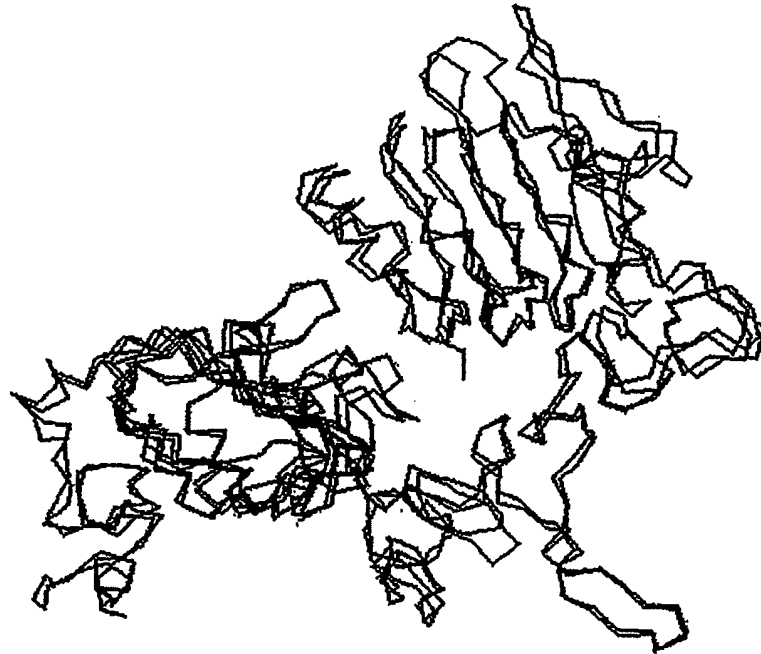


Fig.2B

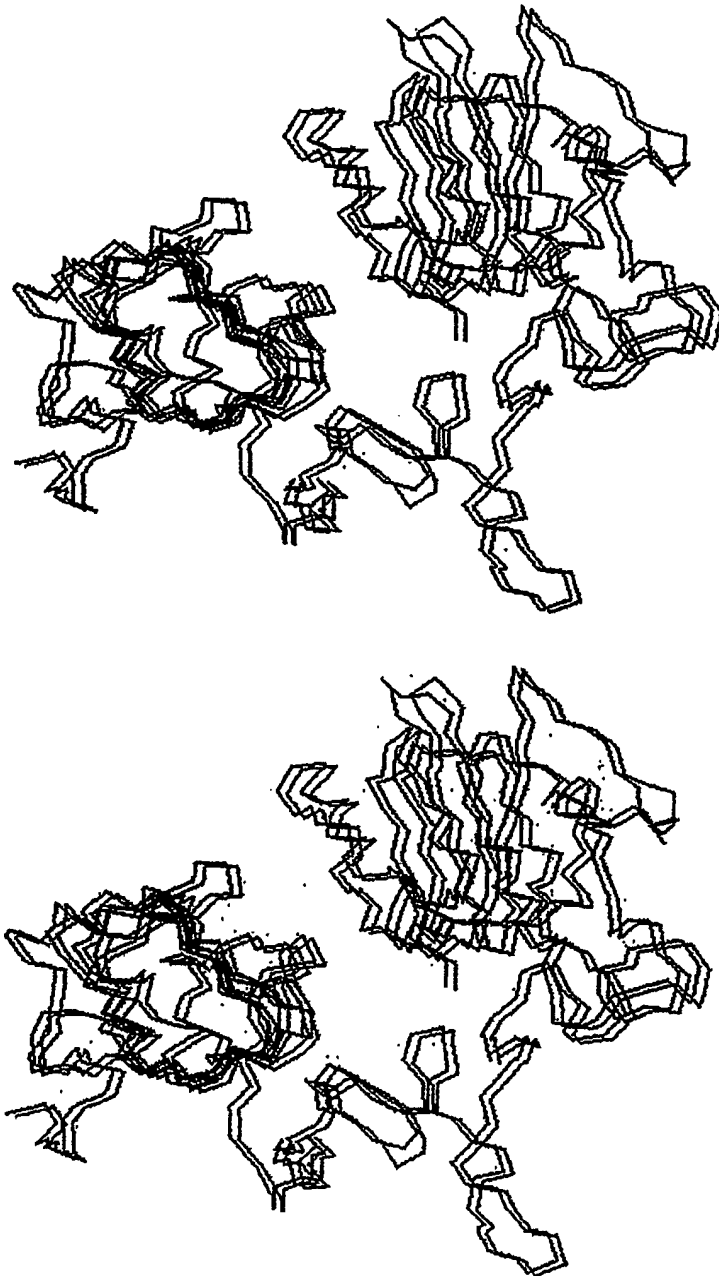


Fig.3

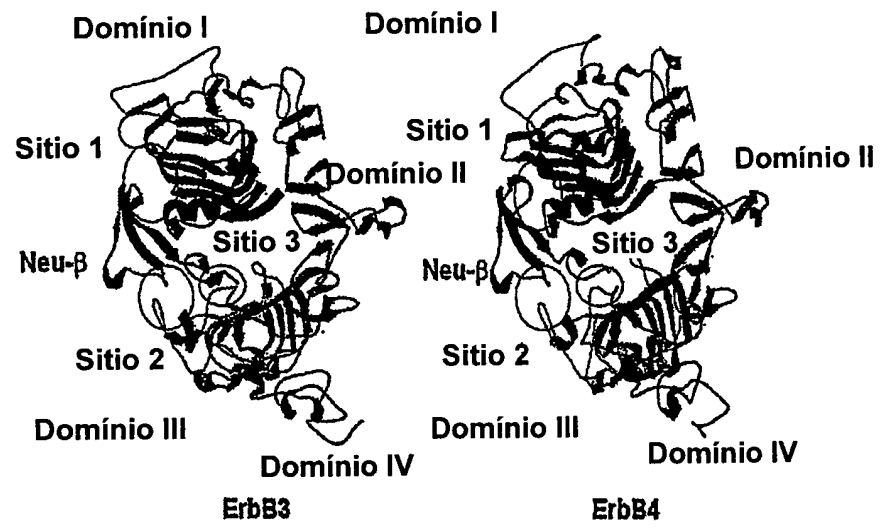


Fig.4A

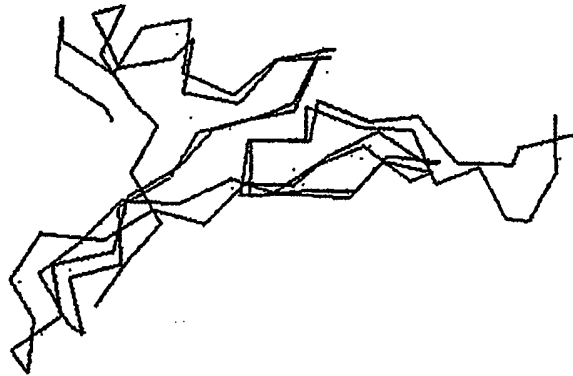
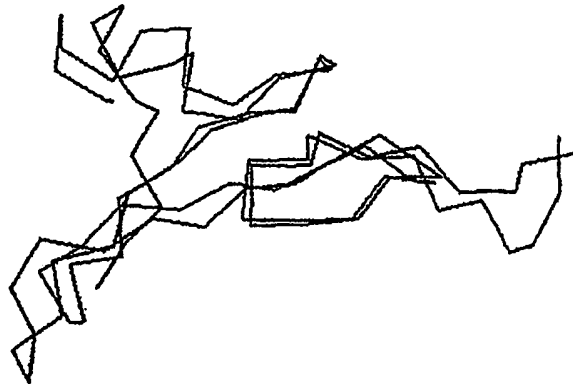


Fig.4B

	1	10	20	30	40	50
NRG-1a	SHLVKCAEKEKIFCVNGGELFMVKDLSNPSRYLCECPNEFTGDRGQNTVMAS					
MEGF	NSDSELPLSHDGYCLEHGVCMYIEALD—KVACNCVVVFYGERCQYRDLEW					

Fig.5

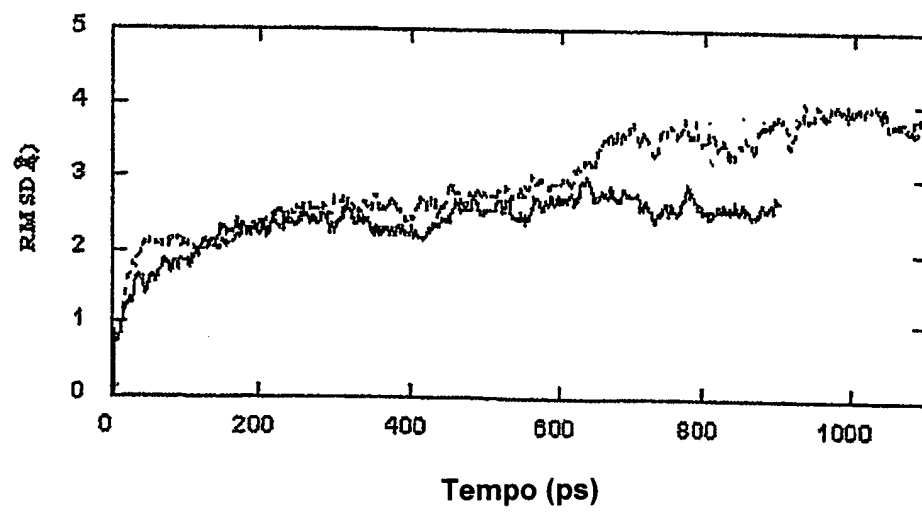


Fig.6A

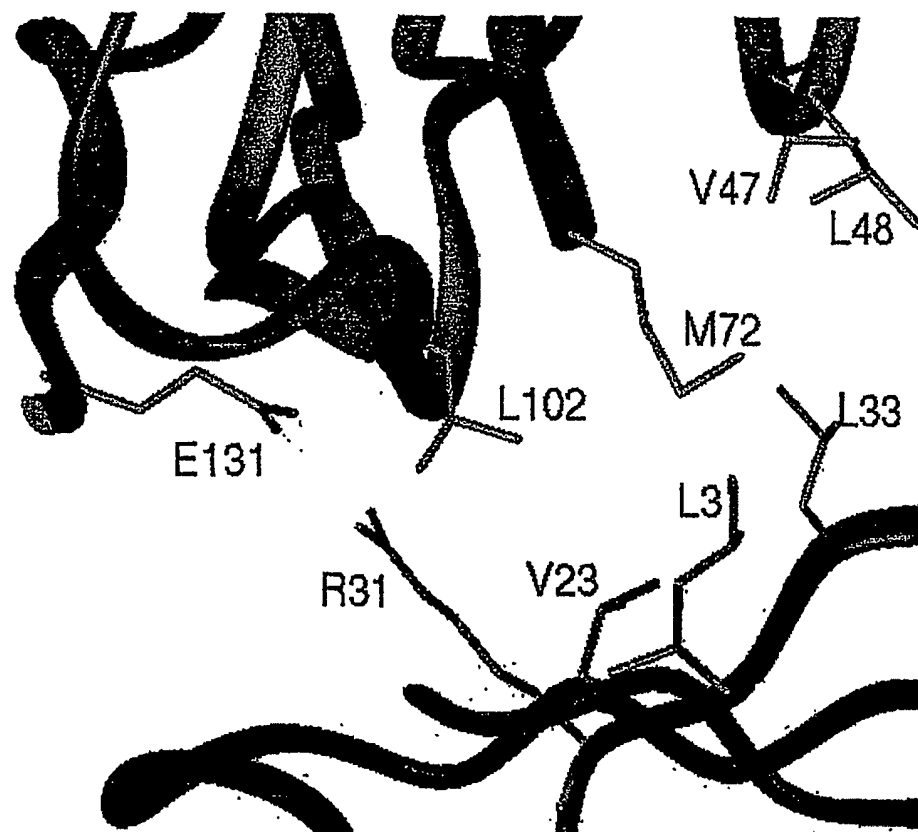


Fig.6B

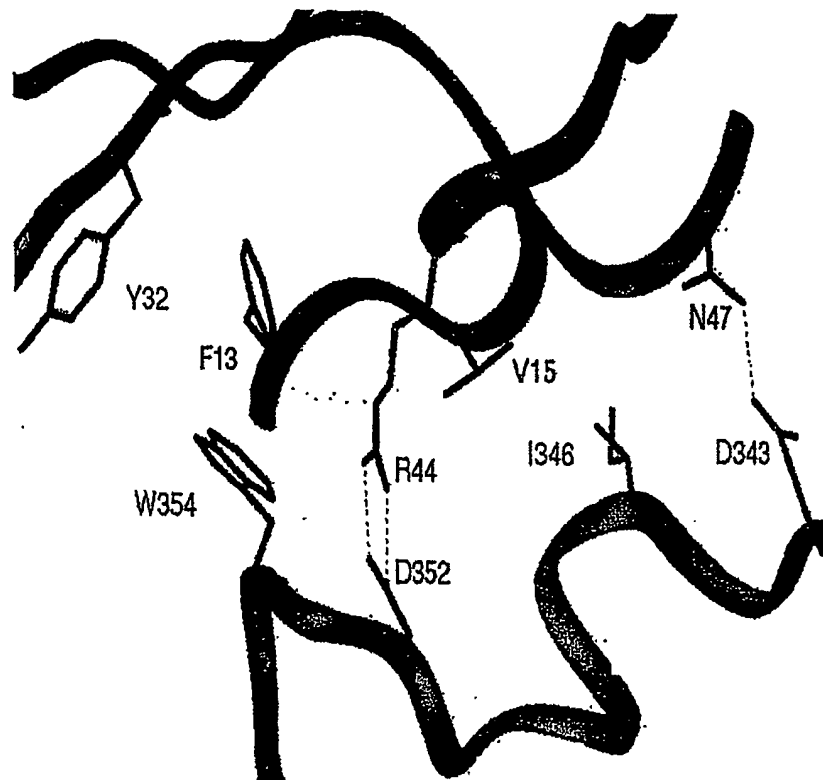


Fig.6C

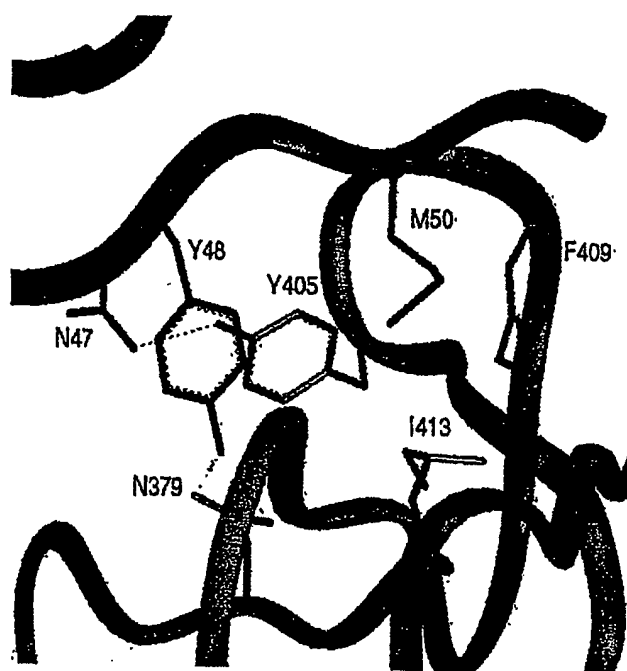


Fig.7A

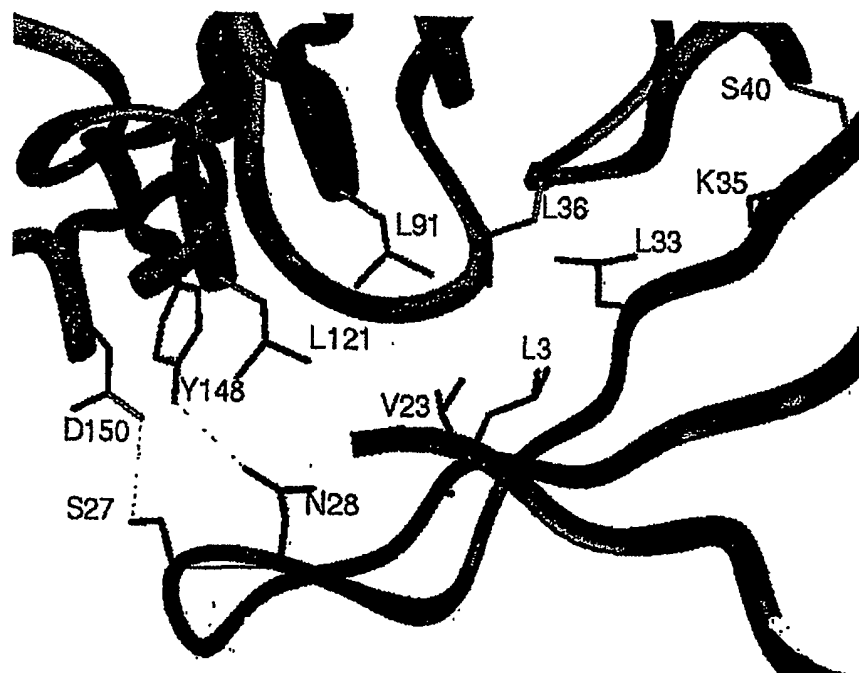


Fig.7B

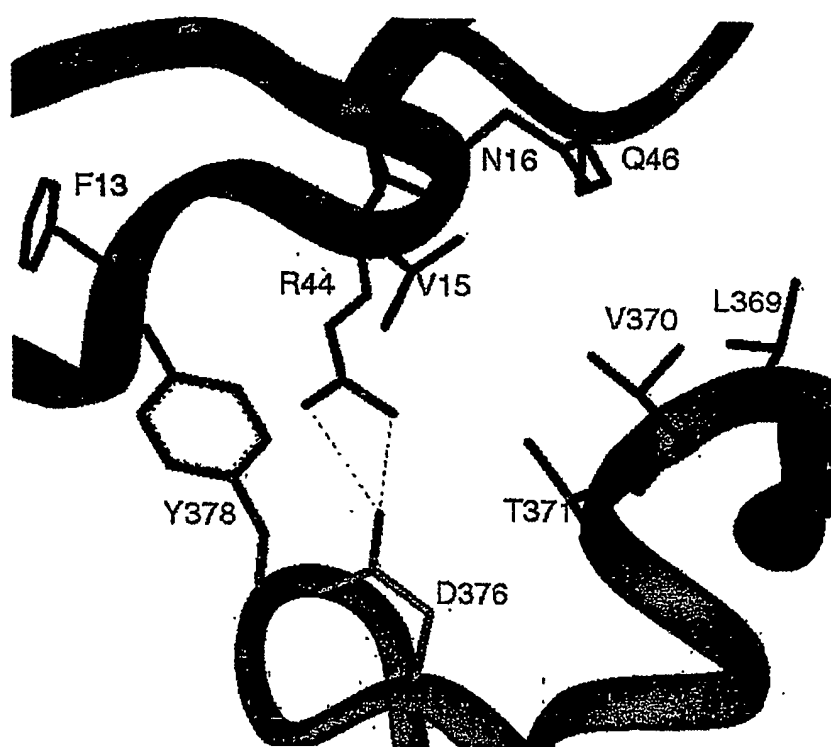


Fig.7C

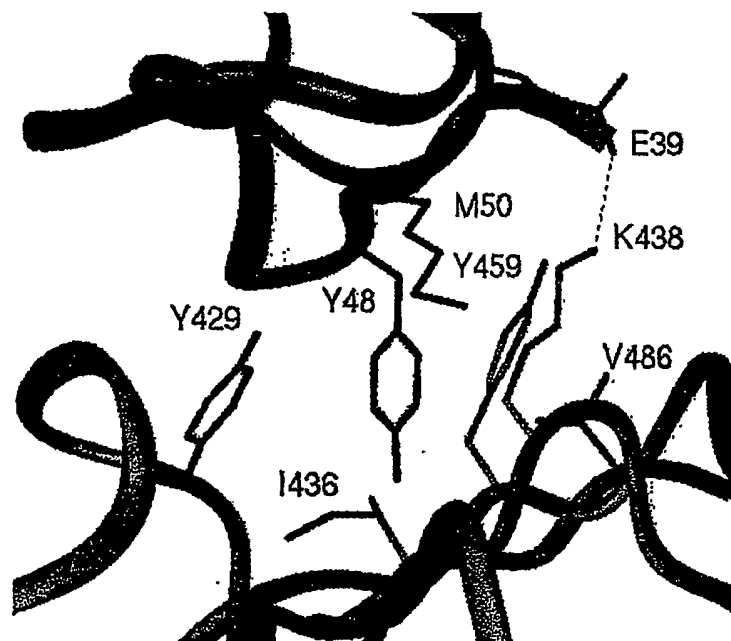


Fig.8

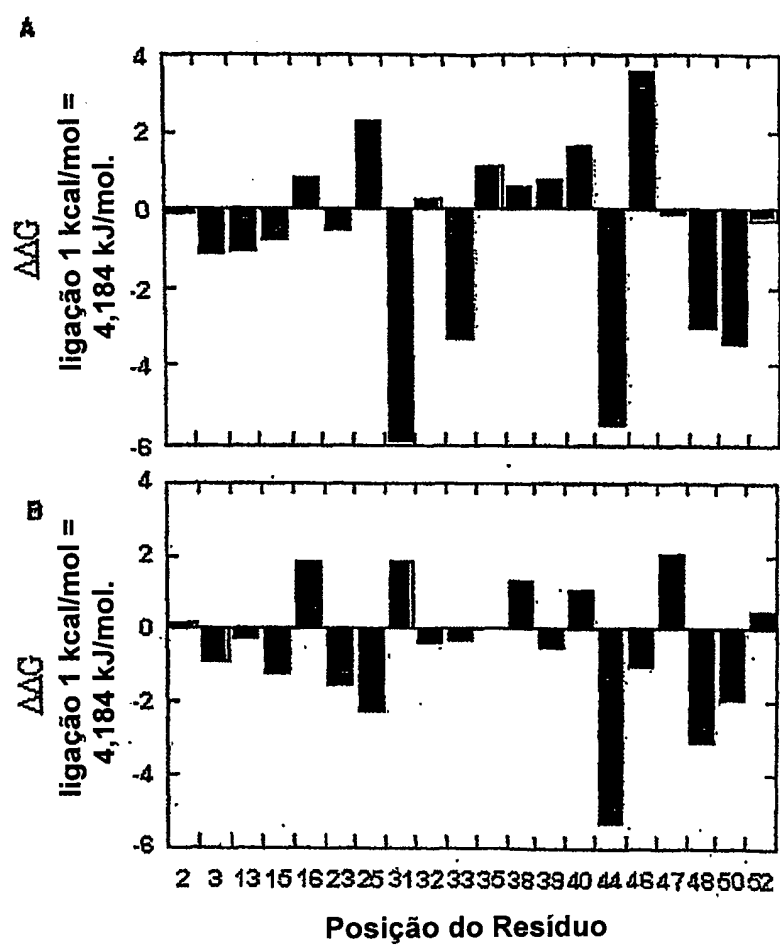


Fig.9

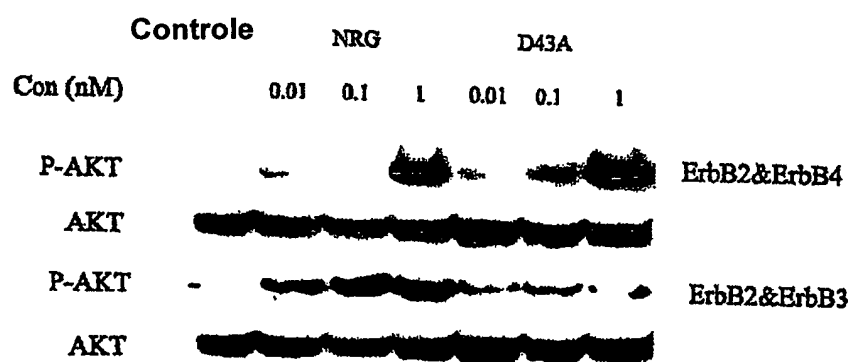


Fig.10

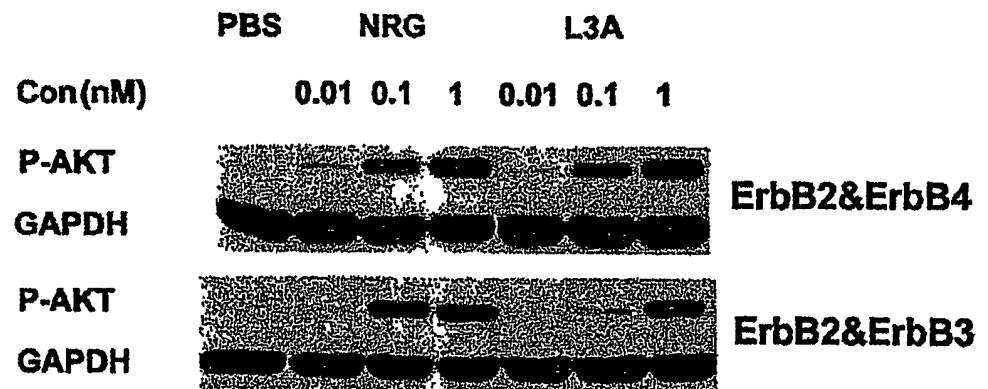
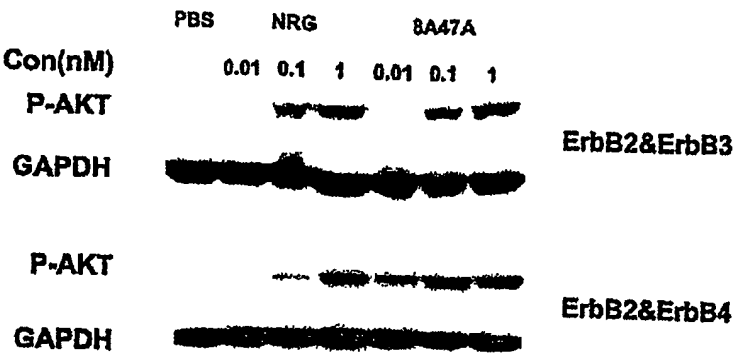


Fig.11



RESUMO

“VARIANTE DE POLIPEPTÍDEO DE NEUREGULINA-1-BETA, POLINUCLEOTÍDEO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, KIT, E, MÉTODOS PARA PREVENÇÃO, TRATAMENTO, RETARDAMENTO DO
5 DESENVOLVIMENTO DE DOENÇAS OU CONDIÇÕES, E PARA TRIAR UMA VARIANTE DE POLIPEPTÍDEO DE NEUREGULINA-1-BETA”

A presente invenção proporciona variantes de polipeptídeo de neuregulina-1 β (NRG-1 β) têm intensificado ou decrescido a finidade de ligação por ErbB3 e/ou ErbB4. A invenção também proporciona métodos de
10 triagem e de produção de variantes de polipeptídeo de NRG-1 β e métodos de uso de variantes de polipeptídeo de NRG-1 β para tratar doenças.