

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 38/51 (2018.08); A61P 25/00 (2018.08); A61K 9/08 (2018.08); A61K 2300/00 (2018.08)

(21) (22) Заявка: 2014131265, 28.07.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
02.03.2009Дата регистрации:
07.05.2019

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
29.02.2008 US 61/067,589(62) Номер и дата подачи первоначальной заявки,
из которой данная заявка выделена:
2010139906 02.03.2009

(43) Дата публикации заявки: 20.02.2016 Бюл. № 5

(45) Опубликовано: 07.05.2019 Бюл. № 13

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение
3, ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

КИМ Хаесун (US),
КАДЖАНО Энтони О. (US)

(73) Патентообладатель(и):

АКОРДА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 94/04560 A1, 03.03.1994.
WO2004/110359 A2, 23.12.2004. ГРЭХАМ-
СМИТ Д.Г. и др. Оксфордский справочник
по клинической фармакологии. М.,
Медицина, 2000, с.27-32, с.137 глава 10.2.2.,
с.139-146 1 колонка 2-й абзац. PENDERIS J.
et al. Increasing local levels of neugulin (glial
growth factor-2) by direct infusion into areas
of demyelination does not (см. прод.)

(54) СПОСОБ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ТРЕБУЕМЫХ УРОВНЕЙ ФАКТОРА 2 РОСТА ГЛИИ В ПЛАЗМЕ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине. Предложен способ расширения диапазона терапевтических доз фактора 2 роста глии (GGF2), когда GGF2 используется для способствования миелинизации, включающий отбор пациента с заболеванием или нарушением, связанным со сниженными уровнями миелинизации, введение ему GGF2 и ингибитора пути с участием Mek1/Erk, посредством чего возникает GGF2-опосредованная миелинизация при более высоких

дозах GGF2, чем она могла бы происходить в отсутствие введения ингибитора пути с участием Mek1/Erk. Технический результат состоит в оптимизации терапевтической дозы GGF2, в частности в её определении как 500 нг ±15% с ограничением неблагоприятных эффектов – ингибирования миелинизации при высоких концентрациях GGF2 за счёт эффекта ингибитора Mek1/Erk. 4 з.п. ф-лы, 12 ил.

(56) (продолжение):

alter remyelination in the rat CNS. European Journal of neuroscience. 2003 vol.18, pp.2253-2264.

MAUREL P. et al. Axonal regulation of schwann cell proliferation and survival and the initial events of myelination requires PI 3-kinase activity. The Journal of neuroscience. 2000 June 15, 20(12):4635-4636.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(19) **RU** (11)**2 687 097⁽¹³⁾ C2**

(51) Int. Cl.

A61K 38/51 (2006.01)*A61P 25/00* (2006.01)

(52) CPC

A61K 38/51 (2018.08); *A61P 25/00* (2018.08); *A61K 9/08* (2018.08); *A61K 2300/00* (2018.08)(21) (22) Application: **2014131265, 28.07.2014**(24) Effective date for property rights:
02.03.2009Registration date:
07.05.2019

Priority:

(30) Convention priority:
29.02.2008 US 61/067,589(62) Number and date of filing of the initial application,
from which the given application is allocated:
2010139906 02.03.2009(43) Application published: **20.02.2016 Bull. № 5**(45) Date of publication: **07.05.2019 Bull. № 13**

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, stroenie 3,
OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i
Partnery"**

(72) Inventor(s):

**KIM Khaesun (US),
KADZHANO Entoni O. (US)**

(73) Proprietor(s):

AKORDA TERAPYUTIKS, INK. (US)(54) **METHOD FOR ACHIEVING DESIRED GLIAL GROWTH FACTOR 2 PLASMA LEVELS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: proposed is a method for expanding a range of therapeutic doses of glial growth factor 2 (GGF2) when GGF2 is used for promoting myelination, including selecting a patient afflicted with a disease or disorder associated with reduced levels of myelination, administering GGF2 and a Mek1/Erk pathway inhibitor, whereby GGF2-mediated myelination occurs at higher

doses of GGF2 than without administering a Mek1/Erk pathway inhibitor.

EFFECT: technical result is optimizing the therapeutic dose of GGF2, in particular, in its definition as 500 ng ± 15 % with the restriction of adverse effects - inhibition of myelination at high concentrations of GGF2 due to the Mek1/Erk inhibitor effect.

5 cl, 12 dwg

RU 2 687 097 C 2

RU 2 687 097 C 2

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По настоящей заявке испрашивается приоритет согласно § 119(e) раздела 35 свода законов США по предварительной заявке на патент США с серийным № 61/067589, поданной 29 февраля 2008 года, которая полностью включена в настоящее описание посредством ссылки.

Исследование, приведшее к настоящему изобретению, было финансировано частично грантом Национального института здравоохранения № RO1-NS45939-01. Правительство Соединенных Штатов имеет определенные права на настоящее изобретение.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к введению фактора 2 роста глии (GGF2) нуждающемуся в этом пациенту для обеспечения уровней GGF2 в сыворотке в пределах требуемого терапевтического окна, определяемого на основе заболевания или нарушения, поражающего пациента.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Нейрегулины (NRG) и рецепторы NRG включают систему фактор роста-рецепторная тирозинкиназа для передачи сигналов от клетки к клетке, которая вовлечена в органогенез нервной, мышечной, эпителиальной и других тканей (Lemke, *Mol. Cell Neurosci.* 7: 247-262, 1996; Burden et al., *Neuron* 18: 847-855, 1997). Семейство NRG состоит из трех генов, которые кодируют многочисленные лиганды, содержащие подобные эпидермальному фактору роста (EGF), иммуноглобулиновые (Ig) и другие распознаваемые домены. Многочисленные секретируемые и присоединенные к мембране изоформы функционируют в качестве лигандов в этой системе передачи сигналов. Все рецепторы для NRG являются членами семейства рецепторов EGF (EGFR) и включают EGFR (или ErbB1), ErbB2, ErbB3 и ErbB4, также известные как HER1-HER4, соответственно, у людей (Meyer et al., *Development* 124: 3575-3586, 1997; Orr-Urtreger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1867-1871, 1993; Marchionni et al., *Nature* 362: 312-318, 1993; Chen et al., *J. Comp. Neurol.* 349: 389-400; 1994; Corfas et al., *Neuron* 14: 103-115, 1995; Meyer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1064-1068, 1994; и Pinkas-Kramarski et al., *Oncogene* 15: 2803-2815, 1997).

Три гена NRG, Nrg-1, Nrg-2 и Nrg-3, локализируются в различных хромосомных локусах (Pinkas-Kramarski et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 9387-9391, 1994; Carraway et al., *Nature* 387: 512-516, 1997; Chang et al., *Nature* 387: 509-511, 1997; и Zhang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 9562-9567, 1997) и в совокупности кодируют разнообразную совокупность белков NRG. Самыми детально изученными к настоящему времени являются продукты гена Nrg-1, которые включают группу из приблизительно 15 отличных структурно-родственных изоформ (Lemke, *Mol. Cell Neurosci.* 7: 247-262, 1996; и Peles and Yarden, *BioEssays* 15: 815-824, 1993). Впервые идентифицированные изоформы NRG-1 включали фактор дифференциации нейтрофилов (NDF; Peles et al., *Cell* 69, 205-216, 1992 и Wen et al., *Cell* 69, 559-572, 1992), херегулин (HRG; Holmes et al., *Science* 256: 1205-1210, 1992), индуцирующую рецепторы для ацетилхолина активность (ARIA; Falls et al., *Cell* 72: 801-815, 1993) и факторы роста глии GGF1, GGF2 и GGF3 (Marchionni et al. *Nature* 362: 312-318, 1993).

Ген Nrg-2 был идентифицирован с помощью клонирования по гомологии (Chang et al., *Nature* 387: 509-512, 1997; Carraway et al., *Nature* 387: 512-516, 1997; и Higashiyama et al., *J. Biochem.* 122: 675-680, 1997) и благодаря геномным подходам (Busfield et al., *Mol. Cell Biol.* 17: 4007-4014, 1997). кДНК NRG-2 также известны как активатор киназ ErbB невральное и тимусного происхождения (NTAK; входящий № в GenBank - AB005060), дивергент нейрегулина (Don-1) и фактор роста мозжечкового происхождения (CDGF;

заявка РСТ WO 97/09425). Экспериментальные данные показывают, что клетки, экспрессирующие ErbB4 или комбинацию ErbB2/ErbB4, по-видимому, демонстрируют особенно сильный ответ на NRG-2 (Pinkas-Kramarski et al., Mol. Cell. Biol. 18: 6090-6101, 1998). Также известно, что продукт гена Nrg-3 (Zhang et al., выше) связывается с рецепторами ErbB4 и стимулирует их (Hijazi et al., Int. J. Oncol. 13: 1061-1067, 1998).

Домен EGFL присутствует в сердцевине всех форм NRG и необходим для связывания с рецепторами ErbB и их активации. Расшифрованные аминокислотные последовательности доменов EGFL, кодируемых в трех генах, идентичны на приблизительно 30-40% (при попарных сравнениях). Кроме того, существуют, по-видимому, по меньшей мере две субформы доменов EGFL в NRG-1 и NRG-2, которые могут сообщить различные биоактивности и тканеспецифические активности.

Клеточные ответы на NRG опосредуются через рецепторные тирозинкиназы для NRG EGFR, ErbB2, ErbB3 и ErbB4 семейства рецепторов эпидермального фактора роста (Busfield et al., 1997, Mol. Cell Biol. 17: 4007-4014; Carraway et al., 1997, Nature 387: 512-516; Chang et al., 1997, Nature 387: 509-512). Связывание с высоким сродством всех NRG опосредуется, главным образом, через либо ErbB3, либо ErbB4 (Ferguson et al., 2000, EMBO J. 19: 4632-4643). Связывание лигандов NRG приводит к димеризации с другими субъединицами ErbB и трансактивации при фосфорилировании на специфических остатках тирозина (Honegger et al., 1990, Mol. Cell Biol. 10: 4035-4044; Lemmon and Schlessinger, 1994, Trends Biochem Sci. 19: 459-463; Heldin, 1995, Cell. 80: 213-223; Hubbard et al., 1998, J. Biol. Chem. 273: 11987-11990). При определенных установочных параметрах эксперимента почти все комбинации рецепторов ErbB, по-видимому, способны к образованию димеров в ответ на связывание изоформ NRG-1. Однако ErbB2, по-видимому, является предпочтительным партнером по димеризации, который может играть важную роль в стабилизации комплекса лиганд-рецептор.

Установлено, что GGF2 стимулирует пролиферацию, дифференциацию и защиту шванновских клеток (Goodearl et al., 1993, J. Biol. Chem. 268: 18095-18102; Minghetti et al., 1996, J. Neurosci. Res. 43: 684-693). Экспрессия NRG-1, ErbB2 и ErbB4 также необходима для образования трабекулы вентрикулярного миокарда во время развития мышцы (Meyer and Birchmeier 1995, Nature 378: 386-390; Gassmann et al., 1995, Nature 378: 390-394; Kramer et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 4833-4838). Также было установлено, что GGF2 стимулирует пролиферацию и защиту клеток кардиомиоцитов (Zhao et al., 1998, J. Biol. Chem. 273: 10261-10269). GGF2-опосредованная нейропротекция также продемонстрирована в моделях инсульта на животных, хотя относящиеся к дозированию параметры остаются неопределенными.

Настоящее изобретение совершенствует применение GGF2 в отношении терапевтических применений путем обеспечения руководства в отношении способов введения GGF2, которые оптимизируют терапевтическую пользу с ограничением неблагоприятных эффектов. Настоящее изобретение определяет целевые терапевтические окна для уровней концентраций GGF2 в сыворотке, которые точно определены в отношении конкретных болезненных состояний.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к введению GGF2 нуждающемуся в этом пациенту для обеспечения уровней GGF2 в плазме (сыворотке) в пределах целевого терапевтического окна, которое, как определено, является эффективным при лечении заболевания или нарушения. В соответствии с настоящим изобретением GGF2 может вводиться в фармацевтической композиции.

В соответствии с настоящим изобретением предоставляется способ избегания

ингибирования миелинизации шванновскими клетками после введения фактора 2 роста глии (GGF2) субъекту, включающий обеспечение субъекта, нуждающегося в миелинизации нейронов, обеспечение GGF2 в фармацевтически приемлемом носителе, введение GGF2 субъекту и определение того, что количество GGF2 меньше количества, которое ингибирует миелинизацию шванновскими клетками.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу стимуляции миелинизации у пациента, страдающего заболеванием или нарушением, связанным со сниженными уровнями миелинизации, включающему отбор пациента, страдающего заболеванием или нарушением, связанным со сниженными уровнями миелинизации, введение пациенту фактора 2 роста глии (GGF2) в количестве, составляющем приблизительно 500 нг GGF2 на кг веса тела, посредством чего стимулируется миелинизация.

В еще одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу стимуляции миелинизации у пациента, страдающего заболеванием или нарушением, связанным со сниженными уровнями миелинизации, включающему отбор пациента, страдающего заболеванием или нарушением, связанным со сниженными уровнями миелинизации, и введение пациенту фактора 2 роста глии (GGF2) в количестве, которое обеспечивает уровень в плазме, составляющий приблизительно 0,01 нМ GGF2.

В дальнейшем варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу расширения диапазона терапевтических доз GGF2, когда GGF2 используется для способствования миелинизации, включающему отбор пациента с заболеванием или нарушением, связанным со сниженными уровнями миелинизации, введение пациенту GGF2 и ингибитора пути с участием Mek1/Erk, посредством чего GGF2-опосредованная миелинизация происходит при более высоких дозах GGF2, чем она могла бы происходить в отсутствие введения ингибитора пути с участием Mek1/Erk.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу определения того, является ли количество GGF2 терапевтически эффективным количеством для стимуляции миелинизации, включающему обеспечение субъекта, получающего терапию с использованием GGF2, и измерение уровней белка c-Jun у субъекта, посредством чего увеличение c-Jun относительно базовых уровней c-Jun указывает на то, что количество GGF2 близко к максимальному порогу терапевтической эффективности для стимуляции миелинизации.

В конкретном варианте осуществления настоящего изобретения GGF2 вводят млекопитающему, используя схему введения доз, направленную на обеспечение узкого целевого терапевтического окна концентраций GGF2 в плазме.

Как указано в настоящем документе, известно, что GGF2 способен к стимуляции пролиферации, дифференциации и защите шванновских клеток. Также было установлено, что GGF2 стимулирует ремиелинизацию и ослабляет симптомы в моделях рассеянного склероза, в том числе экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита, на животных. Однако в некоторых случаях (например, при высоких концентрациях GGF2) GGF2 может предотвращать миелинизацию нейронов, сокультивируемых со шванновскими клетками.

Представленные в настоящем документе данные показывают, что GGF2 действительно способен к стимуляции миелинизации периферических нервов, но они (данные) указывают, что для обеспечения требуемой GGF2-опосредованной, стимулируемой миелинизации периферических нервов необходимо введение точных доз GGF2 нуждающемуся в этом млекопитающему. Как указано в настоящем документе, GGF2 вводят так, чтобы он находился в пределах терапевтического окна концентраций

GGF2 в плазме для того, чтобы стимулировать миелинизацию. В отсутствие результатов, представленных в настоящем документе, нет оценки узкого терапевтического окна концентраций GGF2 в плазме, необходимого для стимуляции миелинизации у нуждающегося в этом млекопитающего.

5 Представленные в настоящем документе данные также показывают, что GGF2 достаточен для стимуляции миелинизации и избавления от недостатка миелинизации на дефицитных по CRD-Nrg1 аксонах. Однако при высоких концентрациях GGF2 ингибирует миелинизацию Erk-зависимым образом. Результаты настоящего исследования показывают, что GGF2 способен как к стимуляции, так и к ингибированию миелинизации
10 в зависимости от концентраций, представляемых шванновским клеткам.

Соответственно, настоящее изобретение относится к удивительному обнаружению того, что существует до сего времени неосознанная положительная корреляция между GGF2-опосредованной активацией пути с участием PI3-киназы и стимуляцией миелинизации, и существует отрицательная корреляция между GGF2-опосредованной
15 активацией пути с участием Mek1/Erk и стимуляцией миелинизации. Иначе говоря, авторы настоящего изобретения обнаружили, что введение GGF2 можно точно регулировать для стимуляции миелинизации путем оценки уровней активации этих путей. В соответствии с настоящим изобретением целевое терапевтическое окно для GGF2 в отношении стимуляции миелинизации у субъекта представляет собой количество
20 GGF2, которое вызывает активацию пути с участием PI3-киназы (проверяемую, например, путем выявления фосфорилированной Akt) в отсутствие выявляемой активации пути с участием Mek1/Erk (проверяемой, например, путем выявления фосфорилированной Erk).

Составы и композиции по настоящему изобретению демонстрируют специфический,
25 требуемый профиль высвобождения, который максимизирует терапевтический эффект при минимизации неблагоприятных побочных эффектов. Требуемый профиль высвобождения может быть охарактеризован с учетом максимальной концентрации в плазме лекарственного средства или активного агента (C_{max}) и концентрации в плазме лекарственного средства или активного агента в конкретном интервале между
30 введениями доз (C_{tau}). Отношение C_{max} к C_{tau} ($C_{max}:C_{tau}$) можно рассчитать на основе наблюдаемых C_{max} и C_{tau} . Интервал между введениями доз (tau) является временем после последнего введения лекарственного средства или активного агента. В настоящей заявке интервал между введениями доз (tau) может, например, составлять двенадцать
35 (12) часов, в этом случае C_{tau} является концентрацией лекарственного средства или активного агента через двенадцать (12) часов от последнего введения.

Кроме того, составы и композиции по настоящему изобретению демонстрируют требуемый профиль высвобождения, который можно охарактеризовать с учетом максимальной концентрации в плазме лекарственного средства или активного агента
40 в состоянии равновесия (C_{maxSS}) и минимальной концентрации в плазме лекарственного средства или активного агента в состоянии равновесия (C_{minSS}). Состояние равновесия наблюдается, когда скорость введения (поглощения) равна скорости удаления лекарственного средства или активного агента. Отношение C_{maxSS} к C_{minSS}
45 ($C_{maxSS}:C_{minSS}$) можно рассчитать на основе наблюдаемых C_{maxSS} и C_{minSS} . Кроме того, составы и композиции по настоящему изобретению демонстрируют требуемый профиль высвобождения, который можно охарактеризовать с учетом средней максимальной концентрации в плазме лекарственного средства или активного агента в состоянии

равновесия (C_{avSS}).

В варианте осуществления настоящего изобретения, направленном на нуждающегося в ремиелинизации пациента, целевые максимальные уровни GGF2 в сыворотке составляют приблизительно 0,01 нМ.

5 В варианте осуществления настоящего изобретения, направленном на нуждающегося в ремиелинизации пациента, целевые максимальные уровни GGF2 в сыворотке составляют любые из следующих значений или приблизительно любые из следующих значений, или диапазоны между следующими значениями: от приблизительно 0,001 до 0,01 нг/мл; от 0,01 до 0,1 нг/мл; от 0,1 до 1,0 нг/мл; от 1,0 до 10 нг/мл; от 10 до 100 нг/мл; или от 100 до 1000 нг/мл. В конкретном варианте осуществления целевой 10 максимальный уровень в сыворотке составляет приблизительно 1,0 нг/мл.

В варианте осуществления настоящего изобретения, направленном на перенесшего инсульт пациента, целевые максимальные уровни GGF2 в сыворотке составляют любые из следующих значений или приблизительно любые из следующих значений, или 15 диапазоны между следующими значениями: от приблизительно 0,00001 до 0,0001 нг/мл; от 0,0001 до 0,001 нг/мл; от 0,001 до 0,01 нг/мл; от 0,01 до 0,1 нг/мл; от 0,1 до 1,0 нг/мл; от 1,0 до 10 нг/мл; от 10 до 100 нг/мл; от 100 до 1000 нг/мл; от 1000 до 10000 нг/мл; или от 10000 до 100000 нг/мл. В конкретном варианте осуществления целевой максимальный уровень в сыворотке составляет приблизительно 0,2 мкг/мл.

20 В варианте осуществления настоящего изобретения, направленном на страдающего невропатией пациента, целевые максимальные уровни GGF2 в сыворотке составляют любые из следующих значений или приблизительно любые из следующих значений, или диапазоны между следующими значениями: от приблизительно 0,001 до 0,01 нг/мл; от 0,01 до 0,1 нг/мл; от 0,1 до 1,0 нг/мл; от 1,0 до 10 нг/мл; от 10 до 100 нг/мл; или от 100 до 1000 нг/мл. В конкретном варианте осуществления целевой 25 максимальный уровень в сыворотке составляет приблизительно 6,25 нг/мл.

В варианте осуществления настоящего изобретения, направленном на пациента с сердечной недостаточностью, целевые максимальные уровни GGF2 в сыворотке составляют любые из следующих значений или приблизительно любые из следующих значений, или диапазоны между следующими значениями: от приблизительно 0,001 до 0,01 нг/мл; от 0,01 до 0,1 нг/мл; от 0,1 до 1,0 нг/мл; от 1,0 до 10 нг/мл; от 10 до 100 нг/мл или от 100 до 1000 нг/мл. В конкретном варианте осуществления целевой 30 максимальный уровень в сыворотке составляет приблизительно 6,8 мкг/мл.

В соответствии с настоящим изобретением фармацевтические композиции, 35 содержащие GGF2, могут вводиться различными путями, известными квалифицированным в данной области техники специалистам. Может использоваться любой подходящий путь введения, например, внутривенное, парентеральное, подкожное, внутримышечное, внутричерепное, внутриглазное, внутрижелудочковое, внутрисуставное, внутривозвонное, интракостеральное, внутрибрюшинное, 40 интраназальное, аэрозольное, пероральное или местное (например, путем применения пластыря, несущего состав, способный перемещаться через кожу и поступать в кровотоке) введение. Предусматривается, что пероральное введение включает включающие GGF2 пероральные лекарственные формы с замедленным высвобождением. Описываемая в настоящем документе 45 фармацевтическая композиция, включающая GGF2, может использоваться для лечения индивидуумов, страдающих неврологическими нарушениями, причем указанная фармацевтическая композиция максимизирует терапевтический эффект, при минимизации неблагоприятных побочных эффектов.

В первом варианте осуществления настоящего изобретения GGF2 вводят млекопитающему, страдающему неврологическим нарушением, связанным с демиелинизацией, причем GGF2 вводят по схеме введения доз для обеспечения и поддержания узкого целевого терапевтического окна концентраций GGF2 в плазме.

5 Как указано в настоящем документе, введение точных доз GGF2 требуется для обеспечения уровней GGF2 в плазме (сыворотке), необходимых для терапевтической эффективности в отношении индуцирования миелинизации у нуждающегося в этом субъекта. Примеры демиелинизирующих заболеваний, при которых для обеспечения терапевтической эффективности требуется введение надлежащих доз GGF2, включают
10 синдром Гийена-Барре, хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию, периферическую демиелинизацию вследствие травматического повреждения, рассеянный склероз, ретробульбарный неврит, центральную демиелинизацию вследствие травматического повреждения, поперечный миелит, прогрессирующую многоочаговую лейкоэнцефалопатию, болезнь Девика (нейромиелит
15 зрительного нерва), острый рассеянный энцефаломиелит, аденолейкодистрофию и аденолейконевропатию.

Во втором варианте осуществления настоящего изобретения GGF2 вводят млекопитающему, страдающему заболеванием сердечной мышцы, таким как застойная сердечная недостаточность, инфаркт миокарда, реперфузионное повреждение,
20 химическая, вирусная или идиопатическая кардиотоксичность, аритмии, причем GGF2 вводят по схеме введения доз для обеспечения целевого терапевтического окна концентраций GGF2 в плазме.

В третьем варианте осуществления настоящего изобретения GGF2 вводят млекопитающему, перенесшему инсульт, повреждение спинного мозга или
25 травматическое повреждение головного мозга, причем GGF2 вводят по схеме введения доз для обеспечения целевого терапевтического окна концентраций GGF2 в плазме.

Будет понятно, что для любого из детализированных в настоящем документе применений GGF2 может вводиться в любой подходящей форме, или в виде компонента фармацевтической композиции, и посредством любых способов, все из которых
30 описываются в настоящем документе и/или допускаются в данной области техники.

Соответственно, настоящее изобретение направлено на определение целевого терапевтического окна относительно терапевтически эффективного уровня GGF2 в плазме. Целевое терапевтическое окно меняется в зависимости от заболевания или нарушения, поражающего пациента, и требуемой активности, сообщаемой при
35 обеспечении надлежащего терапевтически эффективного уровня GGF2 в плазме.

В настоящий документ также включен способ отбора индивидуумов на основе демонстрации симптомов. Также включен способ отбора индивидуумов на основе реагирования на достижение терапевтически эффективного уровня GGF2 в плазме, указанного для каждого применения.

40 Помимо изложенных выше способов лечения настоящее изобретение распространяется на применение любого из соединений по настоящему изобретению для приготовления лекарственных средств или в качестве лекарственных средств, которые могут вводиться для осуществления таких лечений, а также на такие соединения для осуществления раскрытых и точно определенных лечений.

45 Настоящим изобретением также охватывается фармацевтическая композиция, содержащая GGF2 или домен EGFL и ингибитор пути с участием Mek1/Erk и ее применение для лечения пациента, страдающего заболеванием или нарушением, связанным со сниженными уровнями миелинизации.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фиг. 1А-С демонстрируется (А) GGF2-индуцированная активация Akt и MAPK в сокультурах шванновских клеток и нейронов DRG. Сокультуры шванновских клеток с нейронами DRG в условиях для миелинизации обрабатывали GGF (в концентрации 0,6 мкМ), и через 20 минут оценивали уровни активации Akt и MAPK с помощью анализа Вестерн-блоттингом. (В) Ингибирование U0126 GGF2-индуцированной активации MAPK. Сокультуры предварительно обрабатывали увеличивающимися дозами U0126 в течение 30 минут, а затем стимулировали GGF2. Контрольные культуры оставляли необработанными. Активацию MAPK оценивали через 20 минут. (С) Ингибирование U0126 (1 и 3 мкМ) GGF2-индуцированной активации MAPK отменяет ингибиторный эффект GGF2 на миелинизацию. Сокультуры обрабатывали совместно GGF2 и U0126 (1 и 3 мкМ) в условиях для миелинизации. Через десять-двенадцать дней культуры фиксировали и подвергали иммуноокрашиванию на MBP для определения уровня миелинизации.

На фиг. 2 демонстрируется, что GGF2 стимулирует миелинизацию при низких концентрациях. Сокультуры обрабатывали GGF2 в концентрациях, находящихся в диапазоне от 0,5 до 1000 пМ (от 0,0005 до 1 нМ), в условиях для миелинизации. Через десять-двенадцать дней миелинизацию оценивали с помощью иммуноокрашивания на MBP. Конкретнее, концентрациями GGF2 слева направо являются следующие концентрации: без обработки, 0,5 пМ, 1 пМ, 3 пМ, 10 пМ, 30 пМ, 300 пМ, 600 пМ и 1000 пМ, соответственно. Через десять-двенадцать дней миелинизацию оценивали с помощью иммуноокрашивания на MBP.

На фиг. 3А-Ф демонстрируется, что ингибиторный эффект GGF на миелинизацию опосредуется через активацию Mek1/Erk. (А) Сокультуры шванновских клеток и нейронов DRG обрабатывали GGF (0,01, 0,6 и 1 нМ), и через 45 минут готовили лизаты клеток, и уровни активного Erk (p-Erk) и Akt (p-Akt) определяли с помощью анализа Вестерн-блоттингом. При использовании 1 нМ (заключенные в рамку линии) GGF индуцировал активацию и Erk, и Akt. (В) Ингибирование GGF-индуцируемой активации Erk в сокультурах. Сокультуры шванновских клеток и нейронов DRG предварительно обрабатывали U0126 в течение 30 минут, а затем добавляли GGF (0,6 нМ) при постоянном присутствии U0126. Через 45 минут готовили лизаты клеток, и определяли уровень p-Erk и p-Akt. Обработка U0126 ингибировала как эндогенную, так и GGF-индуцируемую активации Erk, не оказывая влияние на активацию Akt. (С) Снимки сегментов MBP⁺ миелина, образованных в сокультурах, обработанных GGF или GGF+U0126 (1 нМ). Обработка U0126 отменяла ингибиторный эффект GGF и индуцировала миелинизацию. Контрольные культуры сохраняли без какой-либо обработки. Масштабная метка: 100 мкм. Квантификация результатов представлена в (D). (E) Ингибирование эндогенной активности Erk в сокультурах стимулирует миелинизацию. Сокультуры обрабатывали увеличивающимися концентрациями U0126 (0,5, 1 и 3 нМ) в условиях для миелинизации, и через 11 дней миелинизацию исследовали, как указано выше. Значительное увеличение миелинизации наблюдалось в культурах, обработанных U0126. Планки погрешностей означают \pm среднеквадратическая ошибка ($p < 0,001$). (F) Ингибирование GGF-индуцируемой активации Erk сопровождается снижением c-Jun и увеличением экспрессии Krox20. Сокультуры сохраняли в условиях для миелинизации в присутствии GGF или GGF+U0126 (0,5, 1 и 3 нМ) в течение 11 дней, и лизаты клеток анализировали на экспрессию MBP, c-Jun и Krox20. В качестве контроля загрузки служил уровень актина. GGF-индуцируемая экспрессия c-Jun снижалась при обработке U0126. Уровень белка Krox20, по-видимому, увеличивался в культурах, обработанных U0126.

На фиг. 4А-С демонстрируется, что GGF стимулирует миелинизацию при низкой концентрации. (А) Шванновские клетки обрабатывали различными концентрациями GGF, находящимися в диапазоне от 0,0003 до 10 нМ, и через 20 минут готовили лизаты клеток, и уровни активации Erk и Akt анализировали с помощью Вестерн-блоттинга (наверху) и денситометрического анализа (внизу). Увеличение активации Akt возникало в диапазоне более низких концентраций (в рамке) по сравнению с активацией Erk. (В) Сокультуры обрабатывали различными концентрациями GGF (0,0005, 0,001, 0,003, 0,01, 0,03, 0,3, 0,6 и 1 нМ) в течение 11 дней в условиях для миелинизации, а затем фиксировали и подвергали иммуноокрашиванию на MBP и DAPI. Снимки контроля и культур, обработанных 0,01 нМ GGF, представлены вместе с квантификацией результатов (справа). Продемонстрирован очевидный двухфазный эффект GGF: он стимулирует миелинизацию при низких концентрациях (от 0,0005 до 0,01 нМ), ингибируя процесс при более высоких концентрациях (0,3 нМ и выше). (С) Низкая концентрация GGF (0,01 нМ) значительно увеличивала миелинизацию на нейронах CRD-Nrg1^{+/-} (p=0,003). Планки погрешностей показывают ± среднеквадратическая ошибка. Данные были проанализированы с помощью однофакторного дисперсионного анализа (*: p<0,001).

На фиг. 5А-Д демонстрируются нуклеотидная и аминокислотная последовательности полноразмерного GGF2.

На фиг. 6-11 демонстрируются нуклеотидные и аминокислотные последовательности доменов, подобных эпидермальному фактору роста (EGFL), 1-6.

На фиг. 12 демонстрируется таблица, имеющая отношение к номенклатуре нейрегулинов.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Представленные в настоящем документе данные показали, что для стимуляции миелинизации периферических нервов, GGF2 должен вводиться млекопитающему, используя схему введения доз, направленную на обеспечение терапевтического окна, например, концентраций GGF2 в плазме или доз GGF2.

Определения

Используемые в настоящем документе термины имеют значения, общепризнанные и известные квалифицированным в данной области техники специалистам, однако для удобства и завершенности конкретные термины и их значения изложены ниже.

В настоящем документе «приблизительно» означает фактическое значение плюс или минус другая величина, устанавливая, тем самым, диапазон величин. В определенных предпочтительных вариантах осуществления «приблизительно» означает диапазон относительно базисной (или основной, или ссылочной) величины или величину плюс или минус вплоть до 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,75%, 0,5%, 0,25% или 0,1%.

Под «доменом, подобным эпидермальному фактору роста» или «доменом EGFL» подразумевается полипептидный мотив, кодируемый геном NRG-1, NRG-2 или NRG-3, который связывается с ErbB2, ErbB3, ErbB4 или их комбинациями и стимулирует их и имеет структурное сходство со связывающимся с рецептором для EGF доменом, описанным в Holmes et al., Science 256: 1205-1210, 1992; патенте США № 5530109, патенте США № 5716930, заявке на патент США с серийным № 08/461097; 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, и WO 97/09425). Смотрите фиг. 10-15 в отношении нуклеотидных и аминокислотных последовательностей доменов, подобных эпидермальному фактору роста (EGFL) 1-6.

Под «нейрегулином» или «NRG» подразумевается полипептид, который кодируется

геном или нуклеиновой кислотой (например, кДНК) NRG-1, NRG-2 или NRG-3 и связывается с рецепторами ErbB2, ErbB3, ErbB4 или их комбинациями и стимулирует их.

5 Под «нейрегулином-1», «NRG-1», «херегулином», «GGF2» или «лигандом p185erbB2» подразумевается полипептид, который связывается непосредственно с рецептором ErbB2 или трансстимулирует его и кодируется геном лиганда p185erbB2, описанным в патенте США № 5530109, патенте США № 5716930 и патенте США № 7037888, содержание каждого из которых включено в настоящий документ посредством ссылки. Смотрите фиг. 9A-D в отношении нуклеотидной и аминокислотной последовательностей 10 полноразмерного GGF2. Смотрите фиг. 12 в отношении таблицы, относящейся к номенклатуре нейрегулинов.

Кодируемые генами NRG-1, NRG-2 и NRG-3 полипептиды обладают доменами EGFL, которые позволяют им связываться с рецепторами ErbB и стимулировать их. Holmes и др. (Science 256: 1205-1210, 1992) установили, что домен EGFL сам по себе достаточен 15 для связывания с рецептором p185erbB2 и его активации. Соответственно, любой полипептидный продукт, кодируемый геном NRG-1, NRG-2 или NRG-3, например, полипептид, имеющий домен EGFL (например, домен EGFL, описанный в патенте США № 5530109, патенте США № 5716930, патенте США № 7037888, патенте США № 7135456 и патенте США № 7319019, или домен EGFL, описанный в WO 97/09425), кодируемый 20 геном или кДНК нейрегулина, может использоваться в способах по настоящему изобретению для обеспечения терапевтического окна, в котором достигается эффективный уровень GGF2 в плазме (сыворотке).

Также должно быть обращено внимание на то, что используемые в настоящем документе и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают 25 ссылку на множественное число за исключением случаев, когда контекст четко определяет иное.

Кроме случаев, оговоренных особо, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют значения, одинаковые с такими, в которых они обычно понимаются специалистом со средним уровнем компетентности в данной 30 области техники. Хотя любые способы и материалы, схожие с описанными в настоящем документе способами и материалами или эквивалентные им, можно использовать для осуществления на практике или проверки вариантов осуществления настоящего изобретения, теперь описываются конкретные способы, устройства и материалы.

«Местное введение» означает непосредственное введение не являющимся системным 35 путем в место болезни или нарушения или вблизи него.

Термины «пациент» и «субъект» используются в настоящем документе для ссылки на всех животных, включающих млекопитающих. Примеры пациентов или субъектов включают людей, коров, собак, кошек, коз, овец и свиней.

Используемые в настоящем документе термины «фармацевтически приемлемые 40 соли, сложные эфиры, амиды и пролекарства» относятся к таким солям карбоновых кислот (карбоксилатам), солям присоединения аминокислот, сложным эфирам, амидам и пролекарствам соединений по настоящему изобретению, которые, в рамках обоснованной оценки врача, подходят для использования в контакте с тканями пациента без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции и т.п., соответствуют 45 допустимому соотношению польза/риск и эффективны для их намеченного применения, а также цвиттерионным формам, при наличии возможности, соединений по настоящему изобретению.

Термин «пролекарство» относится к соединениям, которые быстро преобразуются

in vivo с выработкой исходных соединений вышеотмеченной формулы, например, при гидролизе в крови. Детальное обсуждение предоставлено в T. Higuchi and V. Stella, "Prodrugs as Novel Delivery Systems", Vol. 14, A.C.S. Symposium Series, и в Bioreversible Carriers in Drug Design, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987, оба из которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

Термин «соли» относится к относительно нетоксичным солям присоединения неорганических и органических кислот соединений по настоящему изобретению. Эти соли можно приготовить на месте во время конечного выделения и очистки соединений или с помощью отдельного взаимодействия очищенного соединения в его свободной основной форме с подходящей органической или неорганической кислотой и выделения таким образом образованной соли. Репрезентативные соли включают соли гидробромид, гидрохлорид, сульфат, бисульфат, нитрат, ацетат, оксалат, валерат, олеат, пальмитат, стеарат, лаурат, борат, бензоат, лактат, фосфат, тозилат, цитрат, малеат, фумарат, сукцинат, тартрат, нафтилат, мезилат, глюкогептонат, лактобионат и лаурилсульфонат и т.п. Они могут включать катионы на основе щелочных и щелочноземельных металлов, таких как натрий, литий, калий, кальций, магний и т.п., а также нетоксичный аммоний, тетраметиламмоний, тетраметиламмоний, метиламин, диметиламин, триметиламин, триэтиламин, этиламин и т.п. (смотрите, например, S.M. Barge et al., "Pharmaceutical Salts", J. Pharm. Sci., 1977, 66: 1-19, который включен в настоящий документ посредством ссылки).

«Терапевтически эффективное количество» представляет собой количество, достаточное для ослабления сопровождающих заболевание или болезненность симптомов, для нормализации функций организма при заболевании или нарушениях, которые приводят к ухудшению конкретных функций организма, или для обеспечения улучшения одного или нескольких клинически определяемых параметров заболевания, предпочтительно, ослабления симптомов, сопровождающих заболевание, связанное, например, с демиелинизирующим заболеванием, включающих скорость хождения, мышечный тонус нижних конечностей, мышечную силу нижних конечностей или мышечную спастичность. Имеющее отношение к настоящему изобретению терапевтически эффективное количество представляет собой количество, достаточное для ослабления боли или мышечной спастичности, сопровождающих подвергнутое лечению неврологическое нарушение, или количество, достаточное для приведения к улучшению половой функции, функции мочевого пузыря или кишечника у субъектов, имеющих неврологическое нарушение, которое уменьшает нервную проводимость, или которое препятствует нормальным половым функциям, функции мочевого пузыря или кишечника.

«Лечение» относится к введению лекарственного средства или выполнению медицинских процедур в отношении пациента для улучшения клинического состояния пациента, в том числе уменьшения продолжительности заболевания или тяжести заболевания, или субъективного улучшения качества жизни пациента или увеличения продолжительности жизни пациента.

В настоящем документе термин «целевое терапевтическое окно» относится к диапазону доз или диапазону концентраций в сыворотке, который обеспечивает требуемые терапевтические результаты. В отношении GGF2, в конкретном варианте осуществления, целевое терапевтическое окно относится к достаточному для индуцирования миелинизации шванновскими клетками у субъекта количеству GGF2, которое меньше количества, достаточного для ингибирования миелинизации у субъекта. При удивительном обнаружении авторы настоящего изобретения определили целевое

терапевтическое окно для GGF2 относительно его способности к стимуляции миелинизации путем определения относительных уровней активации пути с участием PI3-киназы и активации пути с участием Mek1/Erk. Конкретнее, авторы настоящего изобретения обнаружили до сего времени неосознанную положительную корреляцию между GGF2-опосредованной активацией пути с участием PI3-киназы и стимуляцией миелинизации и отрицательную корреляцию между GGF2-опосредованной активацией пути с участием Mek1/Erk и стимуляцией миелинизации. Иначе говоря, авторы настоящего изобретения обнаружили, что введение GGF2 можно точно регулировать для стимуляции миелинизации путем оценки уровней активации этих путей. Целевое терапевтическое окно для GGF2 в отношении стимуляции миелинизации у субъекта определяют как количество GGF2, которое вызывает активацию пути с участием PI3-киназы (проверяемую, например, путем выявления фосфорилированной Akt) в отсутствие выявляемой активации пути с участием Mek1/Erk (проверяемой, например, путем выявления фосфорилированной Erk). Выявление фосфорилированной Akt и фосфорилированной Erk можно выполнить, используя стандартные анализы, известные в данной области техники, включающие ELISA, Вестерн-(иммуно)блоттинг, иммуноцитохимию, *in vitro* анализ киназ, LC/MS (жидкостную хроматографию/масс-спектрометрию), MALDI-TOF MS (времяпролетную масс-спектрометрию с лазерной десорбцией/ионизацией из матрицы) и другие белковые системы, известные в данной области, такие как Lumindex.

Квалифицированному в данной области техники специалисту могло бы быть понятно, что другие внутриклеточные маркеры активации пути с участием PI3-киназы и активации пути с участием Mek1/Erk известны и используются в соответствии с настоящим изобретением. В соответствии с настоящим изобретением другие индикаторы активации пути с участием PI3-киназы и активации пути с участием Mek1/Erk могут использоваться для определения терапевтического окна, в котором GGF2 стимулирует миелинизацию.

Кроме того, соединения по настоящему изобретению могут существовать в несольватированных, а также сольватированных формах с фармацевтически приемлемыми растворителями, такими как вода, этанол и т.п. В общем, сольватированные формы считаются эквивалентными несольватированным формам для целей настоящего изобретения.

«Ингибиторы MAP-киназ»

Неограничивающий список ингибиторов MAP-киназ, которые могут использоваться в настоящем изобретении, включает арктигенин, который сильно ингибирует активность МКК1 *in vitro* со значением IC50, составляющим 1 нМ, и, таким образом, ингибирует фосфорилирование и активацию MAP-киназ ERK1/2, киназы p38 и JNK и их активности в клетках Raw264.7, обработанных LPS; PD 98059, который является сильным, избирательным и проникаемым в клетку ингибитором киназы MAP-киназы (также известной как киназа MAPK/ERK или MEK), который ингибирует фосфорилирование MAP-киназы киназой MAP-киназы, но не ингибирует саму MAP-киназу (значение IC50 для индуцируемых PD 98059 эффектов находится в диапазоне 1-20 мкМ для многих анализов); SB202190, который является в высокой степени избирательным, сильным и проникаемым в клетку ингибитором MAP-киназ p38, который связывается в пределах кармана для АТФ активной киназы с Kd 38 нМ, определенной при использовании рекомбинантной p38 человека, и избирательно ингибирует изоформы p38альфа и бета (значения IC50 составляют 50 и 100 нМ для p38альфа/SAPK2альфа и p38бета2/SAPK2бета, соответственно); SB203580, который является в высокой степени избирательным и проникаемым в клетку ингибитором митоген-стимулируемой

протеинкиназы p38 со значениями IC50, составляющими 50 и 500 нМ для p38/SAPK2 α и p38/SAPK2 β , соответственно, и также ингибирует фосфоинозитид-зависимую протеинкиназу 1 (PDK1) при больших в 10 раз концентрациях (IC50~3-5 мкМ) (проявляет большую в 100-500 раз избирательность по сравнению с Lck, GSK3 β и Akt/PKB); SL 327, который является избирательным ингибитором MEK1 и MEK2 со значениями IC50, составляющими 180 и 220 нМ, соответственно. Он блокирует LTP гиппокампа *in vitro* и проникает в головной мозг *in vivo*, подавляя выработку страха и обучение у крыс, и вызывая нейропротекцию у мышей, после системного введения; SP600125, который является избирательным ингибитором N-концевой киназы c-Jun (JNK). Он конкурентно и обратимо ингибирует JNK1, 2 и 3 (IC50=40-90 нМ) и, как установлено, обладает меньшей ингибиторной активностью в отношении ERK2, p38 β и ряда других киназ, и, как известно, является активным *in vivo*; и U0126, который является избирательным ингибитором киназ митоген-стимулируемых протеинкиназ, MEK1 и MEK-2, с большей в 100 раз эффективностью, чем PD 98059, и является слабым ингибитором PCK, Raf, ERK, JNK, MEKK, MKK-3, MKK-4/SEK, MKK-6, Abl, Cdk2 и Cdk4, и ингибирует трансактивацию AP-1 в клеточных анализах по гену-репортеру.

Другие ингибиторы, которые в настоящее время подвергаются испытанию фазы FDA (Управления по контролю за продуктами и медикаментами), включают ингибиторы фарнезилтрансферазы (FTI). Например, Zarnesta® (R115777, типифарниб) является FTI, разработка которого продолжается далее. В испытании фазы II пациентов с ранее поддаваемым лечению метастатическим раком молочной железы были проверены две различные схемы введения доз: непрерывная и с интервалами. Степени целевого ответа в 2 группах составляли 10% и 14%, с дополнительными 15% и 9% тех, кто имел стабильное заболевание в течение по меньшей мере 6 месяцев. Основными наблюдаемыми побочными эффектами были подавление костного мозга и невропатия, оба из которых были меньшими в группе введения доз с интервалами, чем в группе непрерывного введения. Несколько исследований фазы I зарнестры и других FTI в комбинации с цитотоксической химиотерапией были проведены, и была установлена безопасность этих схем комбинированного введения. В процессе реализации находятся испытания фазы II на раке молочной железы, включающие испытание с использованием зарнестры в комбинации с ингибитором ароматазы. Разрешение FDA на применение зарнестры при остром миелоидном лейкозе (AML) зависит от данных фазы III, поскольку рабочая группа FDA проголосовала против ускоренного разрешения зарнестры на основе данных от испытания фазы II с использованием одной группы.

Что касается Zarnesta®, для клинических испытаний фазы I Zarnesta® вводят в количестве 400 мг, вводимых перорально дважды в день в течение двух недель; для клинических испытаний фазы II Zarnesta® вводят в количестве 300 мг, вводимых перорально дважды в день в течение первых 21 дней каждого 28-дневного цикла; для клинических испытаний фазы III Zarnesta® вводят в количестве 600 мг, вводимых перорально дважды в день в течение первых 21 дней каждого 28-дневного цикла.

Ингибиторы Raf включают другие типы ингибиторов, которые в настоящее время подвергаются испытанию фазы FDA. Сорафениб (BAY 43-9006), например, является первым соединением для того, чтобы сделать мишенью не только путь передачи сигнала с участием Raf/MEK/Erk, но также пути с участием VEGFR и PDGFR. В марте 2004 года сорафенибу был присвоен FDA статус ускоренного продвижения для метастатического почечноклеточного рака. В апреле 2005 года сорафениб был включен в программу предварительных исследований, которая предназначена для терапий, которым был присвоен FDA статус ускоренного продвижения, и которые имеют потенциал для

обеспечения значительной пользы по сравнению с существующей стандартной терапией. В процессе реализации находится также несколько больших, международных клинических испытаний фазы III с использованием множества учреждений на пациентах с первичными раками почки и печени запущенной стадии, а также метастатической меланомой.

Что касается сорафениба, в клинических испытаниях фазы I были проверены два уровня доз: уровень дозы 1: 200 мг сорафениба, принимаемых внутрь дважды в день в течение 3-недельного цикла, или уровень дозы 2: 400 мг сорафениба, принимаемых внутрь дважды в день в течение 3-недельного цикла.

Недавно представлены результаты планового промежуточного анализа проводимого испытания фазы III на пациентах с раком почки запущенной стадии (Escudier et al. J. Natl. Cancer Inst. 2008 100: 1454-1463, содержание которого в целом включено в настоящий документ). Среди 769 исследованных пациентов выживание без прогрессирования (PFS) было удвоено до средней величины, составляющей 24 недели, при использовании сорафениба, по сравнению с 12 неделями при использовании плацебо. Польза от сорафениба наблюдалась во всех подгруппах пациентов, независимо от возраста, продолжительности заболевания или предшествующих терапий. Контролирование заболевания было обеспечено у 80% пациентов, получавших сорафениб: 78% имели стабильное заболевание (по сравнению с 55% в группе плацебо), и 2% отвечали частично (по сравнению ни с одним в группе плацебо). Уровень пациентов без прогрессирования в течение 12 недель составлял 79% для сорафениба в сравнении с 50% для плацебо. Кроме того, сорафениб очень хорошо переносился 768 пациентами, и самыми часто встречаемыми побочными эффектами были гипертония, усталость, диарея и сыпь, в том числе сыпь на кисте и стопе (синдром «кисть-стопа»).

В испытании эффективности фазы II сорафениб исследуется в виде единственного средства на раках легкого, молочного желез и других раках запущенной стадии. В клинических испытаниях фазы I/II сорафениб исследуется в комбинации с рядом стандартных химиотерапий и других противораковых средств.

ISIS 5132 является другим ингибитором Raf, который продемонстрировал приемлемую токсичность в исследованиях фазы I. В процессе реализации находятся исследования фазы II на ряде типов рака.

Другие ингибиторы, которые в настоящее время подвергаются испытанию фазы FDA, включают ингибиторы MEK. CI-1040, например, является пероральным, избирательным ингибитором в виде небольшой молекулы MEK 1-2. С помощью исследований на животных и культурах продемонстрирована активность этого средства в линиях клеток рака молочной железы. В исследованиях фазы I обнаружены умеренные побочные эффекты на желудочно-кишечный тракт и кожу. К сожалению, в исследовании фазы II на 67 пациентах с 4 различными типами опухолей (раком ободочной и прямой кишок, NSCLC, молочной железы и поджелудочной железы запущенной стадии) ответов не выявлено, хотя лечение CI-1040 хорошо переносилось.

PD 0325901, ингибитор MEK второго поколения, недавно вступил в фазу клинической разработки и, по-видимому, обладает заметно лучшими фармакологическими свойствами, чем CI-1040, который, как надеются исследователи, можно перевести в лучшую противораковую эффективность. Для него установлен некоторый частичный ответ у пациентов с меланомой.

Что касается PD 0325901, в клинических испытаниях фазы I и фазы II было проверено множество уровней доз. Введение осуществлялось перорально или один, или два раза в день; были оценены несколько схем введения доз; текущей схемой введения доз

является 5 дней на лекарственном средстве, 2 дня без лекарственного средства в течение 3 недель в 28-дневном цикле. Оцениваемые дозы находились в диапазоне от 1 мг раз в день до 30 мг два раза в день. Клинические испытания были преждевременно прекращены по соображениям безопасности, в частности, из-за относящейся к глазам и неврологической токсичности, представленной при дозах, составляющих 10 мг дважды в день и больше.

Должно быть понятно, что это изобретение не ограничивается конкретными описанными молекулами, композициями, методологиями или протоколами, поскольку они могут варьироваться. Также должно быть понятно, что использованная при описании терминология предназначена только для цели описания конкретных вариантов осуществления и, как предполагается, не ограничивает объем настоящего изобретения, который ограничивается только прилагаемой формулой изобретения.

Введение. Нейрегулины и содержащие домены EGFL полипептиды, кодируемые генами нейрегулинов, могут вводиться пациентам или экспериментальным животным с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем или наполнителем, в форме стандартных доз. Может использоваться обычная фармацевтическая практика для обеспечения подходящих составов или композиций для введения пациентам или экспериментальным животным. Может использоваться любой подходящий путь введения, например, внутривенное, парентеральное, подкожное, внутримышечное, внутричерепное, внутриглазное, глазное, внутрижелудочковое, внутрисуставное, внутривозвонное, интракостеральное, интратрахеальное, интраназальное, аэрозольное, пероральное или местное (например, путем применения пластыря, несущего состав, способный перемещаться через кожу и поступать в кровоток) введение. Терапевтические составы могут быть в форме жидких растворов или суспензий; для перорального введения составы могут быть в форме таблеток или капсул, а для интраназального введения - в форме порошков, капель в нос или аэрозолей. Любой из указанных выше составов может быть составом с замедленным высвобождением.

Широко известные в данной области техники способы изготовления составов представлены, например, в "Remington's Pharmaceutical Sciences", который включен в настоящий документ в целом. Составы для парентерального введения могут, например, содержать наполнители, стерильную воду или солевой раствор, полиалкиленгликоли, такие как полиэтиленгликоль, масла растительного происхождения или гидрогенизованные нафталины. Для контролирования высвобождения соединений могут использоваться биосовместимые, биоразрушаемые лактидный полимер, сополимер лактида и гликолида или сополимеры полиоксиэтилена и полиоксипропилена с замедленным высвобождением. Другие применимые системы парентеральной доставки для введения молекул по настоящему изобретению включают частицы сополимера этилена и винилацета, осмотические насосы, имплантируемые инфузионные системы и липосомы. Составы для ингаляции могут содержать наполнители, например, лактозу, или могут быть водными растворами, содержащими, например, полиоксиэтилен-9-лауриловый эфир, гликохолат и дезоксихолат, или могут быть масляными растворами для введения в форме капель в нос или в виде геля.

Таким образом, и как указано ранее, настоящее изобретение включает в свой объем и распространяется на изложенные способы лечения и на применение таких соединений для приготовления лекарственных средств, применимых для таких способов.

Демиелинизирующие заболевания. Миелиновые оболочки покрывают множество нервных волокон в центральной и периферической нервной системе. Наличие

неповрежденных миелиновых оболочек ускоряет передачу нервных импульсов по аксонам. Нарушения, затрагивающие миелин, прерывают передачу нервных импульсов, и симптомы заболевания могут быть отражением недостатков в любой части нервной системы.

5 Миелин, образуемый олигодендроглией в центральной нервной системе (ЦНС), отличается химически и иммунологически от миелина, образуемого шванновскими клетками на периферии. Поэтому некоторые нарушения миелина (например, синдром Гийена-Барре, хроническая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия и другие полинейропатии периферических нервов) имеют обыкновение затрагивать,
10 главным образом, периферические нервы, в то время как другие нарушения миелина затрагивают, главным образом, ЦНС. Самыми часто поражаемыми областями в ЦНС являются головной мозг, спинной мозг и зрительные нервы.

Демиелинизация часто является вторичным нарушением на основе инфекционного, ишемического, метаболического или наследственного заболевания. При первичных
15 демиелинизирующих заболеваниях, хотя причина или причины неизвестны, предполагается аутоиммунный механизм, поскольку заболевание иногда следует за вирусной инфекцией или противовирусной вакцинацией.

Демиелинизация имеет обыкновение быть сегментарной или очаговой, поражая множество областей одновременно или последовательно. Однако может происходить
20 ремиелинизация с восстановлением, регенерацией и полным возвращением к норме нервной функции. Однако за большой утратой миелина обычно следует дегенерация аксонов и часто дегенерация клеточного тела.

Рассеянный склероз (MS) характеризуется рассеянными очагами демиелинизации в головном мозге и спинном мозге. Обычные симптомы включают зрительные и
25 глазодвигательные нарушения, парестезии, слабость, мышечную спастичность, дисфункцию мочевой системы и легкое нарушение когнитивных функций. Обычно неврологические расстройства являются многократными, с ремиссиями и обострениями болезни, постепенно вызывающими недееспособность. Диагностика основана на истории ремиссий и обострений болезни плюс клинические признаки, результаты тестов,
30 повреждения, видимые при магнитно-резонансном исследовании (MRI), и другие критерии (в зависимости от симптомов), объективно демонстрирующие ≥ 2 отдельных неврологических нарушений. Обычно лечение включает кортикостероиды при острых обострениях болезни, иммуномодулирующие лекарственные средства для предотвращения обострений и поддерживающие меры.

35 При MS возникают локализованные области демиелинизации (бляшки), с разрушением олигодендроглии, околососудистым воспалением и химическими изменениями в липидных и белковых составляющих миелина в бляшках и вокруг них. Возможно повреждение аксонов, но клеточные тела и аксоны имеют обыкновение относительно хорошо сохраняться. Фиброзный глиоз развивается в бляшках, которые рассеяны по
40 всей ЦНС, в основном в белом веществе, в частности, в боковых и задних столбах (особенно в цервикальных областях), зрительных нервах и перивентрикулярных областях. Также поражаются нервные пути среднего мозга, варолиева моста и мозжечка. Серое вещество в мозжечке и спинном мозге также поражается, но в гораздо меньшей степени.

45 **Болезнь сердца**

Болезнь сердца является общим термином для ряда различных заболеваний, поражающих сердце. Она является ведущей причиной смерти во многих промышленно развитых странах, в том числе Соединенных Штатах. В качестве вступления

представлены следующие широкие классы болезни сердца. Экзогенные кардиомиопатии являются кардиомиопатиями, первичная патология которых лежит вне миокарда. Большая часть кардиомиопатий является экзогенной, поскольку самой часто встречаемой причиной кардиомиопатии является ишемия. Эндогенные кардиомиопатии
5 проистекают из-за слабости сердечной мышцы, которая не обусловлена идентифицируемой внешней причиной. С другой стороны, сердечно-сосудистое заболевание относится к любому ряду конкретных заболеваний, поражающих само сердце и/или систему кровеносных сосудов, особенно вен и артерий, ведущих к сердцу и отходящих от него. Исследование диморфизма заболевания наводит на мысль, что
10 женщины, страдающие сердечно-сосудистым заболеванием, обычно страдают формами, которые поражают кровеносные сосуды, в то время как мужчины обычно страдают формами, которые поражают саму сердечную мышцу. Известные или связанные причины сердечно-сосудистого заболевания включают сахарный диабет, гипертонию, гипергомоцистеинемию и гиперхолестеринемию. Ишемическая болезнь сердца является
15 еще одним классом заболевания самого сердца, характеризующегося снижением кровоснабжения органа.

Гипертоническая болезнь сердца является термином, используемым для ссылки на болезнь сердца, вызванную высоким кровяным давлением, особенно локализованным высоким кровяным давлением. В воспалительное заболевание сердца вовлечено
20 воспаление сердечной мышцы и/или окружающей ее ткани. Порок клапана сердца представляет собой любой патологический процесс, в который вовлечен один или несколько клапанов сердца. Клапанами в правой части сердца являются правый предсердно-желудочковый клапан и легочный клапан, а клапанами в левой части сердца являются митральный клапан и клапан аорты.

Застойная сердечная недостаточность, одна из ведущих причин смерти в
25 промышленно развитых странах, является следствием увеличенной нагрузки на сердце и нарастающего уменьшения прокачиваемости через него. Она может быть следствием любого структурного или функционального сердечного нарушения, которое уменьшает способность сердца к заполнению или прокачке достаточного количества крови через
30 тело. Сначала увеличенная нагрузка, которая является следствием высокого кровяного давления или утраты сократительной ткани, вызывает компенсаторную гипертрофию кардиомиоцитов и утолщение стенки левого желудочка, посредством чего увеличивается сократительная способность и сохраняется функционирование сердца. С течением
35 времени, однако, полость левого желудочка расширяется, систолическая прокачиваемость ухудшается, кардиомиоциты подвергаются гибели клеток в виде апоптоза, и функция миокарда ухудшается по нарастающей.

Факторы, лежащие в основе застойной сердечной недостаточности, включают высокое кровяное давление, ишемическую болезнь сердца, подвергание воздействию кардиотоксических соединений, таких как антрациклиновые антибиотики, и генетические
40 дефекты, о которых известно, что они увеличивают риск сердечной недостаточности.

Под «застойной сердечной недостаточностью» подразумевается нарушенная функция сердца, которая создает неспособность сердца к сохранению нормального выброса крови в покое или при нагрузке или к сохранению нормального сердечного выброса при установке давления при нормальном сердечном заполнении. Фракция изгнания
45 левого желудочка, составляющая приблизительно 40% или меньше, является показателем застойной сердечной недостаточности (в качестве сравнения, фракция изгнания, составляющая приблизительно 60%, является нормой). Пациенты с застойной сердечной недостаточностью демонстрируют хорошо известные клинические симптомы и признаки,

такие как тахипноэ, плевральный выпот, усталость в покое или при нагрузке, сократительную дисфункцию и отек. Застойная сердечная недостаточность без труда диагностируется с помощью широко известных способов (смотрите, например, “Consensus recommendations for the management of chronic heart failure” Am. J. Cardiol., 83 (2A): 1A-38-A, 1999).

Относительную тяжесть и прогрессирование заболевания определяют, используя широко известные способы, такие как физическое обследование, эхокардиография, радионуклидная визуализация, инвазивное гемодинамическое мониторирование, магнитно-резонансная ангиография и тестирование с нагрузкой на бегущей дорожке в сочетании с исследованиями утилизации кислорода.

Под «ишемической болезнью сердца» подразумевается любое нарушение, являющееся следствием несоответствия между потребностью миокарда в кислороде и адекватностью снабжения кислородом. Большинство случаев ишемической болезни сердца являются следствием сужения коронарных артерий, которое возникает при атеросклерозе или других сосудистых заболеваниях.

Под «инфарктом миокарда» подразумевается процесс, при котором ишемическая болезнь приводит к тому, что область миокарда замещается рубцовой тканью.

Под «кардиотоксическим» подразумевается соединение, которое уменьшает функционирование сердца путем непосредственного или опосредованного ослабления или уничтожения кардиомиоцитов.

Под «гипертонией» подразумевается кровяное давление, которое, как считают специалисты-медики (например, врач или специалист со средним медицинским образованием), выше нормального и несет повышенный риск развития застойной сердечной недостаточности.

Под «лечением» подразумевается, что введение нейрегулина или подобного нейрегулина полипептида замедляет или подавляет прогрессирование застойной сердечной недостаточности во время лечения, относительно прогрессирования заболевания, которое происходило бы в отсутствие лечения, статистически значимым образом. Для оценки прогрессирования заболевания могут использоваться хорошо известные признаки, такие как фракция изгнания из левого желудка, физическая работоспособность и другие клинические тесты, а также уровни выживания и уровни госпитализации. То, замедляет ли или подавляет ли лечение прогрессирование заболевания статистически значимым образом, можно определить с помощью способов, которые широко известны в данной области техники (смотрите, например, SOLVD Investigators, N. Engl. J. Med. 327: 685-691, 1992, и Cohn et al., N. Engl. J. Med. 339: 1810-1816, 1998).

Под «уменьшением прогрессирования истончения миокарда» подразумевается сохранение гипертрофии желудочковых кардиомиоцитов, так что толщина стенки желудочка сохраняется или увеличивается.

Под «ингибирует миокардиальный апоптоз» подразумевается, что лечение нейрегулином ингибирует гибель кардиомиоцитов на по меньшей мере 10%, более предпочтительно на по меньшей мере 15%, все еще более предпочтительно на по меньшей мере 25%, даже предпочтительнее на по меньшей мере 50%, еще предпочтительнее на по меньшей мере 75% и наиболее предпочтительно на по меньшей мере 90% по сравнению с не подвергнутыми лечению кардиомиоцитами.

Инсульт

Инсульт или острое нарушение мозгового кровообращения (CVA) является термином, используемым для ссылки на быстро развивающуюся утрату функций головного мозга

вследствие патологического отклонения в кровеносных сосудах, поставляющих кровь в головной мозг. Инсульт возникает, когда кровоснабжение части головного мозга внезапно прерывается, или когда кровеносный сосуд в головном мозге разрывается, разливая кровь в пространства, окружающие клетки головного мозга. Клетки головного мозга погибают, когда они больше не получают кислород и питательные вещества из крови, или существует внезапное кровоизлияние в головной мозг или вокруг него. Симптомы инсульта включают внезапное онемение или слабость, особенно в одной стороне тела, внезапную спутанность сознания или затруднение говорить и понимать речь, внезапное затруднение видеть одним или обоими глазами, внезапное затруднение ходить, головокружение или утрату равновесия или координации, или внезапную сильную головную боль без известной причины. Существует две формы инсульта: ишемический, который обусловлен закупоркой снабжающего головной мозг кровеносного сосуда (например, вызванной тромбозом или эмболией); и геморрагический, который является следствием кровоизлияния в головной мозг или вокруг него.

Показатель для терапевтического окна

Для каждого описываемого в настоящем документе применения для заболевания определяется целевое терапевтическое окно для уровней GGF2 в плазме (сыворотке). В соответствии с представленными в настоящем документе экспериментальными результатами, когда GGF2 вводят млекопитающему, страдающему неврологическим нарушением, связанным с демиелинизацией, GGF2 должен вводиться по схеме введения доз для обеспечения и поддержания узкого целевого терапевтического окна концентраций GGF2 в плазме. Как указано в настоящем документе, введение точных доз GGF2 требуется для обеспечения уровней GGF2 в плазме (сыворотке), необходимых для терапевтической эффективности в отношении индуцирования миелинизации у нуждающегося в этом индивидуума.

В варианте осуществления настоящего изобретения, направленном на нуждающегося в ремиелинизации пациента, целевой уровень GGF2 в сыворотке (плазме) составляет приблизительно 0,01 нМ.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения, направленном на нуждающегося в ремиелинизации пациента, GGF2 вводят в количестве, составляющем приблизительно 500 нг/кг веса тела пациента.

Композиции по настоящему изобретению могут использоваться для лечения заболевания пациента, которое включает определение терапевтически эффективной концентрации GGF2 у нуждающегося в этом пациента. Композиции могут использоваться для увеличения уровня и/или поддержания терапевтически эффективной концентрации GGF2 у пациента. При желании, композиции по настоящему изобретению могут быть составлены так, чтобы избегать больших пиков при начальном высвобождении GGF2. Для композиций по настоящему изобретению после введения нуждающемуся в этом пациенту предусматривается лечение вышеуказанных заболеваний. Предпочтительно, композиции вводят с тем, чтобы обеспечить терапевтически эффективный уровень GGF2 в плазме крови, который сохраняется у пациента в течение периода времени, составляющего по меньшей мере 6 часов, предпочтительно по меньшей мере 8 часов и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 10-12.

ПРИМЕРЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Антитела

Для иммунофлуоресцентного анализа использовали моноклональное антитело

(SM194) против основного белка миелина (MBP) (моноклональные антитела Sternberger) в разведении 1:500. Для анализа Вестерн-блоттингом все поликлональные антитела против активного erbB2 (p-Neu/Tyr 1248), erbB2 и erbB3 получали от Santa Cruz и использовали в разведении 1:1000. Моноклональное антитело против фосфорилированной Akt и поликлональное антитело против фосфорилированной MAPK покупали у Cell Signaling и использовали в разведениях 1:1000 и 1:500, соответственно. Поликлональные антитела против Akt и MAPK (Promega) использовали в разведениях 1:1000 и 1:5000, соответственно.

Нейрегулин-1 типа II и типа III

Рекомбинантный фактор II роста глии человека (rhGGF-II, Nrg1 типа II) получали от Acorda Therapeutics, Inc. Рекомбинантный человеческий, происходящий из сенсорных и двигательных нейронов фактор (rhSMDF, Nrg1 типа III) покупали у R&D Systems. В настоящем исследовании rhGGF-II и rhSMDF упоминают просто как GGF (или GGF2) и SMDF, соответственно. GGF представлял собой N-конец из 419 аминокислотных остатков, содержащий EGF-домен и Ig-подобный домен. Соответственно, GGF представляет собой растворимый белок, в котором отсутствует трансмембранный и цитоплазматический домены.

Культура крысиных зародышевых шванновских клеток

Шванновские клетки получали из седалищных нервов новорожденных крыс (возрастом 1-2 дня), как описано ранее (Brockes et al., Brain Res, 1979; 165: 105-118). Для обычного культивирования шванновские клетки выращивали в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM) с 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), дополненной нейрегулином-1 с EGF-доменом (R&D Systems) (10 нг/мл) и форсколином (2 мкМ). Во всех экспериментах, описанных в этом тексте, использовали клетки между пассажами 2-4.

Сокультивирование нейронов ганглиев заднего корешка (DRG) и шванновских клеток

Рассеянные DRG получали из эмбрионов крыс на 14,5 день эмбрионального развития, как описано ранее (Eldridge et al., J. Cell Biol. 1987; 105(2): 1023-1034), и высевали на покрытые коллагеном (коллагеном из хвоста крысы типа 1) 12-мм покровные стекла с плотностью, составляющей 1,25 DRG/покровное стекло. Через пять-шесть часов культуры заливали нейробазальной средой (Cellgro), дополненной B27 (GIBCO), 20% глюкозы, NGF (50 нг/мл) и 5-фтордезоксисуридином (FUdR, 10 мкМ), и сохраняли в среде в течение дополнительных 2-3 дней для исключения пролиферирующих не являющихся нейронами клеток. Культуры затем переводили в новую среду без FUdR и сохраняли до тех пор, пока аксоны DRG не достигали края покровных стекол. После создания аксонных сетей, шванновские клетки высевали на нейроны с плотностью, составляющей 100000 клеток/покровное стекло. Через четыре-пять дней культуры переводили на среду для миелинизации: минимальную поддерживающую среду (MEM), дополненную 10% инактивированной нагреванием FBS, 20% глюкозы, NGF (50 нг/мл) и аскорбиновой кислотой (50 мкг/мл). Через десять-одиннадцать дней оценивали миелинизацию путем иммуноокрашивания на MBP.

Сокультивирование нейронов шейных верхних ганглиев (SCG) и шванновских клеток

Рассеянные SCG получали из крыс на 1-2 день после рождения, как описано ранее, и высевали на покрытые коллагеном 12-мм покровные стекла с плотностью, составляющей 0,8 SCG/покровное стекло. На следующий день культуры заливали нейробазальной средой, дополненной B27 (GIBCO), 20% глюкозы, NGF (50 нг/мл) и 5-фтордезоксисуридином (FUdR, 10 мкМ), и сохраняли в среде в течение дополнительных

2-3 дней для исключения пролиферирующих не являющихся нейронами клеток. Культуры затем переводили обратно на новую среду без FUDR и сохраняли до тех пор, пока аксоны не удлинились до края покровных стекол. Шванновские клетки высевали на нейроны и сохраняли в нейробазальной среде с добавками до тех пор, пока шванновские клетки не заселяли аксоны (приблизительно 7-10 дней). Миелинизацию инициировали путем помещения культур в среду для миелинизации, описанную для сокультивирования DRG и шванновских клеток. Через сорок дней оценивали миелинизацию путем иммуноокрашивания на MBP.

Анализ с использованием иммунопреципитации и Вестерн-блоттинга

Для приготовления лизатов клетки крысиные шванновские клетки с 90-95% конфлюэнтности на 60-мм чашках или сокультуры дважды промывали в забуференном фосфатом солевом растворе (PBS) и затем подвергали лизису в 300 мкл охлажденного на льду буфера для лизиса (50 mM Трис-HCl, pH 7,4, 1% NP-40, 0,25% натрия дезоксихолата, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 10 мкг/мл лейпептина, 2 мкг/мл апротинина, 1 mM PMSF и 0,5 mM натрия ортованадат). Лизаты осветляли центрифугированием в течение 15 мин при 14000 об/мин на холоде, и концентрацию белков в супернатантах определяли в соответствии со спецификациями производителя (Bio-Rad: Hercules, CA). Для анализа Вестерн-блоттингом 50-70 мкг лизатов шванновских клеток разделяли по размеру на 10% полиакриламидных гелях с SDS и переносили на мембраны PVDF.

После блокирования в 5% молоке мембраны инкубировали с соответствующими первичными антителами, приготовленными в растворе для блокирования. После инкубации с конъюгированными с пероксидазой хрена вторичными антителами белковые полосы визуализировали с помощью усиленной хемилюминесценции. Для иммунопреципитации 500 мкг лизатов шванновских клеток инкубировали с 0,6 мкг первичного антитела в течение 3 часов при 4°C, затем инкубировали с 50 мкл гранул Сефарозы А в течение 1 часа. Гранулы промывали 5 раз в буфере для лизиса, и связанные с гранулами белки разделяли по размеру на полиакриламидных гелях с SDS и подвергали анализу с помощью Вестерн-блоттинга.

Иммунофлуоресцентное окрашивание на MBP

Культуры DRG-шванновские клетки или SCG-шванновские клетки промывали в забуференном фосфатом солевом растворе (PBS), а затем фиксировали в 4% параформальдегиде в течение 20 минут. После промывки PBS, образцы подвергали пермеабиллизации в охлажденном на льду метаноле в течение 25 минут, а затем инкубировали в растворе для блокирования (5% нормальная козья сыворотка+0,3% Triton X) в течение 1 часа при комнатной температуре. За этим следовала инкубация с первичным антителом, приготовленным в растворе для блокирования, в течение ночи. После промывки PBS, образцы инкубировали с конъюгированным с Alexa-488 козьим антимышинным вторичным антителом в течение 45 минут. Ядра клеток визуализировали с помощью окрашивания DAPI.

КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Статистический анализ

Однофакторный дисперсионный анализ выполняли, используя программное обеспечение для программирования SAS с 95% уровнем значимости.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ингибиторное действие GGF2 на миелинизацию опосредуется через активацию MAPK. В более раннем исследовании было установлено, что Nrg1 типа II (GGF2) после добавления к сокультурам шванновских клеток и нейронов ингибирует миелинизацию. Также сообщалось, что активация пути с участием Ras/Raf/MAPK ингибирует экспрессию

связанного с миелином гена в шванновских клетках, в то время как активация пути с участием PI3-киназы стимулирует миелинизацию, приводя к идее, что состояние шванновских клеток для миелинизации определяется балансом между путем с участием PI3-киназы и путем с участием Ras/Raf/MAPK (Ogata et al. J. Neurosci. 2004; 24: 6724-6732).

5 Авторы настоящего изобретения предсказывали, что, если сам GGF2 действует через активацию MAPK для ингибирования миелинизации, ингибирование GGF2-индуцируемой активации MAPK могло бы отменить ингибиторный эффект на миелинизацию. Для оценки возможности того, что ингибиторный эффект GGF2 на миелинизацию мог бы
10 быть обусловлен его способностью к вызову сильной активации MAPK в шванновских клетках, авторы настоящего изобретения использовали хорошо известную *in vitro* культуральную систему для миелинизации, в которой шванновские клетки сокультивируют с нейронами ганглиев заднего корешка (DRG) и индуцируют для миелинизации связанных с ними аксонов путем добавления аскорбиновой кислоты в культуральную среду. Сначала, для определения эффекта GGF2 на активацию MAPK
15 в сокультурах зародышевые шванновские клетки засеивали на нейроны DRG и позволяли им заселять аксоны. Как только культуры прекращали пролиферировать, сокультуры стимулировали с помощью GGF2 в концентрации 0,6 нМ. Через двадцать минут готовили лизаты клеток, и активацию MAPK определяли анализом с использованием Вестерн-блоттинга. В контрольных сокультурах был низкий уровень активной MAPK. Как
20 продемонстрировано на фиг. 1, обработка GGF2 далее увеличивала уровень активации MAPK. Для определения того, могла ли GGF2-индуцированная активация MAPK быть блокирована обработкой U0126, фармакологическим ингибитором киназы MAPK, сокультуры предварительно обрабатывали увеличивающимися концентрациями (0,5, 1, 3 и 10 мкМ) U0126 в течение 30 минут перед стимуляцией GGF2, и эти концентрации
25 сохраняли в культуральной среде. Контрольные культуры обрабатывали ингибитором в отсутствие обработки GGF2. Как в контрольной, так и в экспериментальных культурах U0126-опосредованное ингибирование MAPK зависело от концентрации, на что указывает нарастающее снижение уровней фосфорилированной MAPK. В культурах, обработанных GGF2 и U0126 в концентрации 1 мкМ, уровень активации уменьшен до
30 базального уровня, в то время как при использовании 10 мкМ U0126 активация MAPK в сокультуре была полностью отменена. U0126 не оказывал эффект на GGF2-индуцируемую активацию PI3-киназы.

Для оценки эффекта ингибирования MAPK на миелинизацию сокультуры обрабатывали GGF2 в присутствии U0126 или в его отсутствие в момент инициации
35 миелинизации, и сохраняли такие же условия в описанных условиях для миелинизации. Контрольные культуры оставляли необработанными в описанных условиях для миелинизации. Через десять-одиннадцать дней культуры фиксировали и подвергали иммуноокрашиванию на основной белок миелина (МВР) для визуализации сегментов миелина. В обработанных GGF2 культурах наблюдалось заметное уменьшение числа
40 сегментов миелина, как продемонстрировано ранее, выявляя ингибиторный эффект GGF2 на миелинизацию. Однако в культурах, совместно обработанных U0126, наблюдалось зависимое от дозы увеличение миелинизации, что означает, что блокирование активации MAPK отменяет ингибиторный эффект GGF2.

GGF2 стимулирует миелинизацию при низких концентрациях. Хотя уровень активации
45 MAPK неуклонно увеличивался в шванновских клетках, обработанных увеличивающимися концентрациями GGF2, авторы настоящего изобретения наблюдали, что при концентрациях ниже 0,01 мкМ, хотя уровень активации Akt увеличивался значительно выше базального уровня, не было выявляемого уровня активации MAPK.

Если состояние шванновских клеток для миелинизации определяется балансом между активацией Akt и активацией MAPK, авторы настоящего изобретения попытались определить то, коррелирует ли увеличение активации Akt в отсутствие активности MAPK при этих концентрациях с положительным эффектом на миелинизацию. Для исследования этой возможности сокультуры обрабатывали GGF2 при концентрациях, находящихся в диапазоне от 0,0005 до 0,03 нМ, в момент инициации миелинизации. Позже культуры фиксировали и подвергали иммуноокрашиванию на MBR. Как и предсказывалось на основе рассматриваемых в настоящем документе данных, существовало увеличение уровня миелинизации в культурах, обработанных низкими дозами GGF2, находящимися в диапазоне от 0,0005 до 0,01 нМ, по сравнению с необработанными контрольными культурами. После квантификации результаты продемонстрировали, что существовало зависимое от дозы увеличение числа сегментов миелина (фиг.2): 1,9-, 2,7- и 3,5-кратное увеличение миелинизации относительно контрольного уровня при концентрации GGF2, составляющей 0,0005, 0,001 и 0,01 нМ, соответственно. При использовании 0,03 нМ наблюдалось резкое уменьшение уровня миелинизации до уровня, близкого к уровню контрольных культур, или слегка ниже этого уровня. Последующее увеличение количества GGF2 приводило к дальнейшему снижению миелинизации. Чувствительная к GGF2 миелинизация была полностью ингибирована при использовании 0,6 нМ GGF2. Эта концентрация соответствовала появлению активной MAPK в сокультурах, как продемонстрировано на фиг. 1. Эти результаты наводят на мысль, что GGF2 играет двойственную роль во время миелинизации: одну, которая стимулирует миелинизацию, и другую, которая ингибирует миелинизацию, и два противоположных действия определяются дозой GGF2, представляемой шванновским клеткам.

Противоположные действия GGF2 опосредуются через активацию Mek/Erk. Для дальнейшего изучения противоположных действий GGF2 были проведены дополнительные эксперименты. Предшествующие исследования заключали в себе намек на то, что Ras/Raf/Erk и PI3-киназа являются, соответственно, отрицательным и положительным регуляторами миелинизации, наводя на мысль, что баланс между ними коррелирует с состоянием шванновских клеток для миелинизации. Для дальнейшего определения состояний активации путей, индуцируемых GGF2, сокультуры обрабатывали растворимым белком GGF2 в концентрации 1 нМ. Авторы настоящего изобретения определили, что в этой концентрации GGF2 эффективно ингибировал миелинизацию. Лизаты клеток готовили через 30 минут после обработки GGF2, и присутствие фосфорилированных белков определяли с помощью анализа Вестерн-блоттингом (фиг. 3А). При использовании 1 нМ (фиг. 3А, заключенные в рамку линии) GGF2 увеличивал активацию Akt выше базального уровня. Увеличение активации Erk также наблюдалось в обработанных GGF2 культурах при этой концентрации. Было установлено, что настолько низкие как 0,6 нМ концентрации GGF2 достаточны для активации Erk в обработанных GGF2 культурах.

Для подтверждения вышеприведенных результатов и дальнейшего изучения коррелятивной связи между активацией Erk и ингибиторным эффектом GGF на миелинизацию были проведены дополнительные эксперименты. В результате, сокультуры обрабатывали GGF2 вместе с увеличивающими концентрациями U0126, описанным выше специфическим ингибитором пути с участием Mek1/Erk. Представленный на фиг. 3В анализ Вестерн-блоттингом показывает, что U0126 ингибировал GGF2-индуцируемую активацию Erk зависимым от дозы образом, хотя он не оказывал эффект на активацию Akt. Низкий уровень эндогенной активности Erk,

обычно наблюдаемый в сокультуральной системе, также снижался при обработке лекарственным средством.

Авторы настоящего изобретения в дальнейшем оценили эффект ингибирования Mek1/Erk на миелинизацию. Как продемонстрировано на фиг. 3С и 3D, добавление GGF2 в высокой концентрации почти полностью ингибировало миелинизацию в сокультурах. Однако в культурах, совместно обработанных U0126, ингибиторный эффект GGF2 был отменен, о чем свидетельствует зависимое от дозы увеличение уровня миелинизации (фиг. 3С и 3D). Этот результат дает прямое доказательство того, что ингибиторный эффект GGF2 на миелинизацию опосредуется через активацию Erk. Интересно, что обработка U0126 в сокультурах в отсутствие GGF2 также приводила к повышению уровня миелинизации (фиг.3Е), что указывает на то, что эндогенная активность Mek1/Erk действует в качестве внутреннего отрицательного регулятора миелинизации.

Анализ Вестерн-блоттингом на лизатах, приготовленных из сокультур, также показал, что обработка GGF2 увеличивает экспрессию белка c-Jun, отрицательного регулятора дифференциации шванновских клеток и миелинизации ими. Последующее ингибирование GGF2-индуцируемой активности Mek1/Erk снижало уровни c-Jun, что, в свою очередь, сопровождалось увеличением экспрессии белка миелина. В отличие от эффекта на c-Jun, обработка U0126 приводила к увеличению экспрессии Krox20 в сокультурах. Это согласуется с недавним сообщением о предполагаемом существовании перекрестной антагонистической связи между c-Jun и Krox20 в регуляции миелинизации (Parkinson et al., 2008, Journal of Cell Biology 181: 625-637).

GGF2 стимулирует миелинизацию шванновскими клетками. Для подтверждения и расширения представленных в настоящем документе результатов и дальнейшей оценки противоположных действий GGF2 авторы настоящего изобретения оценили зависимый от концентрации эффект GGF2 на активацию Ras/Raf/Erk и PI3-киназы в шванновских клетках. Клетки обрабатывали различными концентрациями GGF2, находящимися в диапазоне от 0,0003 до 10 нМ, и уровень активации Erk и Akt определяли с помощью анализа Вестерн-блоттингом. Снимки и относительное увеличение уровней активации представлены на фиг. 4А и 4В. Уровень активной Akt увеличивался неуклонно, начиная с наименьшей из проверенных доз, в то время как для активации Erk требовались более высокие концентрации GGF2. Дифференциальная активация двух путей при низких концентрациях, в результате, создавала узкое окно доз (от 0,003 до 0,01 нМ, в рамке на фиг. 4В), в котором Akt был преобладающим путем, стимулированным в ответ на GGF2. Затем в сокультуральной системе был определен эффект различных доз GGF2 на миелинизацию. В окне низких концентраций, GGF2 вызывал зависимый от дозы промиелинизирующий эффект: 1,5-, 2,3-, 2,2- и 2,8-кратное увеличение миелинизации по сравнению с контрольными культурами при 0,0005, 0,001, 0,003 и 0,01 нМ GGF2, соответственно (фиг.4С). По мере дальнейшего увеличения концентрации, GGF2 начинал ингибировать миелинизацию, что совпадает с появлением активации Erk. Промиелинизирующий эффект GGF2 был также продемонстрирован в сокультурах CRD-Nrg1^{+/-}, в которых низкие дозы GGF2 избавляли от недостатка миелинизации на мутантных аксонах (фиг. 4D).

Растворимый Nrg1 мог как стимулировать, так и ингибировать миелинизацию. определяемый концентрацией двоичный выбор: В периферической нервной системе (ПНС), GGF2 рассматривался в качестве изоформы Nrg1, связанной с ответом на повреждение шванновских клеток. Эктопическая *in vivo* экспрессия GGF-β3 в миелинизирующих шванновских клетках стимулирует пролиферацию клеток и

индуцирует демиелинизацию (Huijbregts et al. J. Neurosci. 2003; 23: 7269-7280). Кроме того, установлено, что добавление высоких концентраций GGF2 (например, концентраций, превышающих 0,25 нМ GGF2) в сокультуры шванновских клеток и нейронов DRG ингибирует миелинизацию (Zanazzi et al. J. Cell Biol. 2001; 152: 1289-1299).

5 Поэтому неожиданным результатом настоящего исследования было обнаружение того, что при низкой концентрации, GGF2 проявляет эффекты активации миелинизации. Однако промиелинизирующий эффект ограничивался диапазоном низких концентраций, и увеличение концентрации GGF2 с этого диапазона приводит к ингибированию миелинизации, как описано ранее. Это обнаружение вызывает интерес, поскольку оно

10 демонстрирует, что растворимый GGF2 может вызывать два противоположных действия в одном и том же клеточном контексте исключительно на основе количества, представляемого клетке. Оно также наводит на мысль, что пороговые уровни GGF2 определяют промиелинизирующее и ингибиторное действие во время миелинизации. Как впервые продемонстрировано в настоящем исследовании, это может объясняться

15 зависимой от концентрации дифференциальной активацией эффекторов, стимулируемых при передаче сигналов вниз от рецепторов. Конкретнее, данные настоящего исследования показывают, что промиелинизирующее действие GGF2 наблюдается при концентрациях, которые преимущественно стимулируют Akt, в то время как переход на ингибиторную роль при более высоких концентрациях совпадает с появлением

20 активации Erk, несмотря на непрерывное увеличение уровня активного Akt. Этот результат также подтверждает предыдущую идею, что баланс между активацией PI3-киназы и Ras/Raf/Erk является решающим в определении состояния миелинизации в шванновских клетках (Ogata et al. J. Neurosci. 2004; 24: 6724-6732). Настоящие данные, однако, дают прямое доказательство того, что активация пути с участием Ras/Raf/Erk

25 действует в качестве отрицательного регулятора миелинизации.

Ингибиторное действие Nrg1 на миелинизацию опосредуется через активацию Erk/Mek1. Предположение об ингибиторной роли пути с участием Ras/Raf/Erk в миелинизации было сделано ранее на основе исследований, в которых экспрессия конститутивно

30 активной Mek1 в шванновских клетках блокирует форсколин-индуцированную экспрессию гена миелина, в то время как доминантный-отрицательный Ras блокирует индуцированную Nrg1 супрессию гена миелина. Этот непосредственный эффект на миелинизацию, однако, не был разъяснен до результатов настоящего исследования. В настоящем документе продемонстрировано, GGF2, при использовании выше пороговой

35 концентрации, ингибирует миелинизацию в сокультурах. Авторы настоящего изобретения показывают в настоящем документе, что ингибирование активации Mek1/Erk1 возрождает миелинизацию в обработанных GGF2 сокультурах, демонстрируя, что ингибиторная роль GGF2 опосредовалась через активацию Ras/Raf/Erk1. Механизм, с помощью которого активация Mek1/Erk ингибирует миелинизацию, неясен. Возможный механизм включает супрессию экспрессии гена миелина, описанную ранее.

40 Подтверждающие это предположение данные настоящего исследования показали, что увеличение миелинизации в обработанных U0126 культурах сопровождается увеличением экспрессии P0. Также возможно, что путь с участием Mek1/Erk мог бы модулировать экспрессию транскрипционных факторов, вовлеченных в миелинизацию шванновскими клетками или их дифференциацию. Недавно было установлено, что

45 эктопическая экспрессия c-Jun в шванновских клетках ингибирует миелинизацию, наводя, таким образом, на мысль, что c-Jun действует в качестве отрицательного регулятора миелинизации. Данные настоящего исследования согласуются с этим выводом, поскольку авторы настоящего изобретения определили, что обработка GGF2,

которая ингибирует миелинизацию, сопровождается индукцией c-Jun, и, кроме того, ингибирование Nrg1-индуцированной активности Mek1/Erk1 блокирует экспрессию c-Jun. Этот результат наводит на мысль, что ингибиторное действие Mek1/Erk1 на миелинизацию отчасти опосредуется через индукцию c-Jun.

5 Другими интересными данными настоящего исследования является наличие внутреннего Mek1/Erk-зависимого сигнала в сокультурах, который служит в качестве отрицательного регулятора миелинизации. Это было установлено в эксперименте, в котором обработка U0126 нормальных миелинизирующих сокультур стимулировала миелинизацию. Природа сигнала, вносящего вклад в активность Mek1/Erk1, во время
10 миелинизации в настоящее время неизвестна, хотя она, по-видимому, является аксонной по природе, независимой от аксонного CDR-Nrg1. Возможными кандидатами являются Ig-Nrg1 типа I и II, которые экспрессируются нейронами ПНС и позже отсоединяются от аксонных оболочек с помощью протеолического расщепления. Другим возможным активатором Mek1/Erk является FGF-2, который экспрессируется в нейронах ПНС, и
15 рецептор для которого экспрессируется на шванновских клетках. Обработка FGF-2 подавляет экспрессию гена миеллина и ингибирует миелинизацию *in vitro*. Утрата экспрессии FGF-2 приводит к увеличению числа миелинизированных аксонов во время регенерации седалищного нерва. Периферические нейроны также экспрессируют PDGF и IGF, при этом соответствующие рецепторные тирозинкиназы экспрессируются на
20 связанных с ними шванновских клетках. Большой интерес будет представлять оценка регуляторной роли этих факторов роста во время миелинизации ПНС.

Терапевтическое применение GGF2. Экспериментальная трансплантация дала неоспоримое доказательство возможности восстановления поврежденных нервов путем трансплантации миелинизирующих глиальных клеток. Шванновские клетки являются
25 хорошими кандидатами для такой терапии, поскольку они легко размножаются в культуре и открывают возможность аутологичной трансплантации для стимуляции ремиелинизации и восстановления проводимости по нерву в демиелинизированных очагах не только в ПНС, но также в ЦНС. Ремиелинизация с использованием шванновских клеток на регенерирующихся аксонах взрослого, однако, часто является
30 неполной, приводя к образованию более тонкой миелиновой оболочки и более короткого участка нервного волокна между перехватами Ранвье по сравнению с нормальными нервами. Поэтому настоящая демонстрация промиелинизирующего действия GGF2 и возможности избежать случайной блокировки миелинизации, обусловленной уровнями доз GGF2, является важной, поскольку она обеспечивает
35 терапевтическую стратегию для лечения демиелинизирующих заболеваний, а также для восстановления миеллина после повреждения нерва.

Другие варианты осуществления. Все публикации и заявки на патенты, упоминаемые в этом описании, включены в настоящий документ посредством ссылки в такой же степени, как если бы для каждой независимой публикации или заявки на патент было
40 специально и отдельно указано, что она включена посредством ссылки.

Хотя настоящее изобретение было описано с учетом его конкретных вариантов осуществления, будет понятно, что оно может быть далее модифицировано, и эта заявка, как предполагается, охватывает любые варианты, применения или адаптации настоящего изобретения, следующие, в общем, принципам настоящего изобретения и включающие
45 такие отклонения от настоящего описания, которые подпадают под известную или обычную практику в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение, и могут быть применены к существенным признакам, изложенным выше, и отслеживается в объеме прилагаемой формулы изобретения.

(57) Формула изобретения

1. Способ расширения диапазона терапевтических доз фактора 2 роста глии (GGF2), когда GGF2 используется для способствования миелинизации, включающий

5 отбор пациента с заболеванием или нарушением, связанным со сниженными уровнями миелинизации,

введение пациенту GGF2 и ингибитора пути с участием Mek1/Erk,

10 посредством чего возникает GGF2-опосредованная миелинизация при более высоких дозах GGF2, чем она могла бы происходить в отсутствие введения ингибитора пути с участием Mek1/Erk.

2. Способ по п. 1, в котором стадия введения включает введение количества GGF2, которое вызывает уровень в плазме выше 0,01 нМ +/-15% GGF2.

3. Способ по п. 2, в котором стадия введения включает введение количества GGF2, которое вызывает уровень в плазме выше 0,01 нМ GGF2.

15 4. Способ по п. 1, в котором стадия введения включает введение количества GGF2, превышающего 500 нг +/-15% GGF2 на кг веса тела.

5. Способ по п. 4, в котором стадия введения включает введение количества GGF2, превышающего 500 нг GGF2 на кг веса тела.

20

25

30

35

40

45

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Kim, Haesun
Caggiano, Anthony

<120> СПОСОБ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ТРЕБУЕМЫХ УРОВНЕЙ ФАКТОРА 2 РОСТА ГЛИИ В ПЛАЗМЕ

<130> ACOR.P0038WO

<140> PCT/US2009/001356
<141> 2009-03-02

<150> 61/067589
<151> 2008-02-29

<160> 14

<170> FastSEQ для Windows версии 4.0

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

<400> 1
ggaattcctt tttttttttt tttttttcct rrtttttttt tgcccttata cctcttcgcc 60
tttctgtggt tccatccact ttttccccct cctcctccca taaacaactc tcctaccctt 120
gcacccccaa taaataaata aaaggaggag ggcaaggggg gaggaggagg agtgggtgctg 180
cgagggggaag gaaaagggag gcagcgcgag aagagccggg cagagtccga accgacagcc 240
agaagcccgc acgcacctcg caccatgaga tggcgacgcg ccccgcgccg ctccgggctg 300
ccccgccccg gggcccagcg ccccggtctc gccgcccgtc cgtcgcgcgc gctgcccgtg 360
ctgccactac tgctgctgct ggggaccgcg gccctggcgc cggggggcgc gcccggaac 420
gagggggctc ccgcgggggc ctcggtgtgc tactcgtccc cggccagcgt gggatcggtg 480
caggagctag ctcagcgcgc cgcggtggtc atcgagggaa aggtgcacc gcagcggcgg 540
cagcaggggg cactcgacag gaaggcggcg gcggcggcgg gcgaggcagg gccgtggggc 600
ggcgatcgcg agccgccagc cgcgggcccc cgggcgctgg ggccgcccgc cgaggagccg 660
ctgctcgccg ccaacgggac cgtgcctctc tggcccaccg ccccggtgcc cagcgcggcg 720
gagcccgggg aggagggccc ctatctggtg aaggtgcacc aggtgtgggc ggtgaaagcc 780
gggggcttga agaaggactc gctgctcacc gtgcccctgg ggacctgggg ccaccccgcc 840
ttcccctcct gcgggaggct caaggaggac agcaggatca tcttcttcat ggagcccgc 900
gccaacagca ccagccgcgc gccggccgcc tccgagcct cttcccccc tctggagacg 960
ggccggaacc tcaagaagga ggtcagcccg gtgctgtgca agcgggtgcg cttgcctccc 1020
caattgaaag agatgaaaag ccaggaatcg gctgcagggt ccaaactagt ccttcggtgt 1080
gaaaccagtt ctgaatactc ctctctcaga ttcaagtgtg tcaagaatgg gaatgaattg 1140
aatcgaaaaa acaaacccaca aaatatcaag atacaaaaaa agccagggaa gtcagaactt 1200
cgattaaca aagcatcact ggctgattct ggagagtata tgtgcaaat gatcagcaaa 1260
ttaggaaatg acagtgcctc tgccaatatt accatcgtgg aatcaaacgc tacatctaca 1320
tccaccactg ggacaagcca tcttgtaaaa tgtgcggaga aggagaaaac tttctgtgtg 1380
aatggagggg agtgcttcat ggtgaaagac ctttcaaac cctcgagata cttgtgcaag 1440
tgcccaaatg agtttactgg tgatcgctgc caaaactacg taatggccag cttctacagt 1500
acgtccactc cctttctgtc tctgcctgaa taggagcatg ctcagttggt gctgctttct 1560
tggtgctgca tctccccca gattccacct agagctagat gtgtcttacc agatctaata 1620
ttgactgctc ctgctgtgct catgagaaca ttaacaaaag caattgtatt acttccctcg 1680
ttcgcgacta gttggctctg agatactaat aggtgtgtga ggctccggat gtttctggaa 1740
ttgatattga atgatgtgat acaaatgat agtcaatatt aagcagtgaa atatgataat 1800
aaaggcattt caaagtctca cttttattga taaaataaaa atcattctac tgaacagtc 1860
atcttcttta tacaatgacc acatcctgaa aagggtgttg ctaagctgta accgatatgc 1920
acttgaatg atggtaagtt aattttgatt cagaatgtgt tatttgtcac aaataaacat 1980
aataaaagga aaaaaaaaaa aaa 2003

<210> 2

<211> 422
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Arg Trp Arg Arg Ala Pro Arg Arg Ser Gly Arg Pro Gly Pro Arg
 1 5 10 15
 Ala Gln Arg Pro Gly Ser Ala Ala Arg Ser Ser Pro Pro Leu Pro Leu
 20 25 30
 Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Gly Thr Ala Ala Leu Ala Pro Gly Ala
 35 40 45
 Ala Ala Gly Asn Glu Ala Ala Pro Ala Gly Ala Ser Val Cys Tyr Ser
 50 55 60
 Ser Pro Pro Ser Val Gly Ser Val Gln Glu Leu Ala Gln Arg Ala Ala
 65 70 75 80
 Val Val Ile Glu Gly Lys Val His Pro Gln Arg Arg Gln Gln Gly Ala
 85 90 95
 Leu Asp Arg Lys Ala Ala Ala Ala Ala Gly Glu Ala Gly Ala Trp Gly
 100 105 110
 Gly Asp Arg Glu Pro Pro Ala Ala Gly Pro Arg Ala Leu Gly Pro Pro
 115 120 125
 Ala Glu Glu Pro Leu Leu Ala Ala Asn Gly Thr Val Pro Ser Trp Pro
 130 135 140
 Thr Ala Pro Val Pro Ser Ala Gly Glu Pro Gly Glu Glu Ala Pro Tyr
 145 150 155 160
 Leu Val Lys Val His Gln Val Trp Ala Val Lys Ala Gly Gly Leu Lys
 165 170 175
 Lys Asp Ser Leu Leu Thr Val Arg Leu Gly Thr Trp Gly His Pro Ala
 180 185 190
 Phe Pro Ser Cys Gly Arg Leu Lys Glu Asp Ser Arg Tyr Ile Phe Phe
 195 200 205
 Met Glu Pro Asp Ala Asn Ser Thr Ser Arg Ala Pro Ala Ala Phe Arg
 210 215 220
 Ala Ser Phe Pro Pro Leu Glu Thr Gly Arg Asn Leu Lys Lys Glu Val
 225 230 235 240
 Ser Arg Val Leu Cys Lys Arg Cys Ala Leu Pro Pro Gln Leu Lys Glu
 245 250 255
 Met Lys Ser Gln Glu Ser Ala Ala Gly Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys
 260 265 270
 Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser Ser Leu Arg Phe Lys Trp Phe Lys Asn
 275 280 285
 Gly Asn Glu Leu Asn Arg Lys Asn Lys Pro Gln Asn Ile Lys Ile Gln
 290 295 300
 Lys Lys Pro Gly Lys Ser Glu Leu Arg Ile Asn Lys Ala Ser Leu Ala
 305 310 315 320
 Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys Lys Val Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp
 325 330 335
 Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr Ile Val Glu Ser Asn Ala Thr Ser Thr
 340 345 350
 Ser Thr Thr Gly Thr Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys
 355 360 365
 Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser
 370 375 380
 Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp
 385 390 395 400
 Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro
 405 410 415
 Phe Leu Ser Leu Pro Glu
 420

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

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

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

<400> 4
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 1 5 10 15
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr
 35 40 45
 Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro
 50 55 60
 Glu
 65

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

<400> 5
 agccatcttg tcaagtgtgc agagaaggag aaaactttct gtgtgaatgg aggcgagtgc 60
 ttcatgggtga aagacctttc aaatccctca agatacttgt gcaagtgcc acctggattc 120
 actggagcga gatgtactga gaatgtgcc atgaaagtcc aaaccaaga aaaagcggag 180
 gagctctact aa 192

<210> 6
 <211> 63
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

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

<210> 7
 <211> 183
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 7
agccatcttg tcaagtgtgc agagaaggag aaaactttct gtgtgaatgg aggcgagtgc 60
ttcatggtga aagaccttcc aaatccctca agatacttgt gcaagtgcc aaatgagttt 120
actggtgatc gctgcaaaa ctacgtaatg gccagcttct acaagcggga ggagctctac 180
taa 183

<210> 8
<211> 60
<212> Белок
<213> Homo sapiens

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

<210> 9
<211> 210
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

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

<210> 10
<211> 69
<212> Белок
<213> Homo sapiens

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

<210> 11
<211> 267
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 11
agccatcttg tcaagtgtgc agagaaggag aaaactttct gtgtgaatgg aggcgagtgc 60
ttcatggtga aagaccttcc aaatccctca agatacttgt gcaagtgcc acctggattc 120
actggagcga gatgtactga gaatgtgcc atgaaagtcc aaacccaaga aaagtgccca 180
aatgagttta ctggtgatcg ctgcaaaaac tacgtaatgg ccagcttcta cagtacgtcc 240

actccctttc tgtctctgcc tgaatag

267

<210> 12
 <211> 88
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 1 5 10 15
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn
 35 40 45
 Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr
 50 55 60
 Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser
 65 70 75 80
 Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu
 85

<210> 13
 <211> 252
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

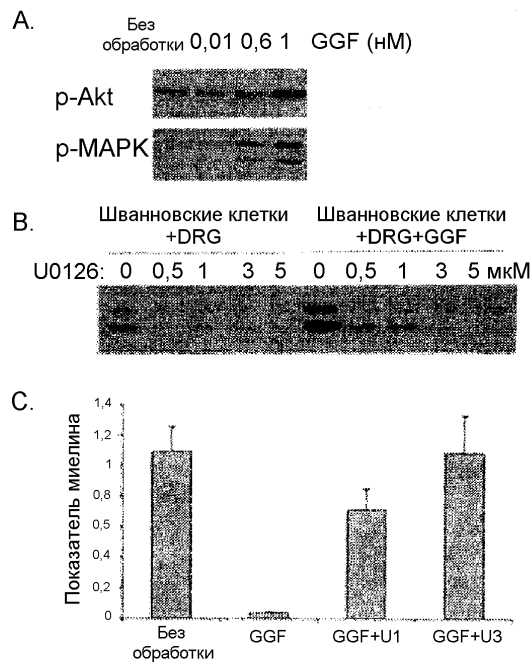
<400> 13
 agccatcttg tcaagtgtgc agagaaggag aaaactttct gtgtgaatgg aggcgagtgcc 60
 ttcattgtga aagacccttc aaatccctca agatacttgt gcaagtgcca acctggattc 120
 actggagcga gatgtactga gaatgtgccc atgaaagtcc aaaccaaga aaagtgccca 180
 aatgagttta ctggatcg ctgccaaaac tacgtaatgg ccagcttcta caaagcggag 240
 gagctctact aa 252

<210> 14
 <211> 83
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 1 5 10 15
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 20 25 30
 Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn
 35 40 45
 Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr
 50 55 60
 Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu
 65 70 75 80
 Glu Leu Tyr

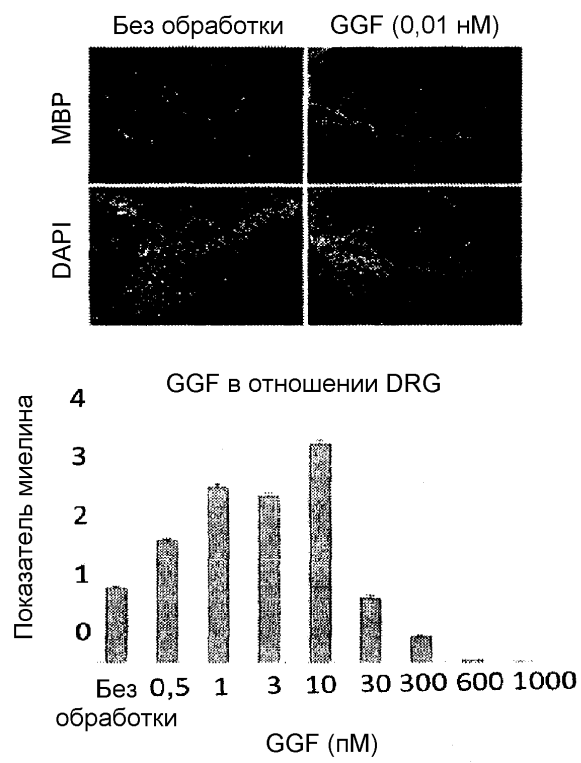
1/15

ФИГ. 1

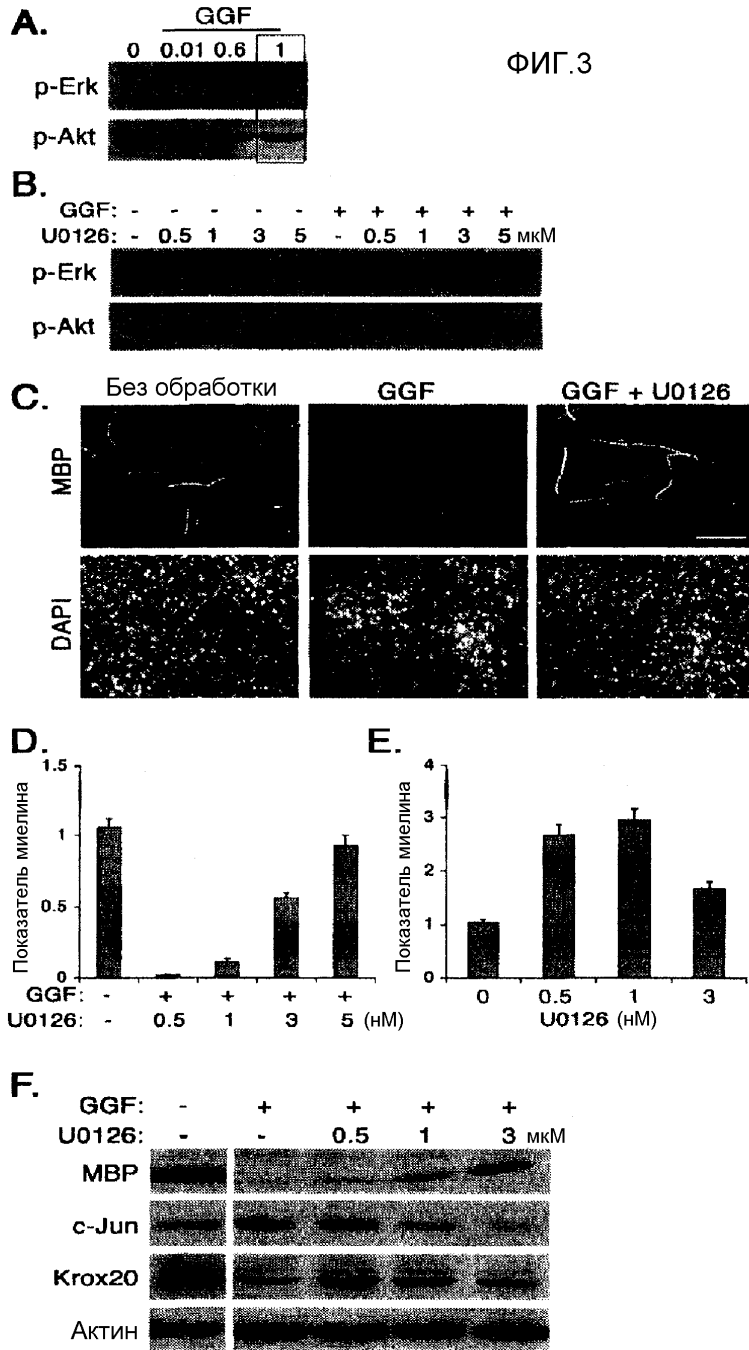


2/15

ФИГ.2

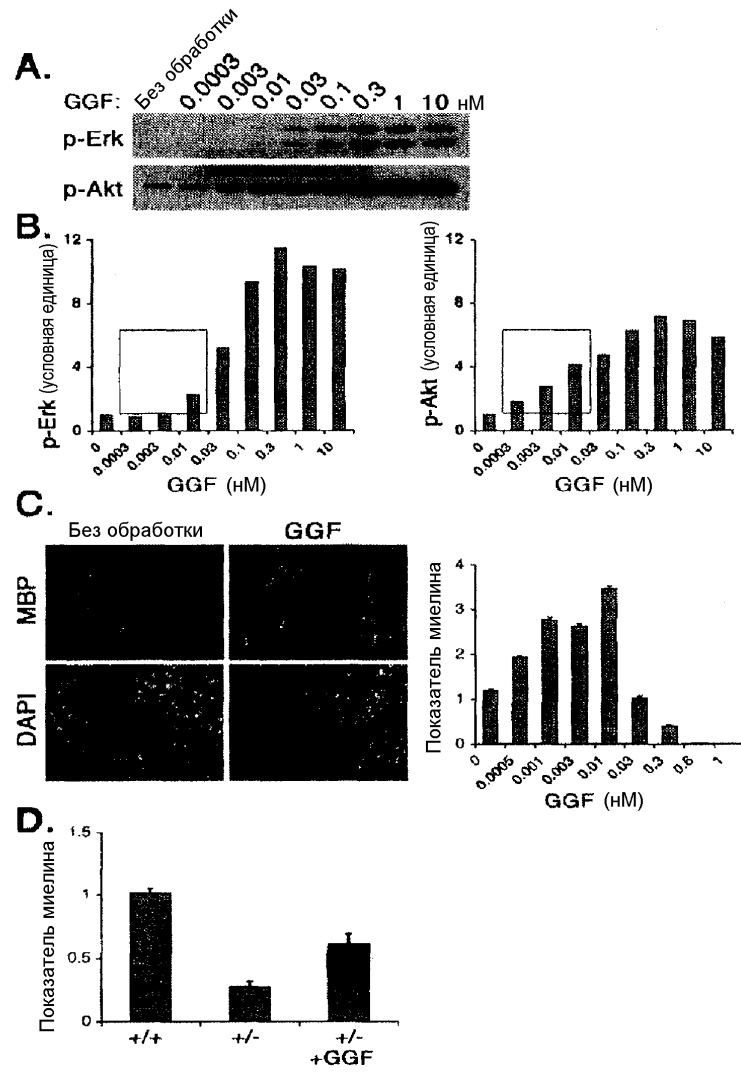


3/15



4/15

ФИГ.4



ФИГ. 5В

Нуклеотидная последовательность
и расшифрованная аминокислотная последовательность GGF2HBS5

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

ФИГ.5С

**Нуклеотидная последовательность
и расшифрованная аминокислотная последовательность GGF2HBS5**

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

ФИГ. 5D

**Нуклеотидная последовательность
и расшифрованная аминокислотная последовательность GGF2HBS5**

AAA TGT CCG GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT CTG AAT GGA GGG GAG TGC Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys	1395
TTC ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAC CCC TCG AGA TAC TTG TGC AAG TGC Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys	1443
CCA AAT GAG TTT ACT GGT GAT CGC TGC CAA AAC TAC GTA ATG GCC AGC Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Glu Asn Tyr Val Met Ala Ser	1491
TTC TAC AGT ACG TCC ACT CCC TTT CTG TCT CTG CCT GAA Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu	1530
TAGGAGCATG CTCAGTTGGT GCTGCTTTCT TCTTGCTGCA TCCTCCCTCA GATCCACCT	1590
AGAGCTAGAT GTGTCTTACC AGATCTAATA TTGACTGCSCT CTCCTGTGCG CATGAGAACA	1650
TTAACAAAAG CAATTGTATT ACTTCCTCTG TTCGGGACTA GTTGGGCTCG AGATACTAAT	1710
AGGTGTGTGA GGCTCCGGAT GTTCTCTGGAA TTGATAATCA ATGATGTGAT ACAAAITGAT	1770
AGTCAATATC AAGCAGTGAA ATATGATTAAT AAAGGCAITTT CAAAAGTCTCA CTTTTATTGA	1830
TAAAATAAAA ATCATCTTAC TGAACACTCC ATCTTCTTTA TACAATGACC ACAITCCTGAA	1890
AAGGGTCTTG CTAAGCTGTA ACCGATATGC ACTTGAATG ATGTAAGTT AATTTTGATT	1950
CAGAAATGCTT TATTGTGCAC AAATAAACAT AATAAAAGGA AAAAAAAA AAA	2003

ФИГ.6

EGFL1

AGC CAT CTT GTC AAG TGT GCA GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT **48**
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn

 GGA GGC GAG TGC TTC ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAT CCC TCA AGA TAC 96
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr

 TTG TGC AAG TGC CCA AAT GAG TTT ACT GGT GAT CGC TGC CAA AAC TAC 144
 Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr

 GTA ATG GCC AGC TTC TAC AGT ACG TCC ACT CCC TTT CTG TCT CTG CCT 192
 Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro

 GAA TAG 198
 Glu

9/15

10/15

ФИНГ.7

EGFL2

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

11/15

ФИГ.8

EGFL3

AGC CAT CTT GTC AAG TGT GCA GAG AAG CAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT **48**
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn

 GGA GGC GAG TGC TTC ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAT CCC TCA AGA TAC 96
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr

 TTG TGC AAG TGC CCA AAT GAG TTT ACT GGT GAT CGC TGC CAA AAC TAC 144
 Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr

 GTA ATG GCC AGC TTC TAC AAA GCG GAG GAG CTC TAC TAA 183
 Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr

12/15

ФИГ.9

EGFL4

AGC CAT CTT GTC AAG TGT GCA GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT 48
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn

 GGA GGC GAG TGC TTC ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAT CCC TCA AGA TAC 96
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr

 TTG TGC AAG TGC CCA AAT GAG TTT ACT GGT GAT CGC TGC CAA AAC TAC 144
 Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr

 GTA ATG GCC AGC TTC TAC AAG CAT CTT GGG ATT GAA TTT ATG GAG AAA 192
 Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys His Leu Gly Ile Glu Phe Met Glu Lys

 GCG GAG GAG CTC TAC TAA 210
 Ala Glu Glu Leu Tyr

ФИНГ.10

EGFL5

AGC CAT CTT GTC AAG TGT GCA GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG AAT 48
 Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn

 GGA GGC GAG TGC TTC ATG GTG AAA GAC CTT TCA AAT CCC TCA AGA TAC 96
 Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr

 TTG TGC AAG TGC CAA CCT GGA TTC ACT GGA GCG AGA TGT ACT GAG AAT 144
 Leu Cys Lys Cys Gln Pro Gly Phe Thr Gly Ala Arg Cys Thr Glu Asn

 GTG CCC ATG AAA GTC CAA ACC CAA GAA AAG TGC CCA AAT GAG TTT ACT 192
 Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr

 GGT GAT CGC TGC CAA AAC TAC GTA ATG GCC AGC TTC TAC AGT ACG TCC 240
 Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser

 ACT CCC TTT CTG TCT CTG CCT GAA TAG 267
 Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu

13/15

Фиг. 11

EGFL6

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

14/15

15/15

Размер	2224 п.о.						
ТРАНСКРИПТЫ	число транскриптов	9	тип	информационная			
текст	другие альтернативные формы						
идентификация	основная	тип	п.о.	продукт			
				кДа	АК	экспрессируемый в	автор
HRG-гамма, NRG1 тип 1	-	сплайсинга	1651	-	211	-	Holmes
GGF2, NRG1 тип 2	-	сплайсинга	1986	-	422	нервной системе, скелетной мышце	Marchionni, Holmes
SMDF, NRG1 тип 3	-	сплайсинга	1860	31,6	296	в нервной системе, спинном мозге, двигательном нейроне, эмбриональном легком, печени, почке	Holmes, Michailov
	С-концевой домен EGFL и уникальная N-концевая последовательность, в которой отсутствует Ig-подобный домен, богатый цистеином домен (CRD)						
HRG-альфа, NRG1 тип 1	есть	сплайсинга	2224	70.2	640	молочной железе, яичнике, яичках, предстательной железе, сердце, мышце	Holmes, Michailov
HRG-бета 1, NRG1 тип 1	-	сплайсинга	2199	-	645	нейроне	Holmes
HRG-бета 2, NRG1 тип 1	-	сплайсинга	2490	-	637	-	Holmes
HRG-бета 3, NRG1 тип 1	-	сплайсинга	1715	-	241	головном мозге, спинном мозге	Marchionni, Holmes
	может быть ядерной формой						
HRG-NDF43, NRG1 тип 1	-	сплайсинга	1793	-	462	-	Wen, Holmes
GGF, NRG1 тип 2	-	сплайсинга	1199	-	241	нервной системе, скелетной мышце	Marchionni, Holmes
	Ig-подобный и EGFL домен и подобная домену «двойная петля» последовательность						

ФИГ. 12