

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 177**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 31/136 (2006.01)

A61P 25/02 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.03.2009 PCT/US2009/001356**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.09.2009 WO09108390**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2009 E 09715322 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.08.2016 EP 2262527**

54 Título: **Método para conseguir niveles plasmáticos deseados de factor de crecimiento glial 2**

30 Prioridad:

29.02.2008 US 67589 P

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

23.05.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KIM, HAESUN y
CAGGIANO, ANTHONY O.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 613 177 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para conseguir niveles plasmáticos deseados de factor de crecimiento glial 2

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere, como se define en las reivindicaciones, a composiciones para administrar factor de crecimiento glial 2 (GGF2) a un paciente que lo necesita, para conseguir niveles séricos de GGF2 en una ventana terapéutica deseada determinada sobre la base de la enfermedad o trastorno que aflige al paciente.

Antecedentes

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

20 Los tres genes NRG, Nrg-1, Nrg-2, y Nrg-3, se localizan en distintos loci cromosómicos (Pinkas-Kramarski et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9387-91, 1994; Carraway et al., Nature 387:512-516, 1997; Chang et al., Nature 387:509-511, 1997; y Zhang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:9562-9567, 1997), y codifican colectivamente una matriz diversa de proteínas NRG. Los más concienzudamente estudiados hasta la fecha son los productos génicos de Nrg-1, que comprenden un grupo de aproximadamente 15 isoformas distintas estructuralmente relacionadas (Lemke, Mol. Cell. Neurosci. 7:247-262, 1996 y Peles y Yarden, BioEssays 15:815-824, 1993). Las isoformas de NRG-1 identificadas en primer lugar incluyeron el Factor de Diferenciación Neu (NDF; Peles et al., Cell 69, 205-216, 1992 y Wen et al., Cell 69, 559-572, 1992), Heregulina (HRG; Holmes et al., Science 256:1205-1210, 1992), inductor de la actividad del receptor de acetilcolina (ARIA; Falls et al., Cell 72:801-815, 1993), y los factores de crecimiento glial GGF1, GGF2, y GGF3 (Marchionni et al. Nature 362:312-8, 1993).

30 El gen Nrg-2 se identificó por clonación de homología (Chang et al., Nature 387:509-512, 1997; Carraway et al., Nature 387:512-516, 1997; y Higashiyama et al., J. Biochem. 122:675-680, 1997) y a través de estrategias genómicas (Busfield et al., Mol. Cell. Biol. 17:4007-4014, 1997). Los ADNc de NRG-2 también se conocen como activador derivado neural y del timo de las quinasas ErbB (NTAK; no. de acceso Genbank AB005060), divergente de Neuregulina (Don-1), y factor de crecimiento derivado de cerebelo (CDGF; solicitud PCT WO 97/09425). La evidencia experimental muestra que las células que expresan ErbB4 o la combinación ErbB2/ErbB4 probablemente muestren una respuesta particularmente robusta a NRG-2 (Pinkas-Kramarski et al., Mol. Cell. Biol. 18:6090-6101, 1998). El producto génico Nrg-3 (Zhang et al., *supra*) también se sabe que se une y activa los receptores ErbB4 (Hijazi et al., Int. J. Oncol. 13:1061-1067, 1998).

40 Un dominio semejante a EGF está presente en el núcleo de todas las formas de NRG, y se requiere para la unión y activación de los receptores ErbB. Las secuencias de aminoácidos deducidas de los dominios semejantes a EGF codificados en los tres genes son aproximadamente 30-40% idénticas (comparaciones por parejas). Además, parece que hay al menos dos sub-formas de dominios semejantes a EGF en NRG-1 y NRG-2, que pueden conferir diferentes bioactividades y potencias específicas de tejido.

45 Las respuestas celulares a NRG están mediadas a través de las tirosinas quinasas del receptor NRG EGFR, ErbB2, ErbB3, y ErbB4 de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico (Busfield et al., 1997, Mol Cell Biol. 17:4007-14; Carraway et al., 1997, Nature 387:512-6; Chang et al., 1997, Nature 387:509-12). La unión de alta afinidad de todas las NRG está mediada principalmente a través bien de ErbB3 o ErbB4 (Ferguson et al., 2000, EMBO J. 19:4632-43). La unión de los ligandos NRG da lugar a la dimerización con otras subunidades de ErbB y a la transactivación por fosforilación en residuos de tirosina específicos (Honegger et al., 1990, Mol Cell Biol. 10:4035-44; Lemmon y Schlessinger, 1994, Trends Biochem Sci. 19:459-63; Heldin, 1995, Cell. 80:213-23; Hubbard et al., 1998, J Biol Chem. 273:11987-90). En determinados entornos experimentales, casi todas las combinaciones de receptores ErbB parecen ser capaces de formar dímeros en respuesta a la unión de las isoformas NRG-1. ErbB2, sin embargo, parece ser una pareja de dimerización preferida que puede jugar un papel importante en la estabilización del complejo ligando-receptor.

55 Se ha mostrado que GGF2 estimula la proliferación, diferenciación y protección de las células de Schwann (Goodearl et al., 1993, J Biol Chem. 268:18095-102; Minghetti et al., 1996 J Neurosci Res. 43:684-93). La expresión de NRG-1, ErbB2, y ErbB4 también es necesaria para la trabeculación del miocardio ventricular durante el desarrollo del ratón (Meyer y Birchmeier 1995, Nature 378:386-90; Gassmann et al., 1995, Nature 378:390-4; Kramer et al.,

1996, Proc Natl Acad Sci USA 93:4833-8). Se ha mostrado que GGF2 también estimula la proliferación y protección de células de cardiomiocito (Zhao et al., 1998, J Biol Chem 273:10261-10269). La neuroprotección mediada por GGF2 también se ha demostrado en modelos animales de ictus, aunque permanecen sin definir los parámetros relacionados con la dosificación.

- 5 La presente invención avanza el uso de GGF2 respecto a aplicaciones terapéuticas presentando una guía respecto a los métodos para la administración de GGF2 que optimizan el beneficio terapéutico, mientras se limitan los efectos adversos. La presente descripción define ventanas terapéuticas diana para los niveles de concentración sérica de GGF2 que se especifican respecto a afecciones patológicas particulares.

Resumen

- 10 La presente descripción se refiere a la administración de GGF2 a un paciente que lo necesita para conseguir un nivel plasmático sérico de GGF2 en una ventana terapéutica diana determinada para ser efectiva en el tratamiento de una enfermedad o trastorno. Según la presente invención, GGF2 puede administrarse en una composición farmacéutica.

- 15 Según la presente descripción, se presenta un método para evitar la inhibición de la mielinización de las células de Schwann después de la administración de factor de crecimiento glial 2 (GGF2) en un sujeto, comprendiendo dicho método: proporcionar un sujeto que necesita mielinización neuronal; proporcionar GGF2 en un vehículo farmacéuticamente aceptable; administrar el GGF2 al sujeto; y, determinar que la cantidad de GGF2 es menor que la cantidad que inhibe la mielinización de las células de Schwann.

- 20 En otra realización, la presente invención se refiere a una descripción para estimular la mielinización en un paciente afligido con una enfermedad o trastorno asociado con niveles reducidos de mielinización, comprendiendo el método: seleccionar el paciente afligido con una enfermedad o trastorno asociado con niveles reducidos de mielinización; administrar factor de crecimiento glial 2 (GGF2) al paciente en una cantidad de aproximadamente 500 ng de GGF2 por kg de peso corporal; mediante lo cual se estimula la mielinización.

- 25 En otra realización más, la presente descripción se refiere a un método para estimular la mielinización en un paciente afligido con una enfermedad o trastorno asociado con niveles reducidos de mielinización, comprendiendo el método: seleccionar un paciente afligido con una enfermedad o trastorno asociado con niveles reducidos de mielinización; y, administrar factor de crecimiento glial 2 (GGF2) al paciente en una cantidad que consiga un nivel plasmático de aproximadamente 0,01 nM GGF2.

- 30 En una realización adicional, la presente invención se refiere a una descripción para ampliar el intervalo de dosis terapéutica para GGF2 cuando GGF2 se usa para facilitar la mielinización, comprendiendo el método: seleccionar un sujeto con una enfermedad o trastorno asociado con niveles reducidos de mielinización; administrar GGF2 y un inhibidor de la ruta Mek1/Erk al paciente, y, mediante lo cual la mielinización mediada por GGF2 ocurre a mayores dosis de GGF2 de lo que ocurriría en ausencia de la administración del inhibidor de la ruta Mek1/Erk.

- 35 En otra realización, la presente descripción se refiere a un método para determinar si una cantidad de GGF2 es una cantidad terapéuticamente efectiva para estimular la mielinización, comprendiendo el método: proporcionar un sujeto que recibe terapia de GGF2; y medir los niveles de la proteína c-Jun en el sujeto, mediante lo cual un incremento en c-Jun respecto a los niveles de c-Jun en la línea base indica que la cantidad de GGF2 está cerca de un umbral máximo de eficacia terapéutica para estimular la mielinización.

- 40 En una realización particular de la descripción, GGF2 se administra a un mamífero usando un régimen de dosificación dirigido a conseguir una ventana terapéutica diana estrecha de concentraciones plasmáticas de GGF2.

- 45 Como se indica en la presente memoria, se sabe que GGF2 es capaz de estimular la proliferación, diferenciación y protección de las células de Schwann. También se ha mostrado que GGF2 estimula la remielinización y reduce los síntomas en modelos animales de esclerosis múltiple incluyendo encefalomiелitis autoinmune experimental. En algunas circunstancias (por ejemplo, a concentraciones altas de GGF2), sin embargo, GGF2 puede prevenir la mielinización de neuronas co-cultivadas con células de Schwann.

- 50 Los datos presentados en la presente memoria demuestran que GGF2 es capaz de hecho de estimular la mielinización de nervios periféricos pero enseña que se requiere una dosificación precisa de GGF2 a un mamífero que lo necesita para conseguir la mielinización estimulada mediada por GGF2 deseada de los nervios periféricos. Como se enseña en la presente memoria, GGF2 se administra de manera que está en una ventana terapéutica de concentraciones plasmáticas de GGF2 con el fin de estimular la mielinización. En ausencia de los resultados presentados en la presente memoria, no hay apreciación de la ventana terapéutica estrecha de concentraciones plasmáticas de GGF2 requerida para estimular la mielinización en un mamífero que lo necesita.

- 55 Los datos presentados en la presente memoria también demuestran que GGF2 es suficiente para estimular la mielinización y rescatar el defecto de mielinización en axones deficientes para CRD-Nrg1. A concentraciones altas, sin embargo, GGF2 inhibe la mielinización de una manera dependiente de Erk. Los presentes resultados

demuestran que GGF2 es capaz tanto de estimular como de inhibir la mielinización dependiendo de la concentración presentada a las células de Schwann.

De acuerdo con esto, la presente invención se refiere al descubrimiento sorprendente de que existe una correlación positiva hasta ahora desapercibida entre la activación de la ruta de PI3-quinasa mediada por GGF2 y la estimulación de la mielinización y existe una correlación negativa entre la activación de la ruta Mek1/Erk mediada por GGF2 y la estimulación de la mielinización. Dicho de una manera alternativa, los presentes inventores descubrieron que la administración de GGF2 puede ajustarse con precisión para estimular la mielinización mediante la evaluación de los niveles de activación de estas rutas. Según la presente invención, una ventana terapéutica diana para GGF2 respecto a la estimulación de la mielinización en un sujeto es una cantidad de GGF2 que estimula la activación de la ruta PI3-quinasa (ensayada, por ejemplo, detectando Akt fosforilado) en ausencia de activación detectable de la ruta Mek1/Erk (ensayada, por ejemplo, detectando Erk fosforilado).

Las formulaciones y composiciones de la presente invención presentan un perfil de liberación específico, deseado, que maximiza el efecto terapéutico mientras minimiza los efectos secundarios adversos. El perfil de liberación deseado puede describirse en términos de la concentración plasmática máxima del fármaco o agente activo (C_{max}) y la concentración plasmática del fármaco o agente activo a un intervalo de dosificación específico (C_{tau}). Puede calcularse una relación de C_{max} a C_{tau} ($C_{max}:C_{tau}$) a partir de la C_{max} y C_{tau} observadas. Un intervalo de dosificación (tau) es el tiempo desde la última administración del fármaco o agente activo. En la presente solicitud, el intervalo de dosificación (tau) puede ser, por ejemplo, doce (12) horas, en cuyo caso C_{tau} es la concentración del fármaco o agente activo a las doce (12) horas desde la última administración.

Adicionalmente, las formulaciones y composiciones de la presente invención presentan un perfil de liberación deseado que puede describirse en términos de la concentración plasmática máxima del fármaco o agente activo en el estado estacionario (C_{maxSS}) y la concentración plasmática mínima del fármaco o agente activo en el estado estacionario (C_{minSS}). El estado estacionario se observa cuando la velocidad de administración (absorción) es igual a la velocidad de eliminación del fármaco o agente activo. Puede calcularse una relación de C_{maxSS} a C_{minSS} ($C_{maxSS}:C_{minSS}$) a partir de la C_{maxSS} y C_{minSS} observadas. Además, las formulaciones y composiciones de la presente invención presentan un perfil de liberación deseado que puede describirse en términos de la concentración plasmática promedio del fármaco o agente activo en el estado estacionario (C_{avSS}).

En una realización de la invención dirigida a un paciente que necesita remielinización, los niveles séricos pico diana de GGF2 son aproximadamente 0,01 nM.

En una realización de la invención dirigida a un paciente que necesita remielinización, los niveles séricos pico diana de GGF2 son a o aproximadamente cualquiera de los valores siguientes, o intervalo entre los valores siguientes de aproximadamente 0,001 a 0,01 ng/ml; 0,01 a 0,1 ng/ml; 0,1 a 1,0 ng/ml; 1,0 a 10 ng/ml; 10 a 100 ng/ml; ó 100 a 1.000 ng/ml. En una realización particular, el nivel sérico pico diana es aproximadamente 1,0 ng/ml.

En una realización de la invención dirigida a un paciente que ha tenido un ictus, los niveles séricos pico diana de GGF2 son a o aproximadamente cualquiera de los valores siguientes, o intervalo entre los valores siguientes de aproximadamente 0,00001 a 0,0001 ng/ml; 0,0001 a 0,001 ng/ml; 0,001 a 0,01 ng/ml; 0,001 a 0,01 ng/ml; 0,01 a 0,1 ng/ml; 0,1 a 1,0 ng/ml; 1,0 a 10 ng/ml; 10 a 100 ng/ml; 100 a 1.000 ng/ml; 1.000 a 10.000 ng/ml; ó o 10.000 a 100.000 ng/ml. En una realización particular, el nivel sérico pico diana es aproximadamente 0,2 microgramos/ml.

En una realización de la invención dirigida a un paciente que tiene neuropatía, los niveles séricos pico diana de GGF2 son a o aproximadamente cualquiera de los valores siguientes, o intervalo entre los valores siguientes de aproximadamente 0,001 a 0,01 ng/ml; 0,01 a 0,1 ng/ml; 0,1 a 1,0 ng/ml; 1,0 a 10 ng/ml; 10 a 100 ng/ml; ó 100 a 1.000 ng/ml. En una realización particular, el nivel sérico pico diana es aproximadamente 6,25 ng/ml.

En una realización de la invención dirigida a un paciente que tiene fallo cardíaco, los niveles séricos pico diana de GGF2 son a o aproximadamente cualquiera de los valores siguientes, o intervalo entre los valores siguientes de aproximadamente 0,001 a 0,01 ng/ml; 0,01 a 0,1 ng/ml; 0,1 a 1,0 ng/ml; 1,0 a 10 ng/ml; 10 a 100 ng/ml; ó 100 a 1.000 ng/ml. En una realización particular, el nivel sérico pico diana es aproximadamente 6,8 microgramos/ml.

Según la presente invención, las composiciones farmacéuticas que comprenden GGF2 pueden administrarse a través de diferentes rutas conocidas para los expertos en la técnica. Puede emplearse cualquier ruta de administración apropiada, por ejemplo, administración intravenosa, parenteral, subcutánea, intramuscular, intracraneal, intraorbital, oftálmica, intraventricular, intracapsular, intraespinal, intracisternal, intraperitoneal, intranasal, aerosol, oral, o tópica (por ejemplo, aplicando un parche adhesivo que porta una formulación capaz de atravesar la dermis y entrar en la corriente sanguínea). La administración oral se considera que incluye formas de dosificación oral de liberación sostenida que comprenden GGF2. Una composición farmacéutica de GGF2, tal y como se describe en la presente memoria, puede usarse para tratar individuos afectados con trastornos neurológicos en los que dicha composición farmacéutica maximiza el efecto terapéutico, mientras minimiza los efectos secundarios adversos.

En una primera realización de la presente descripción, GGF2 se administra a un mamífero afligido con un trastorno neurológico asociado con desmielinización, en el que GGF2 se administra en un regimen de dosificación para

- conseguir y mantener una ventana terapéutica diana estrecha de concentraciones plasmáticas de GGF2. Como se enseña en la presente memoria, es necesaria la dosificación precisa de GGF2 con el fin de conseguir niveles plasmáticos séricos de GGF2 requeridos para la eficacia terapéutica respecto a la inducción de mielinización en un sujeto que lo necesita. Los ejemplos de trastornos desmielinizantes para los que es necesaria una dosificación adecuada de GGF2 con el fin de conseguir eficacia terapéutica incluyen síndrome de Guillain-Barre, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, desmielinización periférica debida a lesión traumática, esclerosis múltiple, neuritis óptica, desmielinización central debida a lesión traumática, mielitis transversal, leucoencefalopatía multifocal progresiva, enfermedad de Devic (neuromielitis óptica), encefalomielitis diseminada aguda, adrenoleucodistrofia y adrenoleuc neuropatía.
- 5
- 10 En una segunda realización de la presente descripción, GGF2 se administra a un mamífero afligido con un trastorno del músculo cardíaco, tal como fallo cardíaco congestivo, infarto de miocardio, lesión por reperfusión, cardiotoxicidad química, viral o idiopática, arritmias, en los que el GGF2 se administra en un régimen de dosificación para conseguir una ventana terapéutica diana de concentraciones plasmáticas de GGF2.
- 15 En una tercera realización de la presente descripción, GGF2 se administra a un mamífero que ha sufrido un ictus, lesión de la médula espinal o lesión cerebral traumática, en los que el GGF2 se administra en un régimen de dosificación para conseguir una ventana terapéutica diana de concentraciones plasmáticas de GGF2.
- Se apreciará que para cualquiera de las aplicaciones detalladas en la presente memoria, GGF2 puede administrarse en cualquier forma adecuada, o como un componente en una composición farmacéutica y a través de cualquier medio, todos los cuales se describen en la presente memoria y/o se entienden en la técnica.
- 20 De acuerdo con esto, la presente descripción está dirigida a la identificación de una ventana terapéutica diana respecto al nivel plasmático terapéuticamente efectivo de GGF2. La ventana terapéutica diana varía dependiendo de la enfermedad o trastorno que aflige al paciente y la actividad deseada conferida mediante el logro del nivel plasmático terapéuticamente efectivo apropiado de GGF2.
- También está englobado en la presente memoria un método para seleccionar individuos sobre la base de la presentación de síntomas. También está englobado un método para seleccionar individuos sobre la base de la capacidad de respuesta para conseguir el nivel plasmático terapéuticamente efectivo de GGF2, según se indica para cada aplicación, también está englobado en la presente memoria.
- 25 Además de los métodos de tratamiento mostrados anteriormente, la presente descripción se extiende al uso de cualquiera de los compuestos de la invención para la preparación de medicamentos o como medicamentos que pueden administrarse para dichos tratamientos, así como a dichos compuestos para los tratamientos descritos y especificados.
- 30 La presente invención también engloba una composición farmacéutica que comprende GGF2 o un dominio EGFL y un inhibidor de la ruta Mek1/Erk como se define en las reivindicaciones para uso en el tratamiento de un paciente afligido con una enfermedad o trastorno asociado con niveles reducidos de mielinización.
- 35 **Descripción breve de los dibujos**
- La Figura 1A-C muestra (A) activación de Akt y MAPK inducida por GGF2 en co-cultivos de células de Schwann-neuronas DRG. Los co-cultivos de células de Schwann-DRG bajo condición mielinizante se trataron con GGF (0,6 μ M) y 20 minutos después, se evaluaron los niveles de activación de Akt y MAPK por análisis de transferencia Western. (B) Inhibición de la activación de MAPK inducida por GGF2 por U0125. Los co-cultivos se pretrataron con dosis crecientes de U0125 durante 30 minutos y entonces se estimularon con GGF2. Los cultivos control se dejaron sin tratar. La activación de MAPK se evaluó 20 minutos después. (C) La inhibición de la activación de MAPK inducida por GGF2 por U0125 (1 y 3 μ M) revierte el efecto inhibitor de GGF2 sobre la mielinización. Los co-cultivos se co-trataron con GGF2 y U0125 (1 y 3 μ M) bajo condiciones de mielinización. Diez a doce días después, los cultivos se fijaron e inmunotñeron para MBP para evaluar el nivel de mielinización.
- 40
- 45 La Figura 2 muestra que GGF2 estimula la mielinización a concentraciones bajas. Los co-cultivos se trataron con GGF2 a concentraciones que variaron de 0,5 a 1.000 pM (0,0005 a 1 nM) bajo condiciones de mielinización. Diez a doce días después, la mielinización se evaluó por inmunotinción para MBP. Más particularmente, las concentraciones de GGF2 de izquierda a derecha son como sigue: NT, 0,5 pM, 1 pM, 3 pM, 10 pM, 30 pM, 300 pM, 600 pM, y 1.000 pM, respectivamente. Diez a doce días después, la mielinización se evaluó por inmunotinción para MBP.
- 50
- La Figura 3A-F muestra que un efecto inhibitor de GGF sobre la mielinización está mediado por la activación de Mek1/Erk. (A) Se trataron co-cultivos de células de Schwann DRG con GGF (0,01, 0,6, y 1 nM) y 45 minutos después se prepararon los lisados celulares y se determinaron los niveles de Erk (p-Erk) y Akt (p-Akt) activos por análisis de transferencia Western. A 1 nM (encuadrado), GGF indujo la activación tanto de Erk como de Akt. (B) Inhibición de la activación de Erk inducida por GGF en co-cultivos. Se pre-trataron co-cultivos de células de Schwann-DRG con U0126 durante 30 minutos, entonces se añadió GGF (0,6 nM) en la presencia continua de U0126. Después de 45 minutos se prepararon los lisados celulares y se determinó el nivel de p-Erk y p-Akt. El
- 55

tratamiento con U0126 inhibió la activación de Erk tanto endógena como inducida por GGF sin afectar la activación de Akt. (C) Imágenes de segmentos de mielina MBP⁺ formados en co-cultivos tratados con GGF o GGF+U0126 (1 nM). El tratamiento con U0126 suprimió el efecto inhibitor de GGF e indujo mielinización. Los cultivos control se mantuvieron sin ningún tratamiento (NT). Barra de escala: 100 μ m. La cuantificación del resultado se muestra en (D).
 5 (E) La inhibición de la actividad endógena de Erk en co-cultivos estimula la mielinización. Se trataron co-cultivos con concentración creciente de U0126 (0,5, 1 y 3 nM) bajo condiciones mielinizantes y 11 días después, se analizó la mielinización como anteriormente. Se observó un incremento significativo en la mielinización en cultivos tratados con U0126. Las barras de error indican \pm SE ($p < 0,001$). (F) La inhibición de la activación de Erk inducida por GGF está acompañada de una disminución en c-Jun y un incremento en la expresión de Krox20. Los co-cultivos se
 10 mantuvieron bajo condición mielinizante en presencia de GGF o GGF+U0126 (0,5, 1 y 3 nM) durante 11 días y los lisados celulares se analizaron para expresión de MBP, c-Jun y de Krox 20. El nivel de actina sirvió como un control de carga. La expresión de c-Jun inducida por GGF se reguló a la baja con el tratamiento con U0126. El nivel de la proteína Krox 20 apareció incrementado en los cultivos tratados con U0126.

La Figura 4A-C muestra que GGF estimula la mielinización a concentración baja. (A) Se trataron células de Schwann con concentraciones variadas de GGF que variaron de 0,0003 a 10 nM y 20 minutos después se prepararon los lisados celulares y se analizaron los niveles de activación de Erk y Akt por transferencia Western (parte superior) y análisis densitométrico (parte inferior). Un incremento en la activación de Akt apareció a un intervalo de concentración menor (encuadrado) comparado con la activación de Erk. (B) Se trataron los co-cultivos con diferentes concentraciones de GGF (0,0005, 0,001, 0,003, 0,01, 0,03, 0,3, 0,6, y 1 nM) durante 11 días bajo condición mielinizante, entonces se fijaron e inmunotñieron para MBP y DAPI. Se muestran las imágenes de los cultivos control y tratados con 0,01 nM de GGF junto con la cuantificación del resultado (derecha). Se muestra un claro efecto bifásico de GGF que estimula la mielinización a concentraciones bajas (0,0005 a 0,01 nM) mientras se inhibe el proceso a concentración mayor (0,3 nM y superior). (C) La concentración baja de GGF (0,01 nM) incrementó significativamente la mielinización en neuronas CRD-Nrg1^{+/-} ($p=0,003$). Las barras de error muestran \pm SEM. Los
 25 datos se analizaron por ANOVA de una vía (*: $p < 0,001$)

La Figura 5A-D muestra las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de GGF2 de longitud completa.

Las Figuras 6-11 muestran las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de los dominios 1-6 semejantes al factor de crecimiento epidérmico (EGFL).

La Figura 12 muestra una tabla relacionada con la nomenclatura de neuregulinas.

30 Descripción detallada de la invención

Los datos presentados en la presente memoria demostraron que con el fin de estimular la mielinización de los nervios periféricos, GGF2 debe administrarse a un mamífero usando un régimen de dosificación dirigido a conseguir una ventana terapéutica de, por ejemplo, concentraciones plasmáticas de GGF2 o dosis de GGF2.

Definiciones

35 Los términos usados en la presente memoria tienen los significados reconocidos y conocidos por los expertos en la técnica, sin embargo, para conveniencia y completitud, a continuación se muestran términos particulares y sus significados.

Tal y como se usa en la presente memoria "aproximadamente" significa un valor mostrado más o menos otra cantidad; estableciendo, de esta manera, un intervalo de valores. En determinadas realizaciones preferidas,
 40 "aproximadamente" indica un intervalo respecto a un valor o cantidad base (o central o de referencia) más o menos hasta 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,75%, 0,5%, 0,25% ó 0,1%.

Por "dominio semejante a factor de crecimiento epidérmico" o "dominio semejante a EGF" se quiere decir un resto polipeptídico codificado por el gen NRG-1, NRG-2, o NRG-3 que se une a activa ErbB2, ErbB3, ErbB4, o combinaciones de éstos, y presenta una similitud estructural con el dominio de unión del receptor de EGF como se describe en Holmes et al., Science 256:1205-1210, 1992; Pat. U.S. No. 5.530.109; Pat. U.S. No. 5.716.930; U.S. Serie No. 08/461.097; Hijazi et al., Int. J. Oncol. 13:1061-1067, 1998; Chang et al., Nature 387:509-512, 1997; Carraway et al., Nature 387:512-516, 1997; Higashiyama et al., J Biochem. 122:675-680, 1997; y WO 97/09425). Véanse las Figuras 10-15 para las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos de los dominios 1-6 semejantes al factor de crecimiento epidérmico (EGFL).

50 Por "neuregulina" o "NRG" se quiere decir un polipéptido que está codificado por un gen o ácido nucleico de NRG-1, NRG-2, o NRG-3 (por ejemplo, un ADNc), y se une a o activa los receptores ErbB2, ErbB3, o ErbB4, o combinaciones de éstos.

Por "neuregulina-1," "NRG-1," "heregulina," "GGF2," o "ligando p185erbB2" se quiere decir un polipéptido que se une directamente a o transactiva el receptor ErbB2 y está codificado por el gen del ligando p185erbB2 descrito en Pat. U.S. No. 5.530.109; Pat. U.S. No. 5.716.930; y Pat. U.S. No. 7.037.888, los contenidos de cada una de las cuales se incorporan en la presente memoria por referencia. Véanse las Figuras 9A-D para las secuencias de ácido nucleico y
 55

aminoácidos de GGF2 de longitud completa. Véase la Figura 12 para una tabla referente a la nomenclatura de neuregulinas.

5 Los polipéptidos codificados por los genes NRG-1, NRG-2, y NRG-3 poseen dominios semejantes a EGF que les permiten unirse y activar los receptores ErbB. Holmes et al. (Science 256:1205-1210, 1992) han mostrado que el dominio semejante a EGF solo es suficiente para unirse a y activar el receptor de p185erbB2. De acuerdo con esto, cualquier producto polipeptídico codificado por el gen NRG-1, NRG-2, o NRG-3, por ejemplo, un polipéptido que tiene un dominio semejante a EGF codificado por un gen o ADNc de neuregulina (por ejemplo, un dominio semejante a EGF, como se describe en Pat. U.S. No. 5.530.109; Pat. U.S. No. 5.716.930; Pat. U.S. No. 7.037.888, Pat. U.S. No. 7.135.456, y Pat. U.S. No. 7.319.019; o un dominio semejante a EGF como se describe en WO 10 97/09425) puede usarse en los métodos de la invención para conseguir una ventana terapéutica en la que se consigue un nivel plasmático sérico eficaz de GGF2.

También debe indicarse que tal y como se usa en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “una”, “un”, y “el” incluyen la referencia a no ser que el contexto dicte claramente otra cosa.

15 A no ser que se defina otra cosa, todos los términos científicos y técnicos usados en la presente memoria tienen los mismos significados que los entendidos comúnmente por un experto en la técnica. Aunque pueden usarse cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de las realizaciones de la presente invención, se describen ahora métodos, dispositivos y materiales particulares.

20 “Administración local” significa administración directa por una ruta no sistémica en o cerca del sitio de la afección o trastorno.

Los términos “paciente” y “sujeto” se usan en la presente memoria para hacer referencia a todos los animales, incluyendo mamíferos. Los ejemplos de pacientes o sujetos incluyen seres humanos, vacas, perros gatos, cabras, ovejas, y cerdos.

25 El término “sales, ésteres, amidas, y profármacos farmacéuticamente aceptables” tal y como se usa en la presente memoria se refiere a aquellas sales carboxilato, sales de adición de aminoácidos, ésteres, amidas, y profármacos de los compuestos de la presente invención que son, en el alcance del criterio médico sensato, adecuados para uso en contacto con los tejidos de pacientes sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica, y semejantes excesivas, proporcional con una relación beneficio/riesgo razonable, y efectiva para su uso pretendido, así como las formas zwitteriónicas, cuando es posible, de los compuestos de la invención.

30 El término “profármaco” se refiere a compuestos que se transforman rápidamente in vivo para rendir los compuestos parentales de la fórmula anterior, por ejemplo, por hidrólisis en la sangre. Una discusión completa se proporciona en T. Higuchi y V. Stella, “Pro-drugs as Novel Delivery Systems,” Vol. 14 de la serie A.C.S. Symposium, y en Bioreversible Carriers in Drug Design, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association y Pergamon Press, 1987, ambas de las cuales se incorporan en la presente memoria por referencia.

35 El término “sales” se refiere a las sales de adición a ácido inorgánico y orgánico relativamente no tóxicas de compuestos de la presente invención. Estas sales pueden prepararse in situ durante el aislamiento final y purificación de los compuestos o haciendo reaccionar separadamente el compuesto purificado en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado y aislando la sal así formada. Las sales representativas incluyen las sales hirobromuro, hidrocioruro, sulfato, bisulfato, nitrato, acetato, oxalato, valerato, oleato, palmitato, estearato, 40 laurato, borato, benzoato, lactato, fosfato, tosilato, citrato, maleato, fumarato, succinato, tartrato, naftilato, mesilato, glucoheptonato, lactobionato y laurilsulfonato, y semejantes. Éstas pueden incluir cationes basados en metales alcalinos y alcalinotérreos, tales como sodio, litio, potasio, calcio, magnesio, y semejantes, así como amonio, tetrametilamonio, tetrametilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, etilamina, no tóxicos, y semejantes. (Véase, por ejemplo, S. M. Barge et al., “Pharmaceutical Salts,” J. Pharm. Sci., 1977, 66:1-19 que se 45 incorpora en la presente memoria por referencia.).

Una “cantidad terapéuticamente efectiva” es una cantidad suficiente para disminuir los síntomas asociados con una afección o dolencia médica, para normalizar las funciones corporales en enfermedad o trastornos que resultan en la alteración de funciones corporales específicas, o para proporcionar la mejora en uno o más de los parámetros clínicamente medidos de una enfermedad. Preferiblemente, la mejora en los síntomas asociados con la enfermedad 50 asociados con una enfermedad desmielinizante, por ejemplo, incluyendo velocidad al caminar, tono muscular en las extremidades menor, fuerza muscular en las extremidades menor, o espasticidad. Respecto a la presente solicitud, una cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad suficiente para reducir el dolor o espasticidad asociado con el trastorno neurológico que se está tratando, o una cantidad suficiente para resultar en la mejora de la función sexual, de la vejiga o intestinal en sujetos que tienen un trastorno neurológico que altera la conducción nerviosa; o 55 que dificulta las funciones sexuales, de la vejiga o intestinal normales.

“Tratamiento” se refiere a la administración de medicina o la realización de procedimientos médicos respecto a un paciente, para mejorar la afección clínica del paciente, incluyendo una duración disminuida de la enfermedad o

gravedad de la enfermedad, o la mejora subjetiva en la calidad de vida del paciente o una supervivencia prolongada del paciente.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término “ventana terapéutica diana” se refiere al intervalo de dosis o intervalo de concentración sérica que consigue los resultados terapéuticos deseados. Respecto a GGF2, en una realización particular, la ventana terapéutica diana se refiere a una cantidad de GGF2 suficiente para inducir la mielinización de las células de Schwann en un sujeto, cantidad que es menor de la cantidad suficiente para inhibir la mielinización en un sujeto. En un descubrimiento sorprendente, los presentes inventores identificaron la ventana terapéutica diana para GGF2 respecto a su capacidad de estimular la mielinización determinando los niveles relativos de activación de la ruta PI3-quinasa y la activación de la ruta Mek1/Erk. Más particularmente, los presentes inventores descubrieron la hasta ahora no percibida correlación positiva entre la activación de la ruta PI3-quinasa mediada por GGF2 y la estimulación de la mielinización y una correlación negativa entre la activación de la ruta Mek1/Erk mediada por GGF2 y la estimulación de la mielinización. Dicho de una forma alternativa, los presentes inventores descubrieron que la administración de GGF2 puede ajustarse de forma precisa para estimular la mielinización mediante la evaluación de los niveles de activación de estas rutas. Una ventana terapéutica diana para GGF2 respecto a la estimulación de la mielinización en un sujeto se define como una cantidad de GGF2 que estimula la activación de la ruta PI3-quinasa (ensayada, por ejemplo, detectando Akt fosforilado) en ausencia de activación detectable de la ruta Mek1/Erk (ensayada, por ejemplo, detectando Erk fosforilado). La detección de Akt fosforilado y Erk fosforilado puede conseguirse usando ensayos estándar conocidos en la técnica, incluyendo ELISA, (inmuno) transferencia Western, inmunocitoquímica, ensayo de quinasa in vitro, LC/MS (cromatografía líquida/espectrometría de masa), MALDI-TOF MS (desorción/ionización mediante láser asistida por matriz-espectrometría de masa de tiempo de vuelo) u otros sistemas de proteínas conocidos en el campo tal como Luminex

Un experto en la técnica apreciará que se conocen otros marcadores intracelulares de la activación de la ruta PI3-quinasa y la activación de la ruta Mek1/Erk y se usan según la presente invención. Según la presente invención, pueden determinarse otros indicadores de la activación de la ruta PI3-quinasa y la activación de la ruta Mek1/Erk para determinar la ventana terapéutica en la que GGF2 estimula la mielinización.

Además, los compuestos de la presente invención pueden existir en formas no solvatadas así como solvatadas con disolventes farmacéuticamente aceptables tales como agua, etanol, y semejantes. En general, las formas solvatadas se consideran equivalentes a las formas no solvatadas para los propósitos de la presente invención.

“Inhibidores de MAP quinasa”

Una lista no limitativa de inhibidores de MAP quinasa que puede usarse en la presente invención incluye: Arctigenina, que inhibe de forma potente la actividad de MKK1 in vitro con un valor de CI50 de 1 nM y así inhibe la fosforilación y activación de las MAP quinasas ERK1/2, p38 quinasa y JNK y sus actividades en células Raw264.7 tratadas con LPS; PD 98059, que es un inhibidor potente, selectivo y que permea las células de MAP quinasa-quinasa (también conocida como MAPK/ERK quinasa MEK) que inhibe la fosforilación de MAP quinasa por MAP quinasa-quinasa pero no inhibe a la MAP quinasa en sí misma. Los valores de CI50 para los efectos inducidos por PD 98059 están en el intervalo 1-20 μ M para muchos ensayos; SB202190, que es un inhibidor altamente selectivo, potente y que permea las células de p38 MAP quinasas que se une al bolsillo de ATP de la quinasa activa con una Kd de 38 nM según se mide en p38 humano recombinante e inhibe selectivamente las isoformas p38alfa y beta (los valores de CI50 son 50 y 100 nM para p38alfa/SAPK2alfa y p38beta2/SAPK2beta respectivamente); SB203580, que es un inhibidor altamente selectivo y que permea las células de la proteína quinasa activada por mitógeno p38 con valores de CI50 de 50 y 500 nM para p38/SAPK2a y p38/SAPK2b respectivamente y también inhibe la proteína quinasa dependiente de fosfoinosítido 1 (PDK1) a concentraciones 10 veces mayores (CI50 ~3-5 μ M) (presenta una selectividad de 100-500 veces sobre Lck, GSK3b y Akt/PKB); SL 327, que es un inhibidor selectivo de MEK1 y MEK2 con valores de CI50 de 180 y 220 nM, respectivamente. Bloquea la LTP del hipocampo in vitro y penetra en el cerebro in vivo, bloqueando el acondicionamiento al miedo y aprendizaje en ratas, y produciendo neuroprotección en ratones, después de administración sistémica; SP600125, que es un inhibidor selectivo de la quinasa N terminal c-Jun (JNK). Inhibe de forma competitiva y reversible JNK1, 2 y 3 (CI50=40-90 nM) y se ha mostrado que tiene menos potencia inhibidora sobre ERK2, p38b y un rango de otras quinasas y se sabe que es activo in vivo; y U0126, que es un inhibidor selectivo de las quinasas de la proteína quinasa activada por mitógeno, MEK-1 y MEK-2, con una potencia 100 veces mayor que PD 98059 y es un inhibidor débil de PKC, Raf, ERK, JNK, MEKK, MKK-3, MKK-4/SEK, MKK-6, Abl, Cdk2 y Cdk4 e inhibe la transactivación de AP-1 en ensayos informadores basados en células.

Otros inhibidores que están actualmente en ensayo en Fase FDA incluyen los inhibidores de la farnesil transferasa (FTI). Zarnestra® (R115777, tipifarnib), por ejemplo, es el FTI que está más avanzado en desarrollo. Un ensayo de fase II de pacientes con cáncer de mama metastásico tratado previamente ensayó dos esquemas de dosificación diferentes: continuo e intermitente. Las relaciones de respuesta objetivas en los 2 grupos fueron 10% y 14%, con un 15% y 9% adicional que tenían enfermedad estable durante al menos 6 meses. Los efectos secundarios principales observados fueron supresión de la médula ósea y neuropatía, ambos de los cuales fueron menores en el grupo de dosificación intermitente que en el continuo. Varios estudios de fase I de zarnestra y otros FTI se han realizado en combinación con quimioterapia citotóxica y han demostrado la seguridad de estos regímenes de combinación. Los ensayos de fase II en cáncer de mama están en curso, incluyendo uno usando zarnestra en combinación con un inhibidor de aromatasa. La aprobación de la FDA para el uso de zarnestra en leucemia mieloide aguda (AML) está

pendiente de los datos de fase III, ya que el comité de la FDA votó en contra de la aprobación acelerada para zarnestra sobre la base de datos de un ensayo de fase II con un único brazo.

5 Respecto a Zarnestra®, para ensayos clínicos de fase I, Zarnestra® se administra a 400 mg administrados oralmente dos veces al día durante dos semanas; para los ensayos clínicos de fase II, Zarnestra® se administra a 300 mg administrados oralmente dos veces al día durante los primeros 21 días de cada ciclo de 28 días; para los ensayos clínicos de fase III, Zarnestra® se administra a 600 mg administrados oralmente dos veces al día durante los primeros 21 días de cada ciclo de 28 días.

10 Los inhibidores de Raf comprenden otros tipos de inhibidores que están actualmente en ensayos de fase FDA. Sorafenib (BAY 43-9006), por ejemplo, es el primer compuesto que toma como diana no sólo la ruta de señalización Raf/MEK/Erk, sino también las rutas de VEGFR y PDGFR. En marzo de 2004, se adjudicó a sorafenib el estado *Fast Track* por la FDA para cáncer de células renales metastásico. En abril de 2005, sorafenib se aceptó en el programa Piloto 1, que se diseñó para terapias a las que se había adjudicado el estado *Fast Track* por la FDA y que tienen el potencial de proporcionar beneficio significativo sobre la terapia estándar existente. Existen también varios estudios clínicos de fase III grandes, internacionales, de múltiples instituciones de sorafenib en curso en pacientes con cánceres primarios en estadio avanzado del riñón e hígado, así como melanoma metastásico.

15 Respecto a Sorafenib, los estudios clínicos de fase I ensayaron dos niveles de dosis: nivel de dosis 1: 200 mg de Sorafenib por boca dos veces al día durante un ciclo de 3 semanas o nivel de dosis 2: 400 mg de Sorafenib por boca dos veces al día durante un ciclo de 3 semanas.

20 Los resultados de un análisis íterin planeado de un ensayo de fase III en curso en pacientes con cáncer de riñón avanzado se presentaron recientemente (Escudier et al. *J Natl Cancer Inst.* 2008 100:1454-63; cuyos contenidos se incorporan en la presente memoria en su totalidad). Entre los 769 pacientes analizados, la supervivencia sin progresión (PFS) se duplicó hasta un valor mediano de 24 semanas con sorafenib, comparado con 12 semanas con placebo. Los beneficios de sorafenib se observaron en todos los subgrupos de pacientes, independientemente de la edad, duración de la enfermedad, o terapias anteriores. El control de la enfermedad se consiguió en el 80% de los
25 pacientes que recibieron sorafenib: el 78% tenía enfermedad estable (comparado con el 55% en el brazo placebo) y el 2% tenía respuesta parcial (comparado con ninguna en el brazo placebo). La relación sin progresión de 12 semanas fue 79% para sorafenib frente al 50% para placebo. Además, sorafenib se toleró muy bien en 768 pacientes, y los efectos secundarios más comunes fueron hipertensión, fatiga, diarrea, y erupción, incluyendo una erupción en la mano y pie (síndrome de mano y pie). Los ensayos de eficacia de fase II están estudiando sorafenib como un único agente en cánceres avanzados de pulmón, mama, y otros. Los ensayos clínicos de fase I/II están investigando sorafenib en combinación con un rango de agentes quimioterapéuticos estándar y otros agentes anticancerosos.

30 ISIS 5132 es otro inhibidor de raf que ha mostrado una toxicidad aceptable en estudios de fase I. Los estudios de fase II están ahora en curso en una variedad de tipos de cáncer.

35 Otros inhibidores que están actualmente en ensayo de fase FDA incluyen los inhibidores de MEK. CI-1040, por ejemplo, es un inhibidor de molécula pequeña oral, selectivo de MEK 1-2. Los estudios en animales y cultivo han mostrado actividad de este agente en líneas celulares de cáncer de mama. Los estudios de fase I han encontrado efectos secundarios leves gastrointestinales y en la piel. Desafortunadamente, un estudio de fase II en 67 pacientes con 4 tipos de tumor diferentes (cáncer avanzado colorrectal, NSCLC, de mama, y pancreático) no encontró
40 respuestas, aunque el tratamiento con CI-1040 se toleró bien.

PD 0325901, un inhibidor de MEK de segunda generación, ha entrado recientemente en desarrollo clínico y parece tener unas propiedades farmacológicas marcadamente mejores comparado con CI-1040, cuyos investigadores esperan que se pueda traducir en una mejor eficacia anti-cancerosa. Ha mostrado alguna respuesta parcial en pacientes con melanoma.

45 Respecto a PD 0325901, los ensayos clínicos de fase I y fase II ensayaron múltiples niveles de dosis. Administrado oralmente bien una o dos veces al día; varios esquemas de dosificación evaluados; esquema de dosificación actual 5 días en fármaco, 2 días sin fármaco durante 3 semanas en un ciclo de 28 días. Las dosis evaluadas variaron de 1 mg una vez al día a 30 mg dos veces al día. Los ensayos clínicos se interrumpieron prematuramente debido a problemas de seguridad, específicamente toxicidad ocular y neurológica presentada a 10 mg dos veces al día y
50 dosis más altas.

Debe entenderse que esta invención no está limitada a las moléculas, composiciones, metodologías o protocolos particulares descritos, ya que éstos pueden variar. Debe entenderse también que la terminología usada en la descripción es sólo para el propósito de describir realizaciones particulares, y no se pretende que limite el alcance de la presente invención, que sólo está limitado por las reivindicaciones adjuntas.

55 Administración: las neuregulinas y polipéptidos que contienen dominios semejantes a EGF codificados por genes de neuregulina pueden administrarse a pacientes o animales experimentales con un diluyente, vehículo, o excipiente farmacéuticamente aceptable, en forma de dosificación unitaria. La práctica farmacéutica convencional puede emplearse para proporcionar formulaciones o composiciones adecuadas para administrar dichas composiciones a

pacientes o animales experimentales. Puede emplearse cualquier ruta de administración apropiada, por ejemplo, administración intravenosa, parenteral, subcutánea, intramuscular, intracraneal, intraorbital, oftálmica, intraventricular, intracapsular, intraespinal, intracisternal, intraperitoneal, intranasal, aerosol, oral, o tópica (por ejemplo, aplicando un parche adhesivo que porta una formulación capaz de atravesar la dermis y entrar en la corriente sanguínea). Las formulaciones terapéuticas pueden estar en la forma de disoluciones o suspensiones líquidas; para administración oral, las formulaciones pueden estar en la forma de comprimidos o cápsulas; y para las formulaciones intranasales, en la forma de polvos, gotas nasales, o aerosoles. Cualquiera de las formulaciones anteriores pueden estar en una formulación de liberación sostenida.

Los métodos muy conocidos en la técnica para preparar formulaciones se encuentran, por ejemplo, en "Remington's Pharmaceutical Sciences.", que se incorpora en la presente memoria en su totalidad. Las formulaciones para administración parenteral pueden contener, por ejemplo, excipientes, agua estéril, o disolución salina, polialquilen glicoles tales como polietilén glicol, aceites de origen vegetal, o naftalenos hidrogenados. Pueden usarse polímero láctido, copolímeros láctido/glicólido, o copolímeros polioxietileno-polioxipropileno biocompatibles, biodegradables de liberación sostenida para controlar la liberación de los compuestos. Otros sistemas de administración parenteral útiles para administrar moléculas de la invención incluyen partículas de copolímero etileno-acetato de vinilo, bombas osmóticas, sistemas de infusión implantables, y liposomas. Las formulaciones para inhalación pueden contener excipientes, por ejemplo, lactosa, o pueden ser disoluciones acuosas que contienen, por ejemplo, polioxietileno-9-lauril éter, glicocolato y desoxicocolato, o pueden ser disoluciones grasas para administración en la forma de gotas nasales, o como un gel.

Así, como se ha indicado anteriormente, la presente descripción incluye en su alcance, y se extiende a, los métodos recitados de tratamiento y al uso de dichos compuestos para la preparación de medicamentos útiles para dichos métodos.

Enfermedades desmielinizantes: las vainas de mielina cubren muchas fibras nerviosas en el sistema nervioso central y periférico. La presencia de vainas de mielina intactas acelera la transmisión axonal de los impulsos neurales. Los trastornos que afectan la mielina interrumpen la transmisión nerviosa y los síntomas de la enfermedad pueden reflejar déficits en cualquier parte del sistema nervioso.

La mielina formada por oligodendroglia en el sistema nervioso central (SNC) se diferencia químicamente e inmunológicamente de la formada por las células de Schwann periféricamente. Así, algunos trastornos de mielina (por ejemplo, síndrome de Guillain-Barré, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, y otras polineuropatías de nervios periféricos) tienden a afectar principalmente los nervios periféricos, mientras otros trastornos de mielina afectan principalmente el SNC. Las áreas más comúnmente afectadas en el SNC son el cerebro, la médula espinal, y los nervios ópticos.

La desmielinización frecuentemente es secundaria a un trastorno infeccioso, isquémico, metabólico, o hereditario. En los trastornos desmielinizantes primarios, aunque la causa o causas son desconocidas, se sospecha un mecanismo autoinmune porque el trastorno a veces es posterior a una infección viral o vacunación viral.

La desmielinización tiende a ser segmental o irregular, afectando múltiples áreas simultáneamente o secuencialmente. La remielinización puede ocurrir, sin embargo, con reparación, regeneración, y recuperación completa de la función neural. La pérdida extensa de mielina, sin embargo, está seguida habitualmente de degeneración axonal y frecuentemente de degeneración de las células corporales.

La esclerosis múltiple (MS) se caracteriza por zonas diseminadas de desmielinización en el cerebro y la médula espinal. Los síntomas comunes incluyen anomalías visuales y oculomotoras, parestesias, debilidad, espasticidad, disfunción urinaria, y alteración cognitiva leve. Típicamente, los déficits neurológicos son múltiples, con remisiones y exacerbaciones produciendo gradualmente discapacidad. El diagnóstico es por el historial de remisiones y exacerbaciones más signos clínicos, resultados de ensayos, lesiones observadas en formación de imágenes por resonancia magnética (MRI), u otros criterios (dependiendo de los síntomas) para demostrar objetivamente ≥ 2 anomalías neurológicas separadas. El tratamiento incluye generalmente corticosteroides para exacerbaciones agudas, fármacos inmunomoduladores para prevenir exacerbaciones, y medidas de apoyo.

En MS, ocurren áreas localizadas de desmielinización (placas), con destrucción de oligodendroglia, inflamación perivascular, y cambios químicos en constituyentes lipídicos y proteicos de mielina en y alrededor de las placas. El daño axonal es posible, pero los cuerpos celulares y axones tienden a estar relativamente bien conservados. La gliosis fibrosa se desarrolla en placas que se diseminan a lo largo del SNC, principalmente en la materia blanca, particularmente en las columnas lateral y posterior (especialmente en las regiones cervicales), nervios ópticos, y áreas periventriculares. Los tractos en el mesencéfalo, puente troncoencefálico, y cerebelo también están afectados. La materia gris en el cerebro y médula espinal puede estar afectada, pero en un grado mucho menor.

Enfermedad cardíaca

La enfermedad cardíaca es un término general para varias enfermedades diferentes que afectan el corazón. Es la causa principal de muerte en muchos países industrializados, incluyendo los Estados Unidos. Las categorías amplias siguientes de enfermedad cardíaca se presentan como introducción. Las cardiomiopatías extrínsecas son

cardiomiopatías, en las que la patología primaria se encuentra fuera del miocardio. La mayor parte de las cardiomiopatías son extrínsecas, porque la causa más común de cardiomiopatía es la isquemia. Las cardiomiopatías intrínsecas derivan de la debilidad del músculo cardíaco que no se debe a una causa externa identificable. La enfermedad cardiovascular, por otra parte, se refiere a cualquier número de enfermedades específicas que afectan al corazón en sí mismo y/o el sistema de vasos sanguíneos, especialmente las venas y arterias, que van al y salen del corazón. La investigación en el dimorfismo de la enfermedad sugiere que las mujeres que padecen enfermedad cardiovascular habitualmente padecen formas que afectan los vasos sanguíneos mientras los hombres habitualmente padecen formas que afectan el músculo cardíaco en sí mismo. Las causas conocidas o asociadas de enfermedad cardiovascular incluyen diabetes mellitus, hipertensión, hiperhomocisteinemia e hipercolesterolemia. La enfermedad cardíaca isquémica es otra categoría más de enfermedad del corazón en sí mismo, tipificada por un suministro de sangre reducido al órgano.

La enfermedad cardíaca hipertensiva es un término usado para hacer referencia a enfermedad cardíaca causada por una alta presión sanguínea, especialmente, alta presión sanguínea localizada. La enfermedad cardíaca inflamatoria implica inflamación del músculo cardíaco y/o el tejido que lo rodea. La enfermedad cardíaca valvular es cualquier proceso de enfermedad que implica uno o más válvulas del corazón. Las válvulas en el lado derecho del corazón son la válvula tricúspide y la válvula pulmonar y las válvulas en el lado izquierdo del corazón con la válvula mitral y la válvula aórtica.

El fallo cardíaco congestivo, una de las causas principales de muerte en las naciones industrializadas, resulta de una carga de trabajo incrementada en el corazón y una disminución progresiva en su capacidad de bombeo. Puede resultar de cualquier trastorno cardíaco estructural o funcional que altera la capacidad del corazón de llenarse con o bombear una cantidad suficiente de sangre a través del cuerpo. Inicialmente, la carga de trabajo incrementada que resulta de la alta presión sanguínea o pérdida de tejido contráctil induce una hipertrofia de los cardiomiocitos compensadora y engrosamiento de la pared ventricular izquierda, aumentando de este modo la contractibilidad y manteniendo la función cardíaca. Con el tiempo, sin embargo, la cámara ventricular izquierda se dilata, la función de bombeo sistólico se deteriora, los cardiomiocitos experimentan muerte celular apoptótica, y la función miocárdica se deteriora progresivamente.

Los factores que subyacen al fallo cardíaco congestivo incluyen alta presión sanguínea, enfermedad cardíaca isquémica, exposición a compuestos cardiopélicos tales como antibióticos de antraciclina y defectos genéticos que se sabe que incrementan el riesgo de fallo cardíaco.

Por "fallo cardíaco congestivo" se quiere decir función cardíaca alterada que hace que el corazón sea incapaz de mantener un gasto cardíaco normal de sangre en reposo o con ejercicio o mantener un gasto cardíaco normal en el entorno de presión de llenado cardíaco normal. Una fracción de eyección ventricular izquierda de aproximadamente 40% o menos es indicativa de fallo cardíaco congestivo (como comparación, una fracción de eyección de aproximadamente 60% por ciento es normal). Los pacientes con fallo cardíaco congestivo presentan síntomas y signos clínicos muy conocidos, tales como taquipnea, efusiones pleurales, fatiga en reposo o con ejercicio, disfunción contráctil, y edema. El fallo cardíaco congestivo se diagnostica fácilmente por métodos muy conocidos (véase, por ejemplo, "Consensus recommendations for the management of chronic heart failure." Am. J. Cardiol., 83(2A):1A-38-A, 1999).

La gravedad relativa y progresión de la enfermedad se evalúan usando métodos muy conocidos, tales como examen físico, ecocardiografía, formación de imágenes con radionúclidos, monitorización hemodinámica invasiva, angiografía por resonancia magnética, y ensayo de ejercicio en cinta andadora acoplado con estudios de captación de oxígeno.

Por "enfermedad cardíaca isquémica" se quiere decir cualquier trastorno que resulta de un desequilibrio entre la necesidad miocárdica de oxígeno y la idoneidad del suministro de oxígeno. La mayor parte de los casos de enfermedad cardíaca isquémica resultan del estrechamiento de las arterias coronarias, como ocurre en aterosclerosis u otros trastornos vasculares.

Por "infarto de miocardio" se quiere decir un proceso por el cual la enfermedad isquémica resulta en una región del miocardio reemplazada por tejido cicatricial.

Por "cardiopélico" se quiere decir un compuesto que disminuye la función cardíaca alterando directamente o indirectamente o matando a los cardiomiocitos.

Por "hipertensión" se quiere decir una presión sanguínea que se considera por un profesional médico (por ejemplo, un médico o una enfermera) que es más alta de lo normal y que conlleva un riesgo incrementado de desarrollar fallo cardíaco congestivo.

Por "tratar" se quiere decir que la administración de una neuregulina o polipéptido semejante a neuregulina ralentiza o inhibe la progresión de fallo cardíaco congestivo durante el tratamiento, respecto a la progresión de la enfermedad que ocurriría en ausencia de tratamiento, de una manera estadísticamente significativa. Los indicios muy conocidos tales como fracción de eyección ventricular izquierda, comportamiento en el ejercicio, y otros ensayos clínicos, así como tasas de supervivencia y tasas de hospitalización pueden usarse para evaluar la progresión de la enfermedad.

Si un tratamiento ralentiza o inhibe o no la progresión de la enfermedad de una manera estadísticamente significativa puede determinarse por métodos que son muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, SOLVD Investigators, N. Engl. J. Med. 327:685-691, 1992 y Cohn et al., N. Engl. J. Med. 339:1810-1816, 1998).

5 Por “disminuir la progresión del adelgazamiento miocárdico” se quiere decir mantener la hipertrofia de los cardiomiocitos ventriculares de manera que el grosor de la pared ventricular se mantiene o incrementa.

Por “inhibe la apoptosis miocárdica” se quiere decir que el tratamiento con neuregulina inhibe la muerte de cardiomiocitos al menos un 10%, más preferiblemente al menos un 15%, aún más preferiblemente al menos un 25%, incluso más preferiblemente al menos un 50%, incluso más preferiblemente al menos un 75%, y lo más preferiblemente al menos un 90%, comparado con cardiomiocitos intactos.

10 **Ictus**

El ictus o accidente cerebrovascular (CVA) es un término usado para hacer referencia a la pérdida con desarrollo rápido de funciones cerebrales debido a una perturbación en los vasos sanguíneos que suministran sangre al cerebro. Un ictus ocurre cuando el suministro de sangre a parte del cerebro se interrumpe súbitamente o cuando un vaso sanguíneo en el cerebro estalla, derramando sangre en los espacios que rodean las células cerebrales. Las células cerebrales mueren cuando ya no reciben oxígeno y nutrientes de la sangre o cuando hay una hemorragia súbita en o alrededor del cerebro. Los síntomas de un ictus incluyen insensibilidad súbita o debilidad, especialmente en un lado del cuerpo; confusión súbita o problemas para hablar o comprensión oral; problemas súbitos de vista en uno o ambos ojos; problema súbito para andar, mareo, o pérdida del equilibrio o la coordinación; o dolor de cabeza severo súbito sin causa conocida. Hay dos formas de ictus: isquémico, que se debe al bloqueo de un vaso sanguíneo que suministra al cerebro (por ejemplo, causado por trombosis o embolia); y hemorrágico, que resulta de hemorragia en o alrededor del cerebro.

Índice para la ventana terapéutica

25 Para cada aplicación de enfermedad descrita en la presente memoria, se establece una ventana terapéutica diana para los niveles plasmáticos séricos de GGF2. Según los resultados experimentales presentados en la presente memoria, cuando GGF2 se administra a un mamífero afligido con un trastorno neurológico asociado con desmielinización, GGF2 debe administrarse en un régimen de dosificación para conseguir y mantener una ventana terapéutica diana estrecha de concentraciones plasmáticas de GGF2. Como se enseña en la presente memoria, es necesaria una dosificación precisa de GGF2 con el fin de conseguir niveles plasmáticos séricos de GGF2 requeridos para eficacia terapéutica con respecto a la inducción de la mielinización en un sujeto que lo necesita.

30 En una realización de la invención dirigida a un paciente que necesita remielinización una realización particular, el nivel plasmático sérico diana de GGF2 es aproximadamente 0,01 nM.

En otra realización de la invención dirigida a un paciente que necesita remielinización, GGF2 se administra en una cantidad de aproximadamente 500 ng/kg de peso corporal del paciente.

35 Las composiciones de la presente invención pueden usarse en el tratamiento de una afección en un paciente que incluye establecer una concentración terapéuticamente efectiva de GGF2 en el paciente que lo necesita. Las composiciones pueden usarse para acumular un nivel y/o mantener una concentración terapéuticamente efectiva de GGF2 en el paciente. Cuando es deseable, las composiciones de la presente invención pueden formularse para evitar picos grandes en la liberación inicial de GGF2. Las composiciones de la presente invención cuando se administran a un paciente que lo necesita proporcionan el tratamiento de las enfermedades indicadas anteriormente. 40 Preferiblemente, las composiciones se administran de manera que se consigue un nivel en plasma sanguíneo terapéuticamente efectivo de GGF2 que se mantiene en el paciente durante un periodo de al menos 6 horas, preferiblemente al menos 8 horas, y más preferiblemente al menos aproximadamente 10-12.

Ejemplos

Materiales y métodos

45 Anticuerpos

Para los análisis de inmunofluorescencia, se usó anticuerpo monoclonal (SM194) frente a la proteína básica de mielina (MBP) (Sternberger monoclonals) a una dilución 1:500. Para los análisis de transferencia Western, los anticuerpos policlonales frente a erbB2 activo (p-Neu/Tyr 1248), erbB2 y erbB3 se obtuvieron todos de Santa Cruz y se usaron a una dilución 1:1.000. El anticuerpo monoclonal frente a Akt fosforilado y el anticuerpo policlonal frente a MAPK fosforilado se adquirieron en Cell Signaling y se usaron a diluciones de 1:1.000 y 1:500, respectivamente. Los anticuerpos policlonales frente a Akt y MAPK (Promega) se usaron a diluciones de 1:1.000 y 1:5.000, respectivamente.

Neuregulina-1 tipo-II y tipo-III

5 El factor de crecimiento glial humano recombinante-II (rhGGF-II, Nrg1 tipo-II) se obtuvo de Acorda Therapeutics, Inc. El factor derivado de neuronas sensoriales y motoras humano recombinante (rhSMDF, Nrg1 tipo-III) se adquirió en R&D Systems. En el presente estudio, rhGGF-II y rhSMDF se refieren simplemente como GGF (o GGF2) y SMDF, respectivamente. El GGF fue los 419 residuos de aminoácidos N terminales que contienen el dominio EGF y el dominio semejante a Ig. De acuerdo con esto, GGF es una proteína soluble que carece de dominios transmembrana y citoplásmico.

Cultivo primario de células de Schwann de rata

10 Las células de Schwann se prepararon a partir de nervios ciáticos de ratas recién nacidas (1-2 días de edad) como se ha descrito previamente (Brookes et al., Brain Res. 1979; 165:105-118). Para el cultivo rutinario, las células de Schwann se crecieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con 10% suero bovino fetal (FBS) suplementado con dominio de EGF neuregulina-1 (R&D Systems) (10 ng/ml) y Forskolina (2 µM). Se usaron las células entre los subcultivos 2-4 en todos los experimentos descritos en el texto.

Co-cultivo de neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG)-células de Schwann

15 Se prepararon DRG disociadas a partir de embriones de rata del día embrionario 14,5 como se ha descrito previamente (Eldridge et al., J Cell Biol. 1987; 105(2):1023-34) y se plaquearon en cubreobjetos de vidrio de 12 mm recubiertos con colágeno (colágeno tipo 1 de cola de rata) a una densidad de 1,25 DRG/cubreobjetos. Cinco a seis horas después, los cultivos se inundaron con medio neurobasal (Cellgro,) suplementado con B27 (GIBCO), 20% glucosa, NGF (50 ng/ml) y 5-fluorodesoxiuridina (FUdR, 10 µM) y se mantuvieron en el medio durante 2-3 días adicionales con el fin de eliminar las células no neuronales que proliferaran. Los cultivos se cambiaron a medio fresco sin FUdR y se mantuvieron hasta que los axones de DRG alcanzaron la periferia de los cubreobjetos. Después de que se establecieron las redes axonales, las células de Schwann se plaquearon en las neuronas a una densidad de 100.000 células/cubreobjeto. Cuatro a cinco días después, los cultivos se cambiaron a medio mielinizante: medio mínimo esencial (MEM) suplementado con 10% FBS inactivado con calor, 20% glucosa, NGF (50 ng/ml) y ácido ascórbico (50 µg/ml). Diez a once días después, la mielinización se evaluó por inmunotinción para MBP.

Co-cultivo de neuronas de ganglio cervical superior (SCG)-células de Schwann

30 Se prepararon SCG disociadas a partir de ratas en el día 1-2 postnatal como se ha descrito previamente y se plaquearon en cubreobjetos de vidrio de 12 mm recubiertos con colágeno a una densidad de 0,8 SCG/cubreobjeto. Al día siguiente, los cultivos se inundaron con medio neurobasal suplementado con B27 (GIBCO), 20% glucosa, NGF (50 ng/ml) y 5-fluorodesoxiuridina (FUdR, 10 µM) y se mantuvieron en el medio durante 2-3 días adicionales con el fin de eliminar las células no neuronales que proliferaran. Los cultivos se cambiaron de nuevo a medio fresco sin FUdR y se mantuvieron hasta que los axones se extendieron fuera de la periferia de los cubreobjetos. Las células de Schwann se plaquearon en las neuronas y se mantuvieron en medio neurobasal con suplementos hasta que las células de Schwann poblaron los axones (aproximadamente 7-10 días). La mielinización se inició poniendo los cultivos en medio mielinizante como se describe para el co-cultivo de DRG-células de Schwann. Cuarenta días después, la mielinización se evaluó por inmunotinción para MBP.

Inmunoprecipitación y análisis por transferencia Western

40 Para preparar lisados celulares, se lavaron células de Schwann de rata 90-95% confluentes en placas de 60 mm o co-cultivos dos veces en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) y se lisaron en 300 µl de tampón de lisis enfriado en hielo (50 mM Tris HCl pH7,4, 1% NP-40, 0,25% desoxicolato de sodio, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 10 µg/ml leupeptina, 2 µg/ml aprotinina, 1 mM PMSF y 0,5 mM ortovanadato de sodio). Los lisados se aclararon por centrifugación durante 15 min a 14.000 rpm en frío y la concentración de proteínas de los sobrenadantes se determinó según las especificaciones del fabricante (Bio-Rad: Hercules, CA.). Para el análisis por transferencia Western, 50-70 µg de lisados de células de Schwann se fraccionaron por tamaño en geles de SDS-poliacrilamida al 10% y se transfirieron a membranas de PVDF. Después de bloquear en 5% de leche, las membranas se incubaron con anticuerpos primarios apropiados preparados en disolución de bloqueo. Después de incubar con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano, las bandas de proteínas se visualizaron por quimioluminiscencia aumentada. Para inmunoprecipitación, 500 µg de lisados de células de Schwann se incubaron con 0,6 µg de anticuerpo primario durante 3 horas a 4°C, después se incubaron con 50 µl de lechos de Sefarosa A durante 1 hora. Los lechos se lavaron 5 veces en el tampón de lisis y las proteínas unidas a los lechos se fraccionaron en geles de SDS-poliacrilamida y se sometieron a análisis por transferencia Western.

Tinción por inmunofluorescencia para MBP

55 Los cultivos de DRG-células de Schwann o SCG-células de Schwann se lavaron en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) después se fijaron en 4% paraformaldehído durante 20 minutos. Después de lavar con PBS, se permeabilizaron muestras en metanol enfriado en hielo durante 25 minutos y después de incubaron en disolución de bloqueo (5% suero de cabra normal+0,3% Tritón X) durante 1 hora a temperatura ambiente. Esto se siguió de

incubación con anticuerpo primario preparado en disolución de bloqueo toda la noche. Después de lavar con PBS, las muestras se incubaron con anticuerpo secundario anti-ratón de cabra conjugado con Alexa-488 durante 45 minutos. Los núcleos de las células se visualizaron por tinción con DAPI.

PCR cuantitativa en tiempo real

5 Análisis estadístico

El ANOVA de una vía se realizó usando el software de programación SAS con un nivel de significancia del 95%.

Resultados

La función inhibitoria de GGF2 en la mielinización está mediada por la activación de MAPK. Un estudio anterior ha mostrado que Nrg1 tipo II (GGF2), cuando se añadió a co-cultivos de células de Schwann-neuronas, inhibe la mielinización. También se ha reportado que la activación de la ruta Ras/Raf/MAPK inhibe la expresión génica asociada a mielina en células de Schwann, mientras la activación de la ruta PI3-quinasa estimula la mielinización, dando lugar a una noción de que el estado de mielinización de la célula de Schwann está determinado por el equilibrio entre las rutas PI3-quinasa y Ras/Raf/MAPK (Ogata et al. J Neurosci 2004; 24:6724-32). Los presentes inventores predijeron que si GGF2 actúa a través de la activación de MAPK para inhibir la mielinización, la inhibición de la activación de MAPK inducida por GGF2 revertiría el efecto inhibitorio sobre la mielinización. Para evaluar la posibilidad de que el efecto inhibitorio de GGF2 sobre la mielinización pudiera deberse a su capacidad de inducir una activación robusta de MAPK en células de Schwann, los presentes inventores usaron un sistema de cultivo de mielinización *in vitro* bien establecido en el que las células de Schwann se co-cultivan con neuronas del ganglio de la raíz dorsal (DRG) y se induce la mielinización de los axones asociados por la adición de ácido ascórbico al medio de cultivo. En primer lugar, para determinar el efecto de GGF2 sobre la activación de MAPK en los co-cultivos, se plaquearon células de Schwann primarias en neuronas DRG y se dejó que los axones se propagaran. Una vez los cultivos pararon de proliferar, los co-cultivos se estimularon con GGF2 a 0,6 nM. Veinte minutos después, se prepararon lisados celulares y se determinó la activación de MAPK por análisis de transferencia Western. En los co-cultivos control, hubo un nivel bajo de MAPK activo. Como se muestra en la Figura 1, el tratamiento con GGF2 incrementó adicionalmente el nivel de activación de MAPK. Para determinar si la activación de MAPK inducida por GGF2 podía bloquearse por tratamiento con U0126, un inhibidor farmacológico de MAPK quinasa, los co-cultivos se pre-trataron con concentraciones crecientes (0,5, 1, 3 y 10 μ M) de U0126 durante 30 minutos antes de la estimulación con GGF2 y estas concentraciones se mantuvieron en el medio de cultivo. Los cultivos control se trataron con el inhibidor en ausencia de tratamiento con GGF2. Tanto en los cultivos control como experimentales, la inhibición de MAPK mediada por U0126 fue dependiente de la concentración, como se indica por la disminución progresiva en los niveles de fosfo-MAPK. En los cultivos tratados con GGF2 y U0126 a una concentración de 1 μ M, el nivel de activación se redujo hasta el nivel basal, mientras a 10 μ M U0126, la activación de MAPK en el co-cultivo se suprimió completamente. El U0126 no tuvo efecto en la activación de la PI3 quinasa inducida por GGF2.

Con el fin de evaluar el efecto de la inhibición de MAPK sobre la mielinización, se trataron co-cultivos con GGF2 en presencia o ausencia de U0126 en el momento de iniciar la mielinización y se mantuvieron las mismas condiciones bajo la condición de mielinización descrita. Los cultivos control se dejaron sin tratar bajo la condición de mielinización descrita. Diez a once días después, los cultivos se fijaron y se inmunotizaron para proteína básica de mielina (MBP) para visualizar segmentos de mielina. En los cultivos tratados con GGF2, hubo una disminución marcada en el número de segmentos de mielina como se ha mostrado previamente, revelando el efecto inhibitorio de GGF2 sobre la mielinización. En los cultivos co-tratados con U0126, sin embargo, hubo un incremento dependiente de la dosis en la mielinización, indicando que el bloqueo de la activación de MAPK revirtió el efecto inhibitorio de GGF2.

GGF2 estimula la mielinización a concentraciones bajas: Aunque el nivel de activación de MAPK se incrementó de forma sostenida en células de Schwann tratadas con concentraciones crecientes de GGF2, los presentes inventores observaron que a concentraciones bajas por debajo de 0,01 μ M, aunque el nivel de activación de Akt se incrementó significativamente por encima del nivel basal, no hubo un nivel detectable de activación de MAPK. Si el estado de mielinización de una célula de Schwann está determinado por el equilibrio entre la activación de Akt y MAPK, los presentes inventores consideraron evaluar si el incremento en la activación de Akt en ausencia de actividad MAPK a estas concentraciones se correlaciona con un efecto positivo sobre la mielinización. Para investigar esta potencialidad, se trataron co-cultivos con GGF2 a concentraciones que variaron de 0,0005 y 0,03 nM en el momento del inicio de la mielinización. Los cultivos se fijaron posteriormente e inmunotizaron para MBP. Como se predice sobre la base de los presentes descubrimientos, hubo un incremento en el nivel de mielinización en los cultivos tratados con dosis bajas de GGF2, que variaron de 0,0005 a 0,01 nM, comparado con los cultivos control no tratados. Cuando se cuantificó, el resultado demostró que hubo un incremento dependiente de la dosis en el número de segmentos de mielina (Figura 2): un incremento de 1,9, 2,7, y 3,5 veces en la mielinización respecto al nivel control, a 0,0005, 0,001 y 0,01 nM GGF2, respectivamente. A 0,03 nM, hubo una disminución drástica en el nivel de mielinización hasta un nivel cercano a, o ligeramente por debajo de, los cultivos control. Los incrementos posteriores en la cantidad de GGF2 resultaron en disminuciones adicionales en la mielinización. La mielinización respondedora a GGF2 se inhibió completamente a 0,6 nM GGF2. Esta concentración se correspondía con la aparición de MAPK activo en los co-cultivos como se muestra en la Figura 1. Estos resultados sugieren que GGF2 juega papeles duales

durante la mielinización: uno que estimula y el otro que inhibe la mielinización, y las dos funciones opuestas están determinadas por la dosificación de GGF2 presentada a las células de Schwann.

Las funciones opuestas de GGF2 están mediadas por la activación de Mek/Erk: Para investigar adicionalmente las funciones opuestas de GGF2, se realizaron experimentos adicionales. Los estudios previos han implicado Ras/Raf/Erk y PI-3 quinasa, respectivamente, como reguladores negativos y positivos de la mielinización, sugiriendo que un equilibrio entre los dos se correlaciona con el estado de mielinización de las células de Schwann. Para delinear adicionalmente los estados de activación de las rutas inducidas por GGF2, se trataron co-cultivos con proteína GGF2 soluble a 1 nM. Los presentes inventores determinaron que, a esta concentración, GGF2 inhibía eficazmente la mielinización. Se prepararon lisados celulares 30 minutos después del tratamiento con GGF2 y la presencia de las proteínas fosforiladas se determinó por análisis por transferencia Western (Figura 3A). A 1 nM (Figura 3A, carriles encuadrados) GGF2 incrementó la activación de Akt por encima del nivel basal. También se observó un incremento en la activación de Erk en los cultivos tratados con GGF2 a esta concentración. Se mostró que las concentraciones de GGF2 tan bajas como 0,6 nM eran suficientes para la activación de Erk en los cultivos tratados con GGF2.

Para corroborar los resultados anteriores e investigar adicionalmente la relación correlativa entre la activación de Erk y el efecto inhibidor de GGF sobre la mielinización, se realizaron experimentos adicionales. De acuerdo con esto, se trataron co-cultivos con GGF2 junto con concentraciones crecientes de U0126, el inhibidor específico de la ruta Mek1/Erk descrito anteriormente. Los análisis por transferencia Western presentados en la Figura 3B muestran que U0126 inhibió la activación de Erk inducida por GGF2 de una manera dependiente de la dosificación mientras no tuvo efecto en la activación de Akt. El nivel bajo de actividad endógena de Erk observado normalmente en el sistema de co-cultivo también disminuyó con el tratamiento del fármaco.

Los presentes inventores evaluaron además el efecto de la inhibición de Mek1/Erk sobre la mielinización. Como se muestra en las Figuras 3C y 3D, la adición de GGF2 a concentración alta inhibió la mielinización casi completamente en los co-cultivos. En los cultivos co-tratados con U0126, sin embargo, el efecto inhibidor de GGF2 se revirtió, como se indica por el incremento dependiente de la dosificación en el nivel de mielinización (Figuras 3C y 3D). Este resultado proporciona una evidencia directa de que el efecto inhibidor de GGF2 sobre la mielinización está mediado por la activación de Erk. De forma interesante, el tratamiento con U0126 en co-cultivos en ausencia de GGF2 también resultó en un incremento en el nivel de mielinización (Figura 3E), lo que indica que la actividad endógena de Mek1/Erk funciona como un regulador negativo intrínseco de la mielinización.

El análisis por transferencia Western en lisados preparados a partir de co-cultivos también reveló que el tratamiento con GGF2 incrementó la expresión de la proteína c-Jun, un regulador negativo de la diferenciación y mielinización de las células de Schwann. La inhibición posterior de la actividad de Mek1/Erk inducida por GGF2 reguló a la baja los niveles de c-Jun, lo que a su vez estuvo acompañado de un incremento en la expresión de la proteína mielina. A diferencia del efecto sobre c-Jun, el tratamiento con U0126 resultó en un incremento en la expresión de Krox20 en los co-cultivos. Esto está de acuerdo con un reporte reciente que sugiere una relación antagonista cruzada entre c-Jun y Krox20 en la regulación de la mielinización (Parkinson et al, 2008, Journal of Cell Biology 181:625-637).

GGF2 estimula la mielinización de las células de Schwann: Para corroborar y extender los resultados presentados en la presente memoria y evaluar adicionalmente las funciones opuestas de GGF2, los presentes inventores evaluaron el efecto dependiente de concentración de GGF2 en la activación de Ras/Raf/Erk y PI3-quinasa en células de Schwann. Las células se trataron con varias concentraciones de GGF2 que variaron de 0,0003 a 10 nM y se determinó el nivel de activación de Erk y Akt por análisis por transferencia Western. Las imágenes y el incremento relativo en los niveles de activación se presentan en las Figuras 4A y 4B. El nivel de Akt activo se incrementó de forma sostenida empezando a la dosis más baja ensayada, mientras la activación de Erk requirió concentraciones más altas de GGF2. La activación diferencial de las dos rutas a concentraciones bajas, como resultado, generó una ventana estrecha de dosis (0,003 a 0,01 nM, encuadrada en la Figura 4B) en la que Akt fue la ruta predominante activada en respuesta a GGF2. A continuación, se determinó el efecto de varias dosis de GGF2 en la mielinización en el sistema de co-cultivo. A la ventana de concentración baja, GGF2 incitó un efecto promielinizante dependiente de la dosificación: 1,5, 2,3, 2,2 y 2,8 veces de incremento en la mielinización comparado con los cultivos control a 0,0005, 0,001, 0,003 y 0,01 nM de GGF2, respectivamente (Figura 4C). Al incrementarse más la concentración, GGF2 empezó a inhibir la mielinización, coincidiendo con la aparición de activación de Erk. El efecto promielinizante de GGF2 también se demostró en co-cultivos CRD-Nrg1^{+/-} en los que dosis bajas de GGF2 rescataron el defecto de mielinización en los axones mutantes (Figura 4D).

La Nrg1 soluble puede tanto estimular como inhibir la mielinización: elección binaria determinada por la concentración: En el sistema nervioso periférico (SNP), GGF2 se ha considerado como una isoforma de Nrg1 asociada con la respuesta al daño de las células de Schwann. La expresión ectópica *in vivo* de GGF-β3 en células de Schwann mielinizantes estimula la proliferación celular e induce la desmielinización (Huijbregts et al. J Neurosci 2003; 23:7269-80). Además, se ha mostrado que la adición de concentraciones altas de GGF2 (por ejemplo, aquellas que superan 0,25 nM GGF2) a co-cultivos de células de Schwann-neuronas DRG inhibe la mielinización (Zanazzi et al. J Cell Biol 2001; 152:1289-99). Así, un resultado inesperado del presente estudio fue el descubrimiento de que, a concentración baja, GGF2 presenta efectos estimuladores de la mielinización. El efecto promielinizante estuvo, sin embargo, limitado a un intervalo de concentración baja y un incremento en la

concentración de GGF2 a partir de este intervalo resulta en la inhibición de la mielinización como se ha descrito previamente. Éste es un descubrimiento intrigante ya que demuestra que el GGF2 soluble puede incitar dos funciones biológicas contrarias bajo el mismo contexto celular solamente sobre la base de la cantidad presentada a la célula. También sugiere que los niveles umbral de GGF2 determinan la función promielinizante e inhibidora durante la mielinización. Como se demuestra por primera vez en el presente estudio, esto puede explicarse por una activación diferencial dependiente de concentración de los efectores de señalización aguas abajo del receptor. Más específicamente, los presentes datos muestran que la función promielinizante de GGF2 se observa a concentraciones que preferentemente activan Akt, mientras la transición en el papel inhibidor a concentraciones más altas coincide con la aparición de la activación de Erk a pesar del incremento continuo en el nivel de Akt activo. Este resultado también apoya la moción previa de que el equilibrio entre la activación de PI3-quinasa y Ras/Raf/Erk es crucial para determinar el estado de mielinización en las células de Schwann (Ogata et al. J Neurosci 2004; 24:6724-32). Los presentes descubrimientos, sin embargo, proporcionan una evidencia directa de que la activación de la ruta Ras/Raf/Erk funciona como un regulador negativo de la mielinización.

La función inhibidora de Nrg1 en la mielinización está mediada a través de la activación de Erk/Mek1: El papel inhibidor de la ruta Ras/Raf/Erk en la mielinización se ha sugerido previamente por estudios en los que la expresión de Mek1 constitutivamente activo en células de Schwann bloquea la expresión del gen de mielina inducida por forskolina, mientras Ras negativo dominante bloquea la regulación a la baja del gen de mielina inducida por Nrg1. Su efecto directo en la mielinización, sin embargo, no se había elucidado antes de los presentes resultados. Como se demuestra en la presente memoria, GGF2, cuando se usa por encima de una concentración umbral, inhibe la mielinización en los co-cultivos. Los presentes inventores muestran en la presente memoria que la inhibición de la activación de Mek1/Erk1 restauró la mielinización en co-cultivos tratados con GGF2, demostrando que el papel inhibidor de GGF2 estaba mediado a través de su activación de Ras/Raf/Erk1. El mecanismo por el que la activación de Mek1/Erk inhibe la mielinización no está claro. Un posible mecanismo incluye la supresión de la expresión del gen de mielina como se ha descrito previamente. Apoyando esta sugerencia, los presentes datos revelaron que un incremento en la mielinización en cultivos tratados con U0126 estaba acompañado por un incremento en la expresión de P0. También es posible que la ruta Mek1/Erk pudiera modular la expresión de factores de transcripción implicados en la mielinización o diferenciación de las células de Schwann. Recientemente, se ha mostrado que la expresión ectópica de c-Jun en células de Schwann inhibe la mielinización, sugiriendo así que c-Jun funciona como un regulador negativo del programa de mielina. Los presentes descubrimientos son consistentes con esta conclusión ya que los presentes inventores determinaron que el tratamiento con GGF2 que inhibe la mielinización está acompañado de la inducción de c-Jun y, además, la inhibición de la actividad de Mek1/Erk1 inducida por Nrg1 bloquea la expresión de c-Jun. Este resultado sugiere que la función inhibidora de Mek1/Erk1 en la mielinización está mediada, en parte, a través de la inducción de c-Jun.

Otro descubrimiento interesante del presente estudio es la presencia de una señal dependiente de Mek1/Erk intrínseca en los co-cultivos que sirve como un regulador negativo de la mielinización. Esto se mostró en un experimento en el que el tratamiento de co-cultivos con mielinización normal con U0126 estimuló la mielinización. La naturaleza de la señal que contribuye a la actividad de Mek1/Erk1 durante la mielinización se desconoce actualmente, aunque probablemente es axonal en origen, independiente del CRD-Nrg1 axonal. Los candidatos posibles son Ig-Nrg1 tipo I y II que son expresados por las neuronas del SNP y posteriormente se liberan de la membrana axonal por escisión proteolítica. Otro posible activador de Mek1/Erks es FGF-2, que es expresado en neuronas del SNP y cuyo receptor es expresado en células de Schwann. El tratamiento con FGF-2 regula a la baja la expresión del gen de mielina e inhibe la mielinización in vitro. La pérdida de la expresión de FGF-2 resulta en un incremento en el número de axones mielinizantes durante la regeneración del nervio ciático. Las neuronas periféricas también expresan PDGF e IGF, con las tirosinas quinasas de receptor correspondientes expresadas en las células de Schwann asociadas. Sería muy interesante evaluar el papel regulador de estos factores de crecimiento durante la mielinización del SNP.

Uso terapéutico de GGF2: El trasplante experimental ha proporcionado pruebas aplastantes del potencial de reparación de nervios dañados por trasplante de células gliales mielinizantes. Las células de Schwann son buenos candidatos para dicha terapia ya que se expanden fácilmente en cultivo y ofrecen la posibilidad de trasplante autólogo para estimular la remielinización y restauración de la conducción nerviosa en las lesiones desmielinizadas no sólo en el SNP sino también en el SNC. La remielinización por células de Schwann en axones adultos que se regeneran, sin embargo, es frecuentemente incompleta resultando en la formación de vainas de mielina más delgadas e internodos más cortos comparado con los nervios normales. Por lo tanto, la presente demostración de la función promielinizante de GGF2 y la capacidad para evitar el impedimento inadvertido de la mielinización debido a los niveles de dosis de GGF2 es significativa ya que proporciona una estrategia terapéutica para el tratamiento de enfermedades desmielinizantes así como para reconstruir la mielina después de una lesión nerviosa.

Aunque la invención se ha descrito en conexión con realizaciones específicas de ésta, se entenderá que es susceptible de modificaciones adicionales y que esta solicitud se pretende que abarque cualesquiera variaciones, usos, o adaptaciones de la invención siguiendo, en general, los principios de la invención e incluyendo que dichas desviaciones de la presente descripción vienen de la práctica conocida o habitual en la técnica a la que pertenece la invención y pueden aplicarse a las características esenciales mostradas anteriormente en la presente memoria, y siguen en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Lista de secuencias

<110> Kim, Haesun Caggiano, Anthony

<120> MÉTODO PARA CONSEGUIR NIVELES PLASMÁTICOS DESEADOS DE FACTOR DE CRECIMIENTO GLIAL 2

5 <130> ACOR.P0038WO

<140> PCT/US2009/001356

<141> 2009-03-02

<150> 61/067,589

<151> 2008-02-29

10 <160> 14

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 2003

<212> DNA

15 <213> Homo sapiens

<400> 1

```

ggaattcctt tttttttttt ttttttttct rrtttttttt tggccttata cctcttcgcc 60
tttctgtggt tccatccact tcttcccctt cctcctcca taacaactc tcctaccctt 120
gcaccccaa taaataaata aaaggaggag ggcaaggggg gaggaggagg agtgggtgctg 180
cgaggggaag gaaaaggag gcagcgcgag aagagccggg cagagtccga accgacagcc 240
agaagcccg cgcacactcg caccatgaga tggcgcgag ccccgcccg ctccggcggt 300
cccggcccc ggcccagcg ccccggtcc gcccccgct cgtcgccgc gctgcccgtg 360
ctgccactac tgctgtgct ggggaccgag gccctggcgc cggggggcgg ggccggcaac 420
gaggcggctc agcggggggc ctcggtgtgc tactcgtccc cgcccagcgt gggatcgggt 480
caggagctag ctacgcgag cgcggtgtgc atcgagggaa aggtgcacc gcagcggcg 540
cagcaggggg cactcgacag gaaggcggcg gcggcggcgg gcgaggcagg ggcgtggggc 600
ggcgcgcgag agccgccagc cgcgggccca cggcgctgg ggccgccgc cgaggagccg 660
ctgctcgccg ccaacgggac cgtgccctct tggcccacc ccccggtgcc cagcgcggc 720
gagcccgggg aggagggcgc ctatctggtg aaggtgcacc aggtgtgggc ggtgaaagcc 780
gggggcttga agaaggactc gctgctacc gtgcgctgg ggacctggg ccacccgcc 840
ttcccctcct gcgggaggct caaggaggac agcaggtaca tcttcttcat ggagcccgc 900
gccaacagca ccagccgagc gccggccgc ttccgagcct cttcccccc tctggagagc 960
ggccggaacc tcaagaagga ggtcagccgc gtgctgtgca agcgggtgc cttgcctccc 1020
caattgaaag agatgaaaag ccaggaatcg gctgcagggt ccaaactagt ccttcgggtg 1080
gaaaccagtt ctgaatactc ctctctcaga ttcaagtgg tcaagaatgg gaatgaattg 1140
aatcgaaaaa acaaacacaa aaatatcaag atacaaaaaa agccagggaa gtcagaactt 1200
cgcattaaca aagcatcact ggctgattct ggagagtata tgtgcaaagt gatcagcaaa 1260
ttaggaaatg acagtgcctc tgccaatatc accatcgtgg aatcaaacgc tacatctaca 1320
tccaccactg ggacaagcca tcttgtaaaa tgtcgggaga aggagaaaac tttctgtgtg 1380
aatggagggg agtgcttcat ggtgaaagac ctttcaaacc cctcgagata cttgtgcaag 1440
tgcccaaatg agtttactgg tgatcgctgc caaaactacg taatggccag cttctacagt 1500
acgtccactc ctttctgtc tctgcctgaa taggagcatg ctcagttgg gctgtttct 1560
tgttgctgca tctcccctca gattccact agagctagat gtgtcttacc agatctaata 1620
ttgactgcct ctgcctgtcg catgagaaca ttaacaaaag caattgtatt acttctctg 1680
ttcgcgacta gttggctctg agatactaat aggtgtgtga ggctccggat gtttctggaa 1740
ttgatattga atgatgtgat acaaatgat agtcaatatc aagcagtgaa atatgataat 1800
aaaggcattt caaagtctca cttttattga taaaataaaa atcattctac tgaacagtcc 1860
atcttcttta tacaatgacc acatcctgaa aaggggtgtg ctaagctgta accgatatgc 1920
acttgaatg atggtaagtt aattttgatt cagaatgtgt tatttgtcac aaataaacat 1980
aataaaagga aaaaaaaaaa aaa 2003

```

<210> 2

<211> 422

20 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Arg Trp Arg Arg Ala Pro Arg Arg Ser Gly Arg Pro Gly Pro Arg

ES 2 613 177 T3

1 Ala Gln Arg Pro 5 Gly Ser Ala Ala 10 Arg Ser Ser Pro Pro 15 Leu Pro Leu
 Leu Pro Leu 20 Leu Leu Leu Gly Thr Ala Ala Leu Ala Pro Gly Ala
 Ala Ala 35 Gly Asn Glu Ala Ala Pro Ala Gly Ala Ser Val Cys Tyr Ser
 Ser Pro Pro Ser Val 55 Gly Ser Val Gln Glu Leu Ala Gln Arg Ala Ala
 65 Val Val Ile Glu 70 Gly Lys Val His Pro Gln Arg Arg Gln Gln Gly Ala
 Leu Asp Arg Lys 85 Ala Ala Ala Ala Ala Gly Glu Ala Gly Ala Trp Gly
 Gly Asp Arg Glu 100 Pro Pro Ala Ala Gly Pro Arg Ala Leu Gly Pro Pro
 Ala Glu 115 Pro Leu Leu Ala Ala Asn Gly Thr Val Pro Ser Trp Pro
 Thr Ala 130 Pro Val Pro Ser Ala Gly Glu Pro Gly Glu Glu Ala Pro Tyr
 145 Leu Val Lys Val 150 His Gln Val Trp Ala Val Lys Ala Gly Gly Leu Lys
 Lys Asp Ser 165 Leu Leu Thr Val Arg Leu Gly Thr Trp Gly His Pro Ala
 Phe Pro Ser 180 Cys Gly Arg Leu Lys 200 Glu Asp Ser Arg Tyr Ile Phe Phe
 Met Glu 210 Pro Asp Ala Asn Ser Thr Ser Arg Ala Pro Ala Ala Phe Arg
 Ala Ser Phe Pro Pro 230 Leu Glu Thr Gly Arg Asn Leu Lys Lys Glu Val
 Ser Arg Val Leu 245 Cys Lys Arg Cys Ala Leu 250 Pro Pro Gln Leu Lys Glu
 Met Lys Ser 260 Gln Glu Ser Ala Ala Gly Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys
 Glu Thr Ser 275 Ser Glu Tyr Ser Ser 280 Leu Arg Phe Lys Trp Phe Lys Asn
 Gly Asn 290 Glu Leu Asn Arg Lys Asn Lys Pro Gln Asn Ile Lys Ile Gln
 Lys Lys Pro Gly Lys Ser 310 Glu Leu Arg Ile Asn Lys Ala Ser Leu Ala
 Asp Ser Gly Glu Tyr 325 Met Cys Lys Val Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp
 Ser Ala Ser 340 Ala Asn Ile Thr Ile Val Glu Ser Asn Ala Thr Ser Thr
 Ser Thr Thr 355 Gly Thr Ser His Leu 360 Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys
 Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser
 370 Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp
 385 Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro
 Phe Leu Ser Leu Pro Glu 405 Val Met Ala Ser Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro
 420

<210> 3
 <211> 198
 5 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 agccatcttg tcaagtgtgc agagaaggag aaaactttct gtgtgaatgg aggcgagtg 60
 ttcattggtga aagaccttc aaatccctca agatacttgt gcaagtgcc aaatgagttt 120
 actggtgatc gctgcaaaa ctacgtaatg gccagcttct acagtacgct cactcccttt 180
 ctgtctctgc ctgaatag 198

<210> 4
 10 <211> 65
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 613 177 T3

<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
 5 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

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

<210> 6
 10 <211> 63
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

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

15 <210> 7
 <211> 183
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 agccatcttg tcaagtgtgc agagaaggag aaaactttct gtgtgaatgg aggcgagtgc 60
 ttcattggtga aagaccttc aaatccctca agatacttgt gcaagtgcc aaatgagttt 120
 actggtgatc gctgccaaa ctacgtaatg gccagcttct acaaagcggg gagctctac 180
 20 taa 183

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

25 <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> DNA
 30 <213> Homo sapiens

ES 2 613 177 T3

<400> 9
 agccatcttg tcaagtgtgc agagaaggag aaaactttct gtgtgaatgg aggcgagtgc 60
 ttcattggtga aagacctttc aaatccctca agatacttgt gcaagtgcc aaatgagttt 120
 actggagcga gatgtactga gaatgtgcc atgaaagtcc aaaccaaga aaagtgccca 180
 tttatggaga aagcggagga gctctactaa 210

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

5

<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> DNA
 <213> Homo sapiens

10

<400> 11
 agccatcttg tcaagtgtgc agagaaggag aaaactttct gtgtgaatgg aggcgagtgc 60
 ttcattggtga aagacctttc aaatccctca agatacttgt gcaagtgcc acctggattc 120
 actggagcga gatgtactga gaatgtgcc atgaaagtcc aaaccaaga aaagtgccca 180
 aatgagttta ctggatgatc ctgcaaaaac tacgtaatgg ccagcttcta cagtacgtcc 240
 actccctttc tgtctctgcc tgaatag 267

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

15

<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

20

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

<400> 13
 agccatcttg tcaagtgtgc agagaaggag aaaactttct gtgtgaatgg aggcgagtgc 60
 ttcattggtga aagacctttc aaatccctca agatacttgt gcaagtgcc acctggattc 120
 actggagcga gatgtactga gaatgtgcc atgaaagtcc aaaccaaga aaagtgccca 180
 aatgagttta ctggatgatc ctgcaaaaac tacgtaatgg ccagcttcta caaagcggag 240
 gagctctact aa 252

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

30

ES 2 613 177 T3

<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													

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido que contiene un dominio EGFL de GGF2, para uso con un inhibidor de la ruta Mek1/Erk en el tratamiento de un paciente afligido con una enfermedad o trastorno asociado con niveles reducidos de mielinización, en el que el inhibidor de la ruta Mek1/Erk se selecciona del grupo que consiste en Arctigenina, PD 98059, SB202190, SB203580, SP600125, U0126, tipifarnib (Zarnestra®), sorafenib, ISIS 5132, Cl.1040, y PD 0325901.
- 10 2. El polipéptido, para uso según la reivindicación 1, en el que la enfermedad o trastorno asociado con niveles reducidos de mielinización se selecciona de síndrome de Guillain-Barre, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, desmielinización periférica debida a lesión traumática, esclerosis múltiple, neuritis óptica, desmielinización central debida a lesión traumática, mielitis transversal, leucoencefalopatía multifocal progresiva, enfermedad de Devic (neuromielitis óptica), encefalomielitis diseminada aguda, adrenoleucodistrofia y adrenoleuconeuropatía.
- 15 3. El polipéptido, para uso según la reivindicación 2, en el que la enfermedad o trastorno asociado con niveles reducidos de mielinización es desmielinización periférica debida a lesión traumática.
- 15 4. El polipéptido, para uso según la reivindicación 2, en el que la enfermedad o trastorno asociado con niveles reducidos de mielinización es desmielinización central debida a lesión traumática.
- 15 5. El polipéptido, para uso según la reivindicación 2, en el que la enfermedad o trastorno asociado con niveles reducidos de mielinización es neuritis óptica.
- 20 6. El polipéptido, para uso según la reivindicación 2, en el que la enfermedad o trastorno asociado con niveles reducidos de mielinización es esclerosis múltiple.
- 20 7. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido que contiene un dominio EGFL de GGF2 y un inhibidor de la ruta Mek1/Erk para uso en el tratamiento de un paciente afligido con una enfermedad o trastorno asociado con niveles reducidos de mielinización, en el que el inhibidor de la ruta Mek1/Erk se selecciona del grupo que consiste en Arctigenina, PD 98059, SB202190, SB203580, SP600125, U0126, tipifarnib (Zarnestra®), sorafenib, ISIS 5132, Cl.1040, y PD 0325901.
- 25 8. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 7, en el que la enfermedad o trastorno asociado con niveles reducidos de mielinización se selecciona de síndrome de Guillain-Barre, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, desmielinización periférica debida a lesión traumática, esclerosis múltiple, neuritis óptica, desmielinización central debida a lesión traumática, mielitis transversal, leucoencefalopatía multifocal progresiva, enfermedad de Devic (neuromielitis óptica), encefalomielitis diseminada aguda, adrenoleucodistrofia y adrenoleuconeuropatía.
- 30 9. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 8, en el que la enfermedad o trastorno asociado con niveles reducidos de mielinización es desmielinización periférica debida a lesión traumática.
- 30 10. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 8, en el que la enfermedad o trastorno asociado con niveles reducidos de mielinización es desmielinización central debida a lesión traumática.
- 35 11. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 8, en el que la enfermedad o trastorno asociado con niveles reducidos de mielinización es neuritis óptica.
- 35 12. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 8, en el que la enfermedad o trastorno asociado con niveles reducidos de mielinización es esclerosis múltiple.

Figura 1

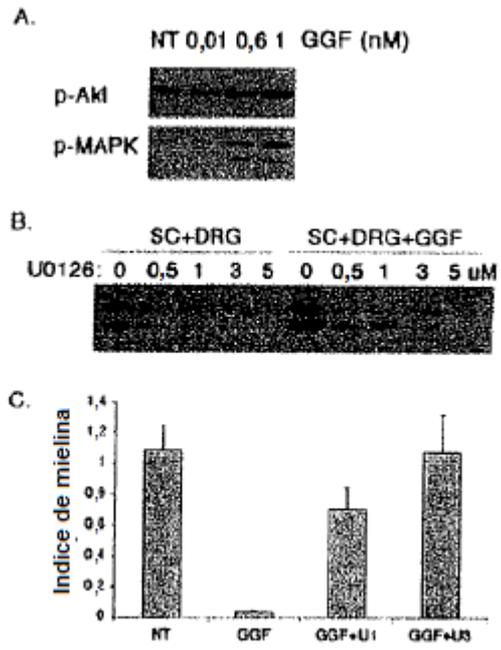


Figura 2

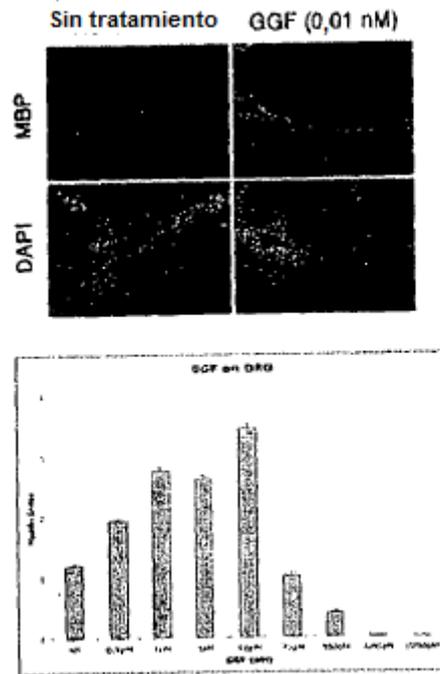


Figura 3

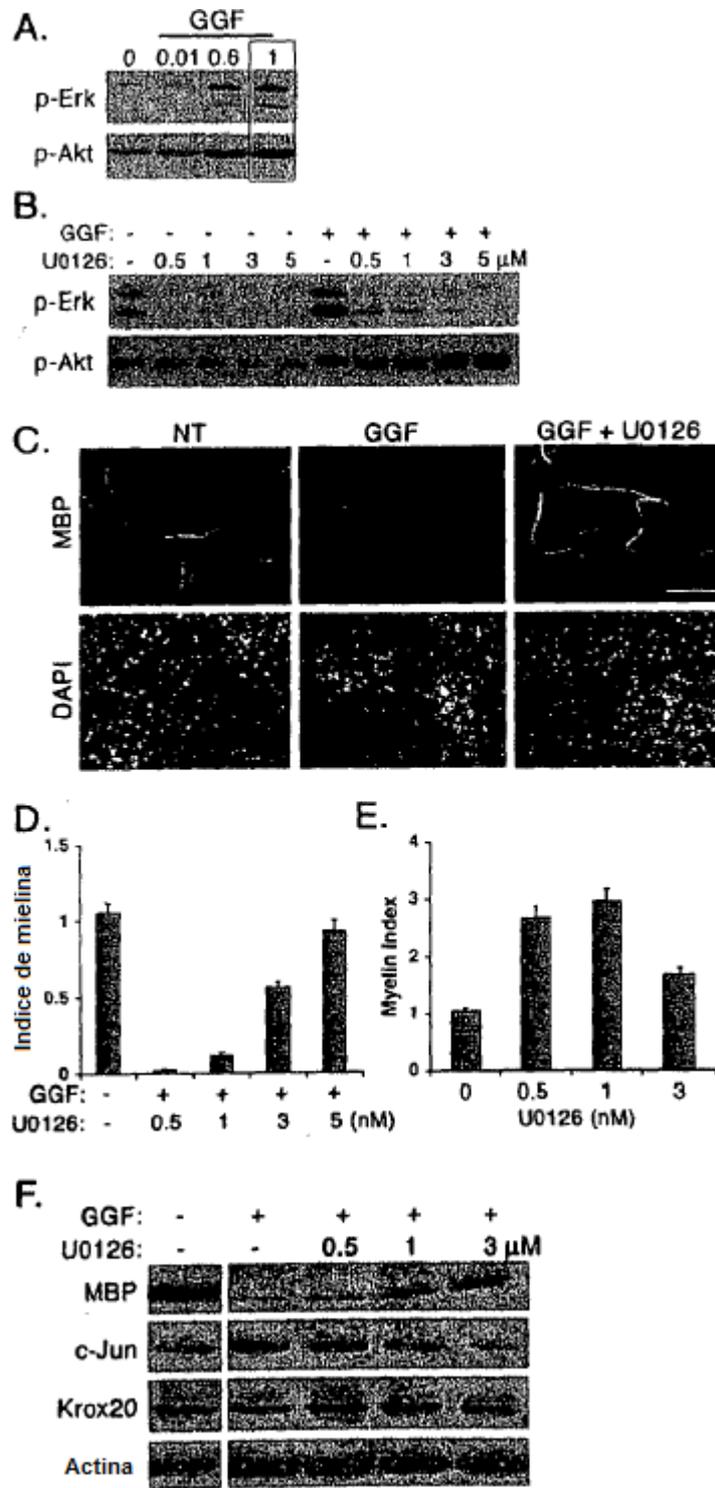


Figura 4

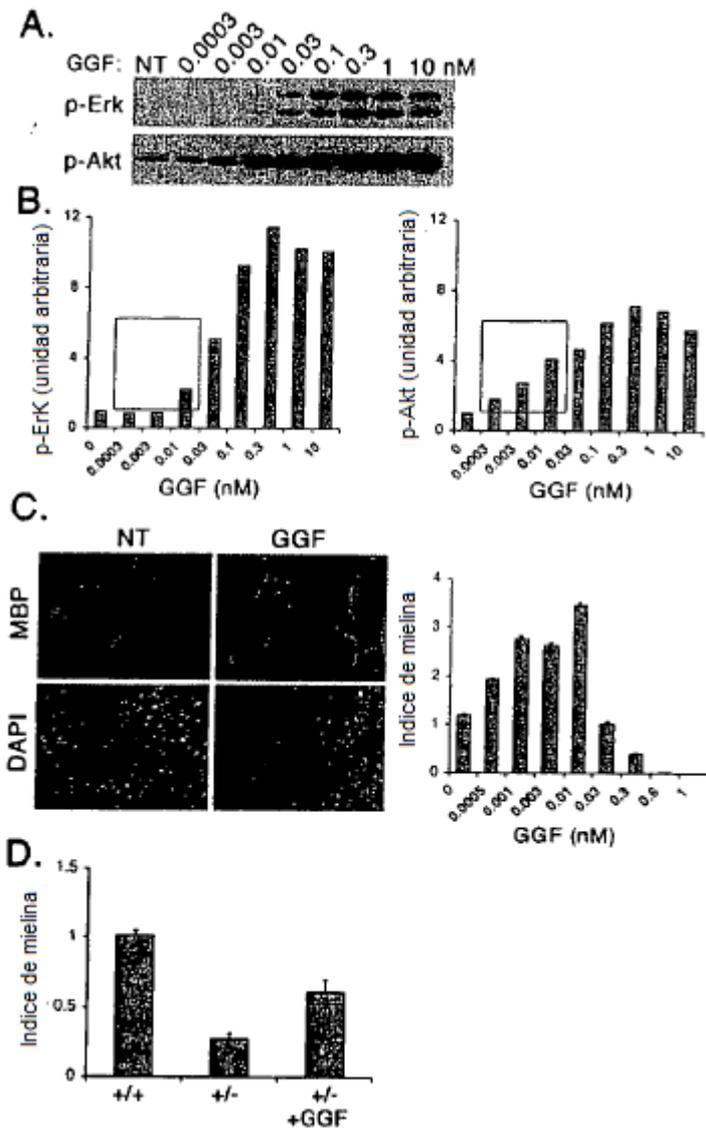


Fig. 5A

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

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

Fig. 5B

Secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos deducida de GGF2HBS5

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

Fig. 5C

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

CGC GCG CCG GCC GCC TTC CGA GCC 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
AGA TTC AAG TGG TTC AAG AAT GGG AAT GAA TTG AAT CGA AAA AAC AAA Arg Phe Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu Asn Arg Lys Asn Lys	1155
CCA CAA AAT ATC AAG ATA CAA AAA AAG CCA GGG AAG TCA GAA CTT CGC Pro Gln Asn Ile Lys Ile Gln Lys Lys Pro Gly Lys Ser Glu Leu Arg	1203
ATT AAC AAA GCA TCA CTG GCT GAT TCT GGA GAG TAT ATG TGC AAA GTG 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 Lyx GGF-II 12	1251
ATC AGC AAA TTA GGA AAT GAC AGT GCC TCT GCC AAT ATC ACC ATC GTG Ile Ser Lys Lys Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr Ile Val	1299
GAA TCA AAC GCT ACA TCT ACA TCC ACC ACT GGG ACA AGC CAT CTT GTA Glu Ser Asn Ala Thr Ser Thr Ser Thr Thr Gly Thr Ser His Leu Val	1347

Fig. 5.D

Secuencia de nucleótidos y secuencia de aminoácidos deducida de **GGF2HB5**

AAA TGT GCG GAG AAG GAG AAA ACT TTC TGT GTG 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 Gln 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 TGTGTGCGCA TCTCCCTCA GATCCACCT	1590
AGAGCTAGAT GTGTCTTACC AGATCTAATA TTGACTGCCT CTGCCCTGTCG CATGAGAACA	1650
TTAACAAAAG CAATTGTATT ACTTCCCTCTG TTCGCGACTA GTTGGCTCTG AGATACTAAT	1710
AGGTGTGTGA GGCTCCGGAT GTTTCTGGAA TTGATATTGA ATGATGTGAT ACAAAATTGAT	1770
AGTCAATATC AAGCAGTGAA ATATGATAAT AAAGGCATTT CAAAGTCTCA CTTTATTGA	1830
TAAAATAAAA ATCATTCTAC TGAACAGTCC ATCTTCTTTA TACAATGACC ACATCCTGAA	1890
AAGGGTGTG CTAAGCTGTA ACCGATATGC ACTTGA AATG ATGGTAAAGTT AATTTTGATT	1950
CAGAATGTGT TATTTGTAC AAATAAACAT AATAAAAGGA AAAAAA AAA	2003

Fig. 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 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 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	

Fig. 7

EGFL2

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

Fig. 8

EGFL3

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

 GGA GGC GAG TGC TTC ATG 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 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

Fig. 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	Leu	Tyr											

Fig. 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	

Fig. 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	GCC	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	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														

ES 2 613 177 T3

ARN							
Tamaño	2.224 pb						
Transcritos	número de transcritos	9	tipo	mensajero			
texto	otras formas alternativas						
Identificación	principal	tipo	pb	producto			
				kDa	AA	expresado en	autor
HRG-gamma, NRG1 tipo 1	-	corte y empalme	1.651	-	211	-	Holmes
	-						
GGF2, NRG1 tipo 2	-	corte y empalme	1.986	-	422	sistema nervioso, músculo esquelético	Marchionni, Holmes
	forma soluble						
SMDF, NRG1 tipo 3	-	corte y empalme	1.860	31,6	296	en el sistema nervioso, médula espinal, motoneurona, pulmón fetal, hígado, riñón	Holmes, Michailov
	un dominio semejante a EGF C terminal y una única secuencia N terminal que carece de un dominio semejante a Ig, dominio rico en cisteína (CRD)						
HRG-alfa, NRG1 tipo 1	sí	corte y empalme	2.224	70,2	640	mama, ovario, testículo, próstata, corazón, músculo	Holmes, Michailov
	-						
HRG-beta 1, NRG1 tipo 1	-	corte y empalme	2.199	-	645	neuronal	Holmes
	-						
HRG-beta 2, NRG1 tipo 1	-	corte y empalme	2.490	-	637	-	Holmes
	-						
HRG-beta 3, NRG1 tipo 1	-	corte y empalme	1.715	-	241	cerebro, médula espinal	Marchionni, Holmes
	puede ser una isoforma nuclear						
HRG-NDF43, NRG1 tipo 1	-	corte y empalme	1.793	-	462	-	Wen, Holmes
	-						
GGF, NRG1 tipo 2	-	corte y empalme	1.199	-	241	sistema nervioso, músculo esquelético	Marchionni, Holmes
	dominio semejante a inmunoglobulina y semejante a EGF y una secuencia semejante a kringle						

Figura 12