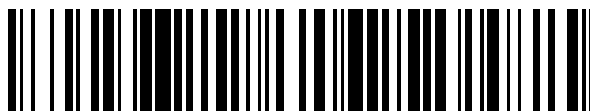


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 184**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2009** E 17209369 (2)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2019** EP 3338791

54 Título: **Dosificación terapéutica de una neurregulina en el tratamiento o profilaxis de la insuficiencia cardíaca**

30 Prioridad:

17.07.2008 US 135171 P

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

27.05.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 763 184 T3

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

DESCRIPCIÓN

Dosificación terapéutica de una neurregulina en el tratamiento o profilaxis de la insuficiencia cardíaca

Campo de la invención

5 El campo de la invención se refiere al tratamiento de la insuficiencia cardíaca. Más específicamente, la invención se dirige a un régimen de dosificación mejorado mediante el cual los beneficios terapéuticos de la administración de una neurregulina, como el factor de crecimiento glial 2 (GGF2) o un fragmento del mismo, se mantienen y/o mejoran, mientras se minimizan los posibles efectos secundarios.

Antecedentes de la invención

10 Un desafío fundamental asociado con la administración de fármacos a pacientes que lo necesitan es la relación entre tolerabilidad y eficacia. El índice terapéutico es el rango dentro del cual se puede administrar una dosis eficaz de una sustancia a un paciente y una dosis a la que se observan efectos secundarios no deseados en el paciente. Generalmente, cuanto mayor es la diferencia entre la dosis eficaz y la dosis a la que se inician los efectos secundarios, más benigna es la sustancia y es más probable que el paciente la tolere.

15 La insuficiencia cardíaca, particularmente la insuficiencia cardíaca congestiva (ICC), una de las principales causas de muerte en los países industrializados. Los factores que subyacen a la insuficiencia cardíaca congestiva incluyen presión arterial alta, cardiopatía isquémica, exposición a compuestos cardiopáticos como los antibióticos de antraciclina, exposición a la radiación, trauma físico y defectos genéticos asociados con un mayor riesgo de insuficiencia cardíaca. Por lo tanto, la ICC a menudo resulta de una mayor carga de trabajo en el corazón debido a la hipertensión, daño al miocardio por isquemia crónica, infarto de miocardio, enfermedad viral, toxicidad química, radiación y otras enfermedades como la esclerodermia. Estas condiciones resultan en una disminución progresiva en la capacidad de bombeo del corazón. Inicialmente, el aumento de la carga de trabajo que resulta de la presión arterial alta o la pérdida de tejido contráctil induce hipertrofia compensatoria de cardiomiocitos y engrosamiento de la pared ventricular izquierda, lo que mejora la contractilidad y mantiene la función cardíaca. Con el tiempo, sin embargo, la cámara ventricular izquierda se dilata, la función de la bomba sistólica se deteriora, los cardiomiocitos sufren muerte celular apoptótica y la función miocárdica se deteriora progresivamente.

20

25

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

40 Los cuatro genes NRG, NRG-1, NRG-2, NRG-3 y NRG-4, se mapean en loci cromosómicos distintos (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 gran variedad de proteínas NRG. Los productos génicos de NRG-1, por ejemplo, comprenden un grupo de aproximadamente 15 isoformas distintas relacionadas estructuralmente (Lemke, *Mol. Cell. Neurosci.* 7: 247-262, 1996 and Peles and Yarden, *BioEssays* 15: 815-824, 1993). Las primeras isoformas identificadas de NRG-1 incluyeron el factor de diferenciación Neu (NDF; Peles et al., *Cell* 69, 205-216, 1992 y Wen et al., *Cell* 69, 559-572, 1992), herregulina (HRG; Holmes et al., *Science* 256: 1205-1210, 1992), actividad inductora del receptor de acetilcolina (ARIA; Falls et al., *Cell* 72: 801-815, 1993), y los factores de crecimiento glial GGF1, GGF2 y GGF3 (Marchionni et al., *Nature* 362: 312-8, 1993).

45

50 El gen NRG-2 se identificó por clonación por homología (Chang et al., *Nature* 387: 509-512, 1997; Carraway et al., *Nature* 387: 512-516, 1997; y Higashiyama et al., *J. Biochem.* 122: 675-680, 1997) y a través de enfoques genómicos (Busfield et al., *Mol. Cell. Biol.* 17: 4007-4014, 1997). Los ADNc NRG-2 también se conocen como activadores derivados neurológicos y de timo de las quinasas ErbB (NTAK; número de acceso de Genbank AB005060), divergente de neurregulina (Don-1) y factor de crecimiento derivado del cerebelo (CDGF; solicitud PCT WO 97/09425). La evidencia experimental muestra que es probable que las células que expresan ErbB4 o la combinación ErbB2/ErbB4 muestren una respuesta particularmente sólida a NRG-2 (Pinkas-Kramarski et al., *Mol. Cell. Biol.* 18: 6090-6101, 1998). También se sabe que el producto del gen NRG-3 (Zhang et al., *supra*) se une y activa los receptores ErbB4 (Hijazi et al., *Int. J. Oncol.* 13: 1061-1067, 1998).

55

Un dominio similar a EGF está presente en el núcleo de todas las formas de NRG, y es necesario para la unión y activación de los receptores ErbB. Las secuencias de aminoácidos deducidas de los dominios similares a EGF codificados en los tres genes son aproximadamente 30-40% idénticas (comparaciones por pares). Además, parece

haber al menos dos subformas de dominios similares a EGF en NRG-1 y NRG-2, que pueden conferir diferentes bioactividades y potencias específicas de tejido.

Las respuestas celulares a NRG están mediadas a través de los receptores de tirosina quinasas NRG EGFR, ErbB2, ErbB3 y ErbB4 de la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico. La unión de alta afinidad de todos los NRG está mediada principalmente a través de ErbB3 o ErbB4. La unión de ligandos NRG conduce a la dimerización con otras subunidades ErbB y a la transactivación por fosforilación en residuos de tirosina específicos. En ciertos 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. Sin embargo, parece que ErbB2 es un compañero de dimerización preferido que puede desempeñar un papel importante en la estabilización del complejo ligando-receptor. ErbB2 no se une al ligando por sí solo, sino que debe combinarse heterológicamente con uno de los otros subtipos de receptores. ErbB3 posee actividad de tirosina quinasa, pero es un objetivo para la fosforilación de los otros receptores. Se sabe que la expresión de NRG-1, ErbB2 y ErbB4 es necesaria para la trabeculación del miocardio ventricular durante el desarrollo del ratón.

Las neurregulinas estimulan el crecimiento hipertrófico compensatorio e inhiben la apoptosis de los miocardiocitos sometidos a estrés fisiológico. De acuerdo con estas observaciones, la administración de una neurregulina es útil para prevenir, minimizar o revertir la enfermedad cardíaca congestiva resultante de factores subyacentes como hipertensión, enfermedad cardíaca isquémica y cardiotoxicidad. Véase, por ejemplo, el Número de Patente de los Estados Unidos (USPN) 6,635,249.

En vista de la alta prevalencia de insuficiencia cardíaca en la población general, sigue habiendo una necesidad insatisfecha de prevenir o minimizar la progresión de esta enfermedad, por ejemplo inhibiendo la pérdida de la función cardíaca o mejorando la función cardíaca.

Resumen de la invención

La presente invención está definida por las reivindicaciones. La presente divulgación que comprende la invención comprende la reducción de los efectos secundarios causados por el nivel suprafisiológico de neurregulina tras la administración durante un tiempo prolongado mientras se trata o previene la insuficiencia cardíaca en un mamífero.

La invención se basa en la sorprendente observación de que los beneficios terapéuticos de un péptido que comprende un dominio similar al factor de crecimiento epidérmico (similar al EGF) se pueden lograr mediante regímenes de dosificación para la administración de neurregulina que no mantienen un estado estable tal como administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido a un mamífero a intervalos de administración de 48, 72, 96 o más horas o más. En consecuencia, el presente tratamiento requiere la administración intermitente o discontinua (cada 48 a 96 horas, o incluso intervalos más largos) de un péptido que contiene un dominio similar a EGF para el mamífero, en donde el dominio similar a EGF está codificado por un gen de neurregulina, y en donde la administración del péptido es en una cantidad efectiva para tratar o prevenir la insuficiencia cardíaca en el mamífero. Los regímenes de dosificación para la administración de neurregulina que no mantienen concentraciones en estado estacionario son tan efectivos como los regímenes de dosificación más frecuentes, pero sin los inconvenientes, costos o efectos secundarios que pueden resultar de una administración más frecuente. Como se usa en el presente documento, el término administración intermitente o discontinua incluye un régimen de dosificación en intervalos de al menos 96 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 1 semana, 2 semanas, 4 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, o cualquier combinación o incremento de los mismos, siempre que el intervalo/régimen sea al menos 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 1 semana, 2 semanas, 4 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses. Como se usa en el presente documento, el término administración intermitente o discontinua incluye un régimen de dosificación en intervalos de no menos de 96 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 1 semana, 2 semanas, 4 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, o cualquier combinación o incremento de los mismos, siempre que el intervalo/régimen no sea menos de 96 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 1 semana, 2 semanas, 4 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses.

De acuerdo con la presente invención, la administración al mamífero intermitente o discontinua de un péptido que contiene un dominio similar a EGF, en donde el dominio similar a EGF está codificado por un gen de neurregulina, se dirige a lograr un régimen de dosificación en donde no se mantienen concentraciones estrechas en estado estacionario del péptido administrado, lo que reduce la probabilidad de que el mamífero experimente efectos secundarios adversos que pueden resultar del mantenimiento de niveles suprafisiológicos del péptido administrado durante un período prolongado. Por ejemplo, los efectos secundarios asociados con los niveles suprafisiológicos de NRG administrado de manera exógena incluyen hiperplasia de la vaina nerviosa, hiperplasia mamaria, nefropatía renal, hipoespermia, elevación de enzimas hepáticas, cambios en las válvulas cardíacas y cambios en la piel en el sitio de inyección.

En una realización preferida, la presente invención se dirige a un régimen de dosificación intermitente que provoca o permite fluctuaciones en los niveles séricos del péptido que comprende un dominio similar a EGF codificado por un gen de neurregulina y, por lo tanto, reduce el potencial de efectos secundarios adversos asociado con la administración más frecuente del péptido. El régimen de dosificación intermitente de la presente invención confiere así ventaja

terapéutica al mamífero, pero no mantiene niveles terapéuticos en estado estacionario del péptido que comprende un dominio similar a EGF codificado por un gen de neurregulina. Como aprecian los expertos en la materia, existen diversas realizaciones de la invención para obtener la dosificación intermitente; los beneficios de estas realizaciones pueden establecerse de varias maneras, por ejemplo, dicha administración no mantiene niveles terapéuticos de estado estable de dicho péptido, la administración reduce el potencial de efectos secundarios adversos asociados con la administración del péptido NRG con mayor frecuencia, y similares.

En realizaciones particulares de la invención, la neurregulina puede ser el gen, producto génico o subsecuencia respectiva o fragmento de la misma que comprende, que consiste esencialmente o que consiste en: NRG-1, NRG-2, NRG-3 o NRG-4. En una realización preferida, una subsecuencia NRG o fragmento de la invención comprende un dominio similar al factor de crecimiento epidérmico (similar al EGF) o un homólogo del mismo. Como aprecian las personas con conocimientos ordinarios en la técnica, un péptido homólogo a un péptido de dominio similar a EGF se determina encontrando homología estructural o mediante el péptido homólogo que se desempeña como un péptido similar a EGF en ensayos funcionales tales como mediante unión y activación Receptores ErbB. Preferiblemente, el fragmento es al menos 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85 aminoácidos de longitud. Un péptido de neurregulina de la invención puede, a su vez, ser codificado por cualquiera de estos genes de neurregulina (o subsecuencia del mismo). En una realización más particular, el péptido usado en el método es GGF2 humano recombinante o un fragmento o subsecuencia del mismo. Véanse las Figuras 8A-8D para las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos de GGF2 humano de longitud completa.

En un aspecto de la invención, los mamíferos adecuados incluyen, pero no se limitan a, ratones, ratas, conejos, perros, monos o cerdos. En una realización de la invención, el mamífero es un humano.

En otras realizaciones de la invención, la insuficiencia cardíaca puede resultar de hipertensión, cardiopatía isquémica, exposición a un compuesto cardiotoxico (por ejemplo, cocaína, alcohol, un anticuerpo anti-ErbB2 o anticuerpo anti-HER, tal como HERCEPTIN®, o un antibiótico de antraciclina, como doxorrubicina o daunomicina), miocarditis, enfermedad tiroidea, infección viral, gingivitis, abuso de drogas, abuso de alcohol, pericarditis, aterosclerosis, enfermedad vascular, miocardiopatía hipertrófica, infarto agudo de miocardio o infarto de miocardio previo, disfunción sistólica ventricular izquierda, cirugía de derivación coronaria, inanición, exposición a la radiación, un trastorno alimentario o un defecto genético.

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

En otras realizaciones de la invención, el péptido se administra antes de la exposición a un compuesto cardiotoxico, durante la exposición a dicho compuesto cardiotoxico, o después de la exposición a dicho compuesto cardiotoxico; el péptido se administra antes o después del diagnóstico de insuficiencia cardíaca congestiva en dicho mamífero. Un método de la invención puede tener lugar después de que el mamífero sujeto se haya sometido a hipertrofia cardíaca compensatoria; un método de la invención comprende que el resultado del método es mantener la hipertrofia ventricular izquierda o prevenir la progresión del adelgazamiento del miocardio o inhibir la apoptosis de los cardiomiocitos. En un método de la invención, el péptido puede comprender, que consiste esencialmente en, o que consiste en un dominio similar a EGF codificado por un gen de neurregulina. Un péptido de la invención se administra antes, durante o después de la exposición a un compuesto cardiotoxico. En otra realización, el péptido que contiene el dominio similar a EGF se administra durante dos, o los tres, de estos períodos. De acuerdo con la presente invención, el péptido que contiene un dominio similar a EGF codificado por un gen de neurregulina se administra a intervalos de cada 48 a 96 horas. En una realización de la presente invención, el péptido que contiene un dominio similar a EGF codificado por un gen de neurregulina es GGF2. En otras realizaciones más de la invención, el péptido se administra antes o después del diagnóstico de insuficiencia cardíaca congestiva en el mamífero. En otra realización más de la invención, el péptido se administra a un mamífero que se ha sometido a hipertrofia cardíaca compensatoria. En otras realizaciones particulares de la invención, la administración del péptido mantiene la hipertrofia ventricular izquierda, evita la progresión del adelgazamiento del miocardio y/o inhibe la apoptosis de los cardiomiocitos.

Las realizaciones de la invención incluyen lo siguiente: un método para tratar la insuficiencia cardíaca en un mamífero, comprendiendo dicho método administrar un péptido exógeno que comprende un dominio similar al factor de crecimiento epidérmico (similar al EGF) a dicho mamífero, en donde dicha administración a dichos intervalos reduce los efectos secundarios adversos asociados con la administración de dicho péptido exógeno en dicho mamífero. Un método para tratar la insuficiencia cardíaca en un mamífero, dicho método comprende administrar un péptido exógeno que comprende un dominio similar al factor de crecimiento epidérmico (similar al EGF) a dicho mamífero, en donde dicho dominio similar al EGF está codificado por la neurregulina (NRG)-1 gen, y dicho péptido exógeno se administra en una cantidad terapéuticamente efectiva para tratar la insuficiencia cardíaca en dicho mamífero a intervalos de al menos 48 horas, en donde dicha administración a dichos intervalos no mantiene niveles estables de dicho péptido exógeno en dicho mamífero. Un método para tratar la insuficiencia cardíaca en un mamífero, comprendiendo dicho método administrar un péptido exógeno que comprende un dominio similar al factor de crecimiento epidérmico (similar al EGF) u homólogo del mismo a dicho mamífero, y dicho péptido exógeno se administra en una cantidad terapéuticamente efectiva para tratar insuficiencia cardíaca en dicho mamífero a intervalos de al menos o no menos

de 48 horas, en donde dicha administración a dichos intervalos permite la fluctuación intradosis de las concentraciones séricas de dicho péptido exógeno a los niveles de referencia o preadministración en dicho mamífero.

5 Como se usa en el presente documento, el término efecto secundario adverso o perjudicial se refiere a una consecuencia no deseada e indeseable de un tratamiento médico. Con respecto a la presente invención, un efecto secundario adverso o perjudicial resultante de la administración de un péptido exógeno puede incluir uno o más de los siguientes: hiperplasia de la vaina nerviosa, hiperplasia mamaria, nefropatía renal y cambios en la piel en el sitio de inyección.

10 Como se usa en el presente documento, el término "fluctuación intradosis de las concentraciones séricas de dicho péptido exógeno a niveles de preadministración en dicho mamífero" se refiere a la diferencia entre los niveles de concentración sérica antes de la administración de una dosis de un péptido exógeno.

15 Como se usa en este documento, el término "niveles de estado estacionario" se refiere a un nivel de un agente exógeno (por ejemplo, un péptido) que es suficiente para lograr el equilibrio (dentro de un rango de fluctuación entre las dosis sucesivas) entre la administración y eliminación. "Mantener niveles terapéuticos en estado estacionario" se refiere a mantener la concentración de un agente exógeno en un nivel suficiente para conferir un beneficio terapéutico a un sujeto o paciente.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un histograma que representa la función cardíaca como se ejemplifica por los cambios en la fracción de eyección y el acortamiento fraccional. Como se indicó, las ratas se trataron con GGF2 a 0.625 mg/kg o una cantidad equimolar de un fragmento similar a EGF (fragmento; EGF-id) por vía intravenosa (iv) cada día (q día).

20 La figura 2 muestra un gráfico lineal que representa la función cardíaca según lo revelado por los cambios en la fracción de eyección y el acortamiento fraccional. Como se indicó, las ratas se trataron con GGF2 a 0.625 mg/kg o 3.25 mg/kg iv cada día.

25 La Figura 3 muestra un gráfico lineal que representa la función cardíaca según lo revela una mejora significativa en el volumen sistólico final durante el período de tratamiento. Como se indicó, las ratas se trataron con GGF2 a 0.625 mg/kg o 3.25 mg/kg iv cada día.

La figura 4 muestra un gráfico lineal que representa la función cardíaca según lo revelado por los cambios en la fracción de eyección y el acortamiento fraccional. Como se indicó, las ratas se trataron con GGF2 3.25 mg/kg por vía intravenosa (iv) cada 24, 48 o 96 horas.

30 La Figura 5 muestra un gráfico lineal que representa la función cardíaca según lo revelado por los cambios en la fracción de eyección ecocardiográfica. Como se indicó, las ratas se trataron con vehículo o GGF2 3.25 mg/kg por vía intravenosa (iv), con o sin BSA.

La Figura 6 muestra un gráfico lineal que representa la vida media del GGF2 humano recombinante (rhGGF2) después de la administración iv.

35 La Figura 7 muestra un gráfico lineal que representa la vida media de GGF2 humano recombinante (rhGGF2) después de la administración subcutánea.

Las Figuras 8A-D muestran las secuencias nucleicas y de aminoácidos de GGF2 de longitud completa. La secuencia de ácido nucleico se designa SEQ ID NO: 1 y la secuencia de aminoácidos se designa como SEQ ID NO: 2.

40 La Figura 9 muestra las secuencias de aminoácidos y nucleicas del dominio 1 similar al factor de crecimiento epidérmico (EGFL). La secuencia de ácidos nucleicos del dominio 1 de EGFL se designa aquí SEQ ID NO: 3 y la secuencia de aminoácidos del dominio EGFL I se designa aquí SEQ ID NO: 4.

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

45 La Figura 11 muestra las secuencias de aminoácidos y nucleicas del dominio 3 similar al factor de crecimiento epidérmico (EGFL). La secuencia de ácidos nucleicos del dominio 3 de EGFL se designa en este documento SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos del dominio 3 de EGFL se designa aquí SEQ ID NO: 8.

La Figura 12 muestra las secuencias de aminoácidos y nucleicas del dominio 4 similar al factor de crecimiento epidérmico (EGFL). La secuencia de ácidos nucleicos del dominio 4 de EGFL se designa en este documento SEQ ID NO: 9 y la secuencia de aminoácidos del dominio 4 de EGFL se designa aquí SEQ ID NO: 10.

50 La Figura 13 muestra las secuencias de aminoácidos y nucleicas del dominio 5 similar al factor de crecimiento epidérmico (EGFL). La secuencia de ácidos nucleicos del dominio 5 de EGFL se designa aquí SEQ ID NO: 11 y la secuencia de aminoácidos del dominio 5 de EGFL se designa aquí SEQ ID NO: 12.

La Figura 14 muestra las secuencias de aminoácidos y nucleicas del dominio 6 similar al factor de crecimiento epidérmico (EGFL). La secuencia de ácidos nucleicos del dominio 6 de EGFL se designa aquí SEQ ID NO: 13 y la secuencia de aminoácidos del dominio 6 de EGFL se designa en la SEQ ID NO: 14.

5 La Figura 15 muestra la secuencia de aminoácidos de un polipéptido que comprende un dominio similar al factor de crecimiento epidérmico (EGFL), que se designa aquí SEQ ID NO: 21.

Descripción detallada de la invención

10 Los presentes inventores hicieron el sorprendente descubrimiento de que la administración discontinua o intermitente de una neurregulina a intervalos de tiempo apropiadamente espaciados entrega una cantidad terapéuticamente efectiva de la neurregulina a un paciente que la necesita y tal régimen de tratamiento es útil para prevenir, hacer profilaxis, mejorar, minimizar, tratar o revertir enfermedades del corazón, como la insuficiencia cardíaca congestiva.

15 A pesar de la sabiduría convencional y la práctica de desarrollo relacionadas con el diseño de regímenes de dosificación para mantener las concentraciones de estado estacionario de rango más estrecho, los presentes inventores demuestran aquí que los regímenes de dosificación para la administración de neurregulina que no mantienen concentraciones estrechas de estado estacionario son tan efectivos como más regímenes de dosificación frecuente. De hecho, los presentes inventores han demostrado que el tratamiento con neurregulina de la insuficiencia cardíaca con intervalos de dosificación de al menos 48 horas, 72 horas, 96 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 12 días, 13 días, 14 días, 1 semana, 2 semanas, 4 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, o cualquier combinación o incremento de los mismos siempre que el intervalo/régimen es de al menos 48 horas es tan eficaz como la dosificación diaria.

20 Para evaluar la farmacocinética de NRG exógeno, los presentes inventores han demostrado que la vida media de la neurregulina cuando se administra por vía intravenosa es de 4 a 8 horas y cuando se administra por vía subcutánea es de 11-15 horas. Véase, por ejemplo, las Tablas 1 y 2 y las Figuras 6 y 7. La dosificación en regímenes tan infrecuentes como cada cuatro días, por lo tanto, no mantendría ningún nivel detectable durante al menos tres días entre dosis. Con base en estos hallazgos, antes de la presente invención, no se habría predicho que tales relaciones pico/valle se correlacionarían con un beneficio terapéutico constante. Es de destacar que los compuestos con una vida media de este orden generalmente se administran de acuerdo con un régimen de dosificación frecuente (por ejemplo, dosis diarias o dosis diarias múltiples). De hecho, según los datos farmacocinéticos disponibles para GGF2, el desarrollo tradicional predeciría que el tratamiento óptimo implicaría la administración subcutánea diaria.

30 De acuerdo con la práctica convencional de conocimiento y desarrollo, otros tratamientos médicos para CHF se administran típicamente al menos diariamente. Se cree que la periodicidad de dicho régimen es necesaria porque la ICC es una afección crónica, comúnmente causada por una alteración de la contracción y/o relajación del corazón, en lugar de una afección aguda. En las personas con un corazón débil que conduce a una relajación alterada y CHF, los tratamientos médicos incluyen fármacos que bloquean la formación o la acción de neurohormonas específicas (por ejemplo, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (inhibidores de la ECA), antagonistas del receptor de angiotensina (BRA), antagonistas de la aldosterona y bloqueadores de los receptores beta-adrenérgicos). Estos y otros fármacos ahora son estándar de atención en la ICC crónica, ya que se ha demostrado que mejoran los síntomas, la esperanza de vida y/o una reducción en las hospitalizaciones. En caso de exacerbación aguda o síntomas crónicos, los pacientes a menudo son tratados con inotrópicos (por ejemplo, dobutamina, digoxina) para mejorar la contractilidad cardíaca, junto con vasodilatadores (por ejemplo, nitratos, nesiritide) y/o diuréticos (por ejemplo, furosemida) para reducir la congestión. Los pacientes con hipertensión e insuficiencia cardíaca congestiva se tratan con uno o más agentes antihipertensivos, como betabloqueantes, inhibidores de la ECA y BRA, nitratos (dinitrato de isosorbida), hidralazina y bloqueadores de los canales de calcio.

45 Por lo tanto, a pesar de la práctica típica con respecto al tratamiento de CHF, los presentes inventores han demostrado que un nuevo régimen de dosificación da como resultado un tratamiento eficaz de CHF, evitando a la vez efectos secundarios indeseables. Aunque no desea limitarse a la teoría, es probable que dicho tratamiento con neurregulina fortalezca la capacidad de bombeo del corazón al estimular la hipertrofia de los cardiomiocitos e inhiba parcial o completamente el deterioro del corazón al suprimir la apoptosis de los cardiomiocitos.

50 A modo de antecedentes adicionales, el principio básico de dosificación es determinar una concentración circulante efectiva y diseñar un régimen de dosificación para mantener esos niveles. Los estudios farmacocinéticos (PK) y farmacodinámicos (PD) se combinan para predecir un régimen de dosificación que mantendrá un nivel de estado estacionario de un fármaco en particular. El plan típico es minimizar la diferencia entre la C_{max} y la C_{min} y, por lo tanto, reducir los efectos secundarios.

55 Los fármacos se describen por su "índice terapéutico" que es una relación de la dosis tóxica o los niveles circulantes dividida por la dosis efectiva o las concentraciones circulantes. Cuando el índice terapéutico es grande, existe un amplio rango de seguridad donde se puede administrar una dosis efectiva sin acercarse a los niveles tóxicos. Cuando los efectos adversos resultan en concentraciones demasiado cercanas a las concentraciones efectivas, el índice terapéutico se describe como estrecho y el fármaco es difícil de administrar de manera segura.

Mientras se desarrollan los regímenes de dosificación, se combinan los datos de PK/PD con el conocimiento del índice terapéutico para diseñar una dosis y frecuencia de administración de manera que el compuesto se mantenga a una concentración en un paciente (por ejemplo, un humano) de modo que sea por encima de la concentración efectiva y por debajo de la concentración tóxica. Si no se puede mantener una concentración efectiva del fármaco sin inducir efectos inseguros, el fármaco fallará durante el desarrollo. Se pueden encontrar comentarios adicionales relacionados con el desarrollo de fármacos en una variedad de referencias, que incluyen: *Pharmacokinetics in Drug Development: Clinical Study Design and Analysis* (2004, Peter Bonate and Danny Howard, eds.).

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

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

Como se expone en el presente documento, se exploró la administración subcutánea debido a la vida media prolongada en comparación con la administración intravenosa y la creencia inicial de que mantener niveles constantes de ligando sería ventajoso. El desarrollo de regímenes de dosificación para reducir estos efectos mejoraría significativamente la capacidad de las neuregulinas para ser utilizadas como agentes terapéuticos y es hacia este fin que se dirige la presente invención. Demostrar que la dosificación menos frecuente que no mantiene niveles constantes también es efectiva permite este desarrollo.

Neuregulinas: Como se indicó anteriormente, los péptidos codificados por los genes NRG-1, NRG-2, NRG-3 y NRG-4 poseen dominios similares a EGF que les permiten unirse y activar los receptores ErbB. Holmes et al. (*Science* 256: 1205-1210, 1992) han demostrado que el dominio de tipo EGF solo es suficiente para unirse y activar el receptor p185erbB2. En consecuencia, cualquier producto peptídico codificado por el gen NRG-1, NRG-2 o NRG-3, o cualquier péptido similar a neuregulina, por ejemplo, un péptido que tiene un dominio similar a EGF codificado por un gen de neuregulina o ADNc (por ejemplo, puede usar un dominio similar a EGF que contiene los subdominios peptídicos NRG-1 C-C/D o C-C/D', como se describe en USPN 5,530,109, USPN 5,716,930 y USPN 7,037,888; o un dominio similar a EGF como se describe en el documento WO 97/09425) en los métodos de la invención para prevenir o tratar la insuficiencia cardíaca congestiva. El contenido de cada una de las USPN 5,530,109; USPN 5,716,930; USPN 7,037,888; y WO 97/09425.

Factores de riesgo: Los factores de riesgo que aumentan la probabilidad de que un individuo desarrolle insuficiencia cardíaca congestiva son bien conocidos. Estos incluyen, entre otros, fumar, obesidad, presión arterial alta, cardiopatía isquémica, enfermedad vascular, cirugía de derivación coronaria, infarto de miocardio, disfunción sistólica del ventrículo izquierdo, exposición a compuestos cardiotoxicos (alcohol, drogas como la cocaína y antraciclina), antibióticos como doxorrubicina y daunorrubicina), infección viral, pericarditis, miocarditis, gingivitis, enfermedad de la tiroides, exposición a la radiación, defectos genéticos conocidos por aumentar el riesgo de insuficiencia cardíaca (como los descritos en Bachinski and Roberts, *Cardiol. Clin.* 16: 603-610, 1998; Siu et al., *Circulation* 8: 1022-1026, 1999; y Arbustini et al., *Heart* 80: 548-558, 1998), inanición, trastornos alimentarios como la anorexia y la bulimia, antecedentes familiares de insuficiencia cardíaca e hipertrofia miocárdica.

De acuerdo con la presente invención, las neuregulinas pueden administrarse intermitentemente para lograr la profilaxis, tal como previniendo o disminuyendo la tasa de progresión de la enfermedad cardíaca congestiva en aquellos identificados como en riesgo. Por ejemplo, la administración de neuregulina a un paciente en hipertrofia compensatoria temprana permite el mantenimiento del estado hipertrófico y evita la progresión a insuficiencia cardíaca. Además, aquellos identificados por estar en riesgo pueden recibir tratamiento cardioprotector de neuregulina antes del desarrollo de hipertrofia compensatoria. La administración de neuregulina a pacientes con cáncer antes y durante la quimioterapia con antraciclina o la terapia combinada de antraciclina/anti-ErbB2 (anti-HER2) (por ejemplo, HERCEPTIN®) puede evitar que los cardiomiocitos de un paciente sufran apoptosis, preservando así la función cardíaca. Los pacientes que ya han sufrido pérdida de cardiomiocitos también obtienen beneficios del tratamiento con neuregulina, porque el tejido miocárdico restante responde a la exposición a la neuregulina al mostrar un crecimiento hipertrófico y una mayor contractilidad.

Terapia: Las neuregulinas y péptidos que contienen dominios similares a EGF codificados por genes de neuregulina pueden administrarse a pacientes o animales experimentales con un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones de la invención se pueden proporcionar en forma de dosificación unitaria.

La práctica farmacéutica convencional se emplea para proporcionar formulaciones o composiciones adecuadas, y para administrar tales composiciones a pacientes o animales experimentales. Aunque se prefiere la administración intravenosa, se puede emplear cualquier vía de administración apropiada, por ejemplo, parenteral, subcutánea,

intramuscular, transdérmica, intracardíaca, intraperitoneal, intranasal, en aerosol, oral o tópica (por ejemplo, aplicando un parche adhesivo que lleva una formulación capaz de cruzar la dermis y entrar en el torrente sanguíneo).

Las formulaciones terapéuticas pueden estar en forma de soluciones o suspensiones líquidas; para la administración oral, las formulaciones pueden estar en forma de tabletas o cápsulas; y para formulaciones intranasales, en forma de polvos, gotas nasales o aerosoles.

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

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

Con respecto a las inyecciones intravenosas, los niveles de dosis varían de aproximadamente 0.001 mg/kg, 0.01 mg/kg a al menos 10 mg/kg, en intervalos de tiempo regulares de al menos aproximadamente cada 24, 36, 48 horas a aproximadamente cada 96 horas y especialmente cada 48, 72 o 96 horas o más como se establece en este documento. En una realización particular, los niveles de dosis de inyección intravenosa varían de aproximadamente 0.1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, en intervalos de tiempo regulares de aproximadamente cada 48 horas a aproximadamente cada 96 horas y especialmente cada 48, 72 o 96 horas o más como se establece en este documento. En otra realización particular, los niveles de dosis de inyección intravenosa varían de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, en intervalos de tiempo regulares de aproximadamente cada 48 horas a aproximadamente cada 96 horas y especialmente cada 48, 72 o 96 horas o más como se establece en este documento. En otra realización particular más, los niveles de dosis de inyección intravenosa varían de aproximadamente 0.01 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, en intervalos de tiempo regulares de aproximadamente cada 48 horas a aproximadamente cada 96 horas y especialmente cada 48, 72 o 96 horas o más como se establece aquí. En otra realización particular más, los niveles de dosis de inyección intravenosa varían de aproximadamente 0.1 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, en intervalos de tiempo regulares de aproximadamente cada 48 horas a aproximadamente cada 96 horas y especialmente cada 48, 72 o 96 horas o más como se establece en este documento.

Con respecto a las inyecciones subcutáneas, los niveles de dosis varían de aproximadamente 0.01 mg/kg a al menos 10 mg/kg, en intervalos de tiempo regulares de aproximadamente cada 48 horas a aproximadamente cada 96 horas y especialmente cada 48, 72 o 96 horas o más como se establece en este documento. En una realización particular, los niveles de dosis de inyección varían de aproximadamente 0.1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, en intervalos de tiempo regulares de aproximadamente cada 48 horas a aproximadamente cada 96 horas o más como se establece en este documento, y especialmente cada 48, 72 o 96 horas. En otra realización particular, los niveles de dosis de inyección varían de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg, en intervalos de tiempo regulares de aproximadamente cada 48 horas a aproximadamente cada 96 horas o más como se establece aquí, y especialmente cada 48, 72 o 96 horas.

En otra realización particular más, los niveles de dosis de inyección varían de aproximadamente 0.01 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, en intervalos de tiempo regulares de aproximadamente cada 48 horas a aproximadamente cada 96 horas o más como se establece en este documento, y especialmente cada 48, 72 o 96 horas. En otra realización particular más, los niveles de dosis de inyección varían de aproximadamente 0.1 mg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, en intervalos de tiempo regulares de aproximadamente cada 48 horas a aproximadamente cada 96 horas o más como se establece en el presente documento, y especialmente cada 48, 72 o 96 horas.

Las dosis transdérmicas se seleccionan generalmente para proporcionar niveles en sangre similares o más bajos que los que se alcanzan usando dosis de inyección.

Los compuestos de la invención pueden administrarse como el único agente activo o pueden administrarse en combinación con otros agentes, incluidos otros compuestos que demuestran la misma actividad terapéutica o una actividad terapéutica similar y que se determina que son seguros y eficaces para tal administración combinada. Otros compuestos de este tipo utilizados para el tratamiento de la ICC incluyen péptido natriurético cerebral (BNP), fármacos que bloquean la formación o la acción de neurohormonas específicas (por ejemplo, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (inhibidores de la ECA), antagonistas del receptor de angiotensina (BRA), antagonistas de la aldosterona y beta-bloqueadores de los receptores adrenérgicos), inotrópicos (por ejemplo, dobutamina, digoxina) para mejorar la contractilidad cardíaca, vasodilatadores (por ejemplo, nitratos, nesiritide) y/o diuréticos (por

ejemplo, furosemida) para reducir la congestión, y uno o más agentes antihipertensivos como los betabloqueantes, ACE-inhibidores y BRA, nitratos (dinitrato de isosorbida), hidralazina y bloqueadores de los canales de calcio.

Como se indicó anteriormente, la intervención médica que implica el tratamiento farmacológico requiere la selección de un fármaco apropiado y su administración a un régimen de dosificación adecuado. Un régimen de dosificación adecuado implica una dosis, ruta, frecuencia y duración del tratamiento suficientes. El objetivo final de la terapia farmacológica es la adquisición de concentraciones óptimas de fármacos en el sitio de acción para permitir al paciente tratado superar el proceso patológico para el que se necesita tratamiento. En términos generales, el conocimiento básico de los principios de disposición de drogas facilita la selección de regímenes de dosificación apropiados. Sin embargo, la monitorización terapéutica de fármacos (TDM) se puede utilizar en este contexto como una herramienta complementaria para ayudar al médico tratante a determinar regímenes de dosificación eficaces y seguros de fármacos seleccionados para la terapia médica de pacientes individuales.

Concentración objetivo y ventana terapéutica: La definición de la concentración óptima del fármaco varía dependiendo de las características farmacodinámicas del fármaco particular. La terapia óptima para antibióticos dependientes del tiempo como la penicilina, por ejemplo, se relaciona con lograr una concentración máxima a relaciones MIC (concentración inhibitoria mínima) de 2-4 y un tiempo por encima de la MIC igual al 75% del intervalo de dosis. Para los antibióticos dependientes de la concentración, como la gentamicina, por ejemplo, la eficacia está relacionada con la obtención de las concentraciones máximas respecto a las relaciones MIC de aproximadamente 8-10. Independientemente de los matices asociados con la administración de un fármaco en particular, la terapia con fármacos tiene como objetivo alcanzar las concentraciones plasmáticas objetivo (que a menudo reflejan las concentraciones en el sitio de acción) dentro de los límites de una "ventana terapéutica", que se ha determinado previamente en función de la perfiles farmacocinéticos, farmacodinámicos y de toxicidad del fármaco en las especies objetivo. El ancho de esta ventana varía para diferentes drogas y especies. Cuando la diferencia entre la concentración mínima eficaz y la concentración mínima tóxica es pequeña (2 a 4 veces), la ventana terapéutica se denomina estrecha. En contraste, cuando hay una gran diferencia entre la concentración efectiva y tóxica, se considera que el fármaco tiene una amplia ventana terapéutica. Un ejemplo de un fármaco con una ventana terapéutica estrecha es la digoxina, en la cual la diferencia entre las concentraciones efectivas y tóxicas promedio es de 2 o 3 veces. La amoxicilina, por otro lado, tiene un amplio rango terapéutico y la sobredosis de un paciente generalmente no se asocia con problemas de toxicidad.

Variabilidad en la capacidad de respuesta a los fármacos: la variabilidad pronunciada entre sujetos sanos de la misma especie con respecto a la capacidad de respuesta a los fármacos es común. Además, los estados de enfermedad tienen el potencial de afectar los sistemas y las funciones de los órganos (por ejemplo, el contenido de agua en riñones, hígado) que a su vez pueden afectar la capacidad de respuesta a los fármacos. Esto, a su vez, contribuye a aumentar las diferencias en la capacidad de respuesta a los fármacos en individuos enfermos a quienes se administra el fármaco. Otro tema relevante se relaciona con la administración de más de un fármaco a la vez, lo que resulta en interacciones farmacocinéticas que pueden conducir a alteraciones en la capacidad de respuesta a uno o ambos fármacos. En resumen, los factores fisiológicos (por ejemplo, edad), patológicos (por ejemplo, efectos de la enfermedad) y farmacológicos (por ejemplo, interacción farmacológica) pueden alterar la disposición de los fármacos en los animales. El aumento de la variabilidad entre los individuos resultante de esto puede dar lugar a fallas terapéuticas o toxicidad en fármacos con un índice terapéutico estrecho.

La población de pacientes que se beneficiaría de un régimen de tratamiento de la presente invención es bastante diversa, por ejemplo, los pacientes con insuficiencia renal son buenos candidatos porque los niveles continuos de proteínas terapéuticas a menudo se asocian con depósitos glomerulares renales. La utilidad de un régimen terapéutico que no mantiene niveles plasmáticos constantes como se describe en esta invención sería, por lo tanto, muy beneficioso para pacientes con función renal comprometida en la que cualquier disminución de la función existente podría ser perjudicial. De manera similar, la exposición breve e intermitente a un agente terapéutico como GGF2, como se describe en el presente documento, puede ser beneficiosa para pacientes con tipos de tumor que responden a la estimulación crónica y continua con un factor de crecimiento. Otros pacientes que pueden beneficiarse específicamente de la terapia intermitente como se describe aquí son pacientes con schwannomas y otras neuropatías periféricas. Es una ventaja de la presente invención que la dosificación intermitente puede tener ventajas significativas al no mantener la estimulación continua relacionada con los efectos secundarios de varios tejidos.

El momento adecuado del muestreo de sangre con el fin de determinar el nivel de fármaco en suero, así como la interpretación del nivel informado requieren la consideración de las propiedades farmacocinéticas del fármaco que se está midiendo. Algunos términos utilizados en la discusión de estas propiedades se definen en los siguientes párrafos.

Vida media: El tiempo requerido para que la concentración sérica presente al comienzo de un intervalo disminuya en un 50%. Conocer una vida media aproximada es esencial para el clínico, ya que determina el horario de dosificación óptimo con agentes orales, la fluctuación intradosis de la concentración sérica y el tiempo requerido para alcanzar el estado estacionario.

En resumen, se han realizado múltiples estudios farmacocinéticos para GGF2. Las semividas típicas para GGF2 son entre 4 y 8 horas para la vía intravenosa (iv), mientras que la semivida de GGF2 administrado por vía subcutánea (sc) es entre 11 y 15 horas. Cmax, AUC, Tmax y T1/2 se muestran en las Tablas 1 y 2 a continuación. Cuando la vida

media era demasiado larga para ser determinada con precisión por estos métodos, se presenta un guion en lugar de un momento.

Tabla 1 y Tabla 2

Apéndice 7

Farmacocinética media de la radioactividad derivada de 125I-rhGGF2 en plasma de ratas Sprague-Dawley machos después de una dosis intravenosa o subcutánea única de 1125I-rhGGF2

Parámetros	Grupo 1 (n=2)		Grupo 2 (n=1)	
	Total	TCAPrecip	Total	TCAPrecip
Cmax (ug eq/g)	0.3289	0.2953	0.0157	0.01
AUC 0-t (ug eq-h/g)	1.27	0.01	0.27	0.17
AUC inf (ug eq-h/g)	1.37	0.96	0.39	0.26
Tmax(h)	0.08	0.08	6.0	6.0
Vida media	6.37	6.11	1320	14.66
	Grupo 1 - i.v.		Grupo 2-s.c.	

Farmacocinética media de la radioactividad derivada de 125I-rhGGF2 en plasma de ratas Sprague-Dawley machos que siguen una dosis intravenosa o subcutánea única de 125I-rhGGF2

Apéndice 9

Parámetros	Grupo 1 (n=2)		Grupo 2 (n=1)	
	Total	Total	Total	Total
Cmáx (ug eq/g)	0.2611	0.2291	0.0197	0.0034
AUC 0-t (ug eq-h/g)	1.488	0.567	0.335	0.064
AUC inf (ug eq-h/g)	1.667	0.62	-	-
Tmáx(h)	0.08	0.08	12.0	12.0
Vida media	7.75	7.96	-	-
	Grupo 1 - i.v.		Grupo 2 - s.c.	

- 5 Las concentraciones plasmáticas después de la administración se muestran en las Figuras 6 y 7 para la administración iv y sc, respectivamente. Como se muestra en las Figuras 6 y 7, Cmax, se refiere a la concentración máxima en plasma (la concentración máxima que se mide en el plasma en cualquier momento después de la administración); AUCinf, se refiere al área bajo la curva de concentración versus tiempo hasta tiempo infinito (qué método se usa para anticipar que el ensayo tiene límites de detección); AUC0-t, se refiere al área bajo la concentración plasmática (curva de tiempo desde el tiempo cero hasta la última concentración medible); AUC por cualquier método se refiere a una estimación de la exposición total al animal; y Tmax, se refiere a la mediana del tiempo de concentración plasmática máxima.
- 10

Como es evidente a partir de las tablas y figuras, no es posible mantener niveles terapéuticos en estado estacionario por vía de dosificación cada cuatro días, cada dos días o cada día de dosificación. Los niveles no se pueden medir después de un día e incluso mucho antes de eso, como lo reflejan los datos establecidos en la Tabla 11.

Tabla 11: Parámetros PK para GGF2 después de la administración intravenosa*							
Ratas							
Dosis (mg/kg)	AUC _{0-∞} (hr•ng/mL)	AUC _{0-∞} /Dosis ((hr•ng/m L) /mg/kg)	AUC _{0-final} (hr•ng/mL)	AUC _{0-final} /Dosis ((hr•ng/m L) /mg/kg)	CL (mL/min/kg)	t _{1/2} (h)	Vss (mL/kg)
8	16100±20500	2010±2560	16800±22300	2100±2790	18.1±12.7	1.46±1.84	1050±331
16	39600±9440	2470±590	38300±10000	2390±625	7.00±1.33	1.69±0.430	532±145
Monos							
8	15900±1690	1980±212	15100±1730	1890±217	8.48±0.910	2.02±0.358	1110±113
*tomado de datos obtenidos de las concentraciones plasmáticas de GGF2 medidas por ELISA. Los datos informados son la media ± DE.							

- Estado estable: Las concentraciones séricas en estado estable son aquellos valores que se repiten con cada dosis y representan un estado de equilibrio entre la cantidad de fármaco administrado y la cantidad que se elimina en un intervalo de tiempo dado. Durante la dosificación a largo plazo con cualquier fármaco, los dos determinantes principales de su concentración sérica media en estado estacionario son la velocidad a la que se administra el fármaco y el aclaramiento total del fármaco en ese paciente en particular.
- Concentración sérica máxima: El punto de concentración máxima en la curva de concentración sérica versus tiempo. El tiempo exacto de la concentración sérica máxima es difícil de predecir ya que representa relaciones complejas entre las tasas de entrada y salida.
- Concentración sérica mínima: La concentración sérica mínima encontrada durante un intervalo de dosificación. Las concentraciones mínimas están teóricamente presentes en el período inmediatamente anterior a la administración de la dosis siguiente.
- Absorción: El proceso por el cual una droga ingresa al cuerpo. Los fármacos administrados por vía intravascular se absorben totalmente, pero la administración extravascular produce diversos grados y tasas de absorción. La relación entre la tasa de absorción y la tasa de eliminación es el principal determinante de la concentración del fármaco en el torrente sanguíneo.
- Distribución: La dispersión del fármaco disponible sistémicamente desde el espacio intravascular en fluidos y tejidos extravasculares y, por lo tanto, a los sitios receptores objetivo.
- Rango terapéutico: Ese rango de concentraciones de fármaco en suero asociado con un alto grado de eficacia y un bajo riesgo de toxicidad relacionada con la dosis. El rango terapéutico es un concepto estadístico: es el rango de concentración asociado con la respuesta terapéutica en la mayoría de los pacientes. Como consecuencia, algunos pacientes exhiben una respuesta terapéutica a niveles séricos por debajo del límite inferior del rango, mientras que otros requieren niveles séricos que exceden el límite superior para obtener un beneficio terapéutico.
- El momento correcto de la recogida de muestras es importante, ya que la terapia farmacológica a menudo se revisa en función de las determinaciones de concentración sérica. Las fases de absorción y distribución deben completarse y alcanzarse una concentración en estado estacionario antes de extraer la muestra. Los niveles obtenidos antes de que exista una concentración en estado estacionario pueden ser erróneamente bajos; aumentar la dosis en función de dicho resultado podría producir concentraciones tóxicas. Además, cuando se realizan mediciones comparativas, es importante que el tiempo de muestreo sea consistente.
- El momento de las muestras de sangre en relación con la dosificación es crítico para la interpretación correcta del resultado de la concentración sérica. La selección del tiempo de extracción de la muestra en relación con la administración del fármaco debe basarse en las propiedades farmacocinéticas del fármaco, su forma de dosificación y la razón clínica para analizar la muestra (por ejemplo, evaluación de la eficacia o aclaración de una posible toxicidad inducida por fármacos). Para la monitorización rutinaria del nivel sérico de fármacos con vidas medias cortas, se puede obtener una muestra máxima y mínima en estado estable para caracterizar el perfil de concentración sérica; para

fármacos con una vida media prolongada, las muestras pasantes en estado estable por sí solas generalmente son suficientes.

5 Por "insuficiencia cardíaca congestiva" se entiende una función cardíaca deteriorada que hace que el corazón sea incapaz de mantener el gasto sanguíneo normal en reposo o con ejercicio, o de mantener un gasto cardíaco normal en el contexto de la presión de llenado cardíaco normal. Una fracción de eyección ventricular izquierda de aproximadamente 40% o menos es indicativa de insuficiencia cardíaca congestiva (a modo de comparación, una fracción de eyección de aproximadamente 60% es normal). Los pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva muestran síntomas y signos clínicos bien conocidos, como taquipnea, derrames pleurales, fatiga en reposo o con ejercicio, disfunción contráctil y edema. La insuficiencia cardíaca congestiva se diagnostica fácilmente mediante métodos bien 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 la progresión de la enfermedad se evalúan usando métodos bien conocidos, tales como examen físico, ecocardiografía, formación de imágenes de radionúclidos, monitorización hemodinámica invasiva, angiografía por resonancia magnética y pruebas de ejercicio en cinta de correr junto con estudios de absorción de oxígeno.

15 Por "cardiopatía isquémica" se entiende cualquier trastorno resultante de un desequilibrio entre la necesidad miocárdica de oxígeno y la adecuación del suministro de oxígeno. La mayoría de los casos de cardiopatía isquémica resultan del estrechamiento de las arterias coronarias, como ocurre en la aterosclerosis u otros trastornos vasculares.

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

20 Por "cardiotóxico" se entiende un compuesto que disminuye la función cardíaca al dañar o matar directa o indirectamente a los cardiomiocitos.

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

25 Por "tratar" se entiende que la administración de una neurregulina o un péptido similar a la neurregulina ralentiza o inhibe la progresión de la insuficiencia cardíaca congestiva durante el tratamiento, en relación con la progresión de la enfermedad que ocurriría en ausencia de tratamiento, en una manera estadísticamente significativa. Se pueden usar indicios bien conocidos, como la fracción de eyección del ventrículo izquierdo, el rendimiento del ejercicio y otras pruebas clínicas enumeradas anteriormente, así como las tasas de supervivencia y hospitalización para evaluar la progresión de la enfermedad. Se puede determinar si un tratamiento ralentiza o inhibe la progresión de la enfermedad de una manera estadísticamente significativa mediante métodos que son bien 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).

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

40 El término "cantidad terapéuticamente efectiva" significa la cantidad de un fármaco o agente farmacéutico que provoca la respuesta biológica o médica de un tejido, un sistema, un animal o un ser humano que está buscando un investigador, veterinario, médico u otro clínico. Un cambio terapéutico es un cambio en una característica bioquímica medida en una dirección que se espera que alivie la enfermedad o afección que se está abordando. Más particularmente, una "cantidad terapéuticamente efectiva" es una cantidad suficiente para disminuir los síntomas asociados con una afección o enfermedad médica, para normalizar las funciones corporales en enfermedades o trastornos que resultan en el deterioro de funciones corporales específicas, o para proporcionar una mejora en una o más de los parámetros medidos clínicamente de una enfermedad.

El término "cantidad profilácticamente efectiva" significa la cantidad de un fármaco farmacéutico que evitará o reducirá el riesgo de ocurrencia del evento biológico o médico que se busca prevenir en un tejido, un sistema, un animal o humano por un investigador, veterinario, médico u otro clínico.

50 El término "ventana terapéutica" significa el rango de dosis entre la cantidad mínima para lograr cualquier cambio terapéutico y la cantidad máxima que da como resultado una respuesta que es la respuesta inmediatamente antes de la toxicidad para el paciente.

55 Por "en riesgo de insuficiencia cardíaca congestiva" se entiende una persona que fuma, es obesa (es decir, 20% o más por encima de su peso ideal), ha estado o estará expuesta a un compuesto cardiotóxico (tal como un antibiótico de antraciclina), o tiene (o ha tenido) presión arterial alta, cardiopatía isquémica, infarto de miocardio, un defecto genético que se sabe que aumenta el riesgo de insuficiencia cardíaca, antecedentes familiares de insuficiencia

cardíaca, hipertrofia miocárdica, miocardiopatía hipertrófica, disfunción sistólica del ventrículo izquierdo, cirugía de derivación coronaria, enfermedad vascular, aterosclerosis, alcoholismo, pericarditis, una infección viral, gingivitis o un trastorno alimentario (por ejemplo, anorexia nerviosa o bulimia), o es un adicto al alcohol o la cocaína.

5 Por "disminución de la progresión del adelgazamiento del miocardio" se entiende mantener la hipertrofia de los cardiomiocitos ventriculares de modo que se mantenga o aumente el grosor de la pared ventricular.

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

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

15 Por "neurregulina-1", "NRG-1", "herregulina", "GGF2" o "ligando p185erbB2" se entiende un péptido que se une al receptor ErbB2 cuando se combina con otro receptor (ErbB1, ErbB3 o ErbB4) y está codificado por el gen del ligando p185erbB2 descrito en la Patente de los Estados Unidos No. 5,530,109; Patente de los Estados Unidos No. 5,716,930; y la Patente de los Estados Unidos No. 7,037,888.

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

20 Por "dominio similar al factor de crecimiento epidérmico" o "dominio similar al EGF" se entiende un motivo peptídico codificado por el gen NRG-1, NRG-2 o NRG-3 que se une y activa ErbB2, ErbB3, ErbB4, o combinaciones de los mismos, y tiene una similitud estructural con el dominio de unión al receptor de EGF como se describe en Holmes et al., Science 256: 1205-1210, 1992; Pat. No. 5,530,109; Pat. No. 5,716,930; Pat. No. 7,037,888; 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 9-14 para las secuencias de aminoácidos y nucleicos correspondientes a los dominios EGFL 1-6 codificados por el gen NRG-1.

25 Por "anticuerpo anti-ErbB2" o "anticuerpo anti-HER2" se entiende un anticuerpo que se une específicamente al dominio extracelular del receptor ErbB2 (también conocido como HER2 en humanos) y evita la señal dependiente de ErbB2 (HER2) transducción iniciada por la unión de neurregulina.

30 Por "célula transformada" se entiende una célula (o un descendiente de una célula) en la que se ha introducido una molécula de ADN que codifica una neurregulina o péptido que tiene un dominio similar a la neurregulina EGF, mediante técnicas de ADN recombinante o gen conocido técnicas de terapia.

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

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

40 Por "vector de expresión" se entiende un plásmido o virus genéticamente modificado, derivado, por ejemplo, de un bacteriófago, adenovirus, retrovirus, poxvirus, herpesvirus o cromosoma artificial, que se utiliza para transferir un péptido (por ejemplo, una neurregulina) secuencia codificante, operativamente unida a un promotor, en una célula huésped, de modo que el péptido o péptido codificado se exprese dentro de la célula huésped.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención.

45 La discusión de documentos, actas, materiales, dispositivos, artículos y similares se incluye en esta especificación únicamente con el fin de proporcionar un contexto para la presente invención. No se sugiere ni se representa que alguno o todos estos asuntos formaran parte de la base de la técnica anterior o constituyeran conocimiento general común en el campo relevante para la presente invención antes de la fecha de prioridad de cada reivindicación de esta solicitud.

50 Otras realizaciones

Aunque la invención se ha descrito en relación con realizaciones específicas de la misma, se entenderá que es capaz de realizar modificaciones adicionales y esta solicitud está destinada a cubrir cualquier variación, uso o adaptación de la invención que sigue, en general, principios de la invención e incluyendo tales desviaciones de la presente divulgación dentro de la práctica conocida o habitual dentro de la técnica a la que pertenece la invención y se puede aplicar a las

características esenciales expuestas anteriormente en este documento, y sigue en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

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

5 Ejemplos

Como se indicó anteriormente en este documento, las neurregulinas son una familia de factores de crecimiento estructuralmente relacionados con el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) y son esenciales para el desarrollo normal del corazón. La evidencia sugiere que las neurregulinas son un potencial terapéutico para el tratamiento de enfermedades del corazón, incluyendo insuficiencia cardíaca, infarto de miocardio, toxicidad quimioterapéutica y miocarditis viral.

Los estudios descritos en el presente documento sirvieron para definir la dosificación en el modelo de ligadura de la arteria descendente anterior izquierda (LAD) de insuficiencia cardíaca congestiva en la rata. Se clonaron y produjeron múltiples variantes de empalme de neurregulina. Se comparó un fragmento de neurregulina que consiste en el dominio similar a EGF (EGF-Id) de informes anteriores (Liu et al., 2006) con una neurregulina de longitud completa conocida como factor de crecimiento glial 2 (GGF2) y el dominio similar a EGF con el dominio Ig (EGF-Ig). Ratas Sprague-Dawley macho y hembra se sometieron a ligadura de arterias LAD. A los 7 días después de la ligadura, las ratas se trataron intravenosamente (iv) con neurregulina diariamente. La función cardíaca se monitorizó mediante ecocardiografía.

El primer estudio comparó 10 días de dosificación con cantidades equimolares de EGF-Id o GGF2 (para GGF2 esto se calcula a 0.0625 y 0.325 mg/kg). El tratamiento con GGF2 dio como resultado una mejora significativamente ($p < 0.05$) mayor en la Fracción de Eyección (EF) y el Acortamiento Fraccional (FS) que el EGF-Id al final del período de dosificación. El segundo estudio comparó 20 días de GGF2 con EGF-Id y EGF-Ig a concentraciones equimolares. El tratamiento con GGF2 dio como resultado una mejora significativa de EF, FS y LVEDD ($p < 0.01$). Las mejoras en la fisiología cardíaca no se mantuvieron durante este período con EGF-Id o EGF-Ig. El tercer estudio comparó la dosis diaria (q 24 horas), cada dos días (q 48 horas) y cada cuatro días (q 96 horas) durante 20 días con GGF2 (3.25 mg/kg). Los tres regímenes de tratamiento con GGF2 dieron como resultado mejoras significativas en la fisiología cardíaca, incluidos EF, ESV y EDV, y los efectos se mantuvieron durante 10 días después de la finalización de la dosificación. Los estudios presentados aquí confirman que GGF2 es el compuesto principal de neurregulina y establecen regímenes de dosificación óptimos para administrarlo.

Como se muestra en el presente documento, los presentes estudios establecen la eficacia relativa de GGF2 en comparación con los fragmentos de neurregulina publicados (Liu et al., 2006), inician estudios de rango de dosis y frecuencia de dosis, y determinan si se requiere excipiente de BSA como se informó previamente.

Métodos y materiales

Clonación, expresión y purificación del dominio IgEGF (Ig154Y) del ADN GGF2 (EGF-Ig): el dominio IgEGF se amplificó a partir de un ADNc de GGF2 existente y se clonó en el vector pet 15b (Novagen cat # 69661-3) usando Nde1 y sitios de restricción BamH1. La proteína resultante es una etiqueta His de 21.89 kDa + ~3kDa (= ~25 kDa).

Secuencia de ADN del clon IgEgf pet 15: Las secuencias subrayadas son los cebadores utilizados para la amplificación. Las secuencias en negrita son los sitios de clonación utilizados para insertar la secuencia en el vector pet (Nde1 y BamH1).

CATATGttgcctccccaattgaaagagatgaaaagccaggaatcggctgcaggttccaaa
 L P P Q L K E M K S Q E S A A G S K
 ctatgccttcgggtgtgaaaccagttctgaatactcctctctcagattcaagtggttcaag
 L V L R C E T S S E Y S S L R F K W F K
 aatgggaatgaattgaatcgaaaaaacaaccacaaaatatcaagatacaaaaaaagcca
 N G N E L N R K N K P Q N I K I Q K K P
 gggaagtcagaacttcgcattaacaagcatcactggctgattctggagagtatatgtgc
 G K S E L R I N K A S L A D S G E Y M C
 aaagtgatcagcaaattaggaatgacagtgccctctgccaatatcaccatcgtggaatca
 K V I S K L G N D S A S A N I T I V E S
 aacgctacatctacatccaccactgggacaagccatcttgtaaaatgtgoggagaaggag
 N A T S T S T T G T S H L V K C A E K E
 aaaactttctgtgtgaatggaggggagtgcttcatggtgaaagacctttcaaacccctcg
 K T F C V N G G E C F M V K D L S N P S
 agatacttgtgcaagtgcccaaattgagtttactggtgatcgcctgccaaaactacgtaatg
 R Y L C K C P N E F T G D R C Q N Y V M
gccagcttctacGGATCC (SEQ ID NO: 15)
 A S F Y (SEQ ID NO: 16)

La proteína traducida final del vector pet15b se muestra a continuación. La porción del vector está subrayada.

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

5 Expresión de proteínas: El clon se transformó en células B121 para la expresión de proteínas usando el Sistema de Autoinducción Express Overnight (Novagen) en medio LB a 25°C durante 24 horas.

Replegamiento de proteínas: Adaptado del kit de replegamiento de proteínas Novagen, 70123-3.

Purificación de proteínas: Sus columnas TRAP - según las instrucciones del fabricante.

10 Inmunotransferencia Western: La expresión de proteínas se evaluó mediante inmunotransferencia Western. La banda resultante con la etiqueta His corre a unos 25 kD.

15 Se usó un gel de criterio 4-20% (Biorad) para la resolución de la proteína seguido de transferencia sobre papel de nitrocelulosa Protran (tamaño de poro de 0.1 µm de Schleicher and Schull). La mancha se bloquea en leche al 5% en TBS-T (0.1%). Anticuerpo primario (Anti EGF Human NRG 1-alpha/HRG1-alpha Affinity Purified Polyclonal Ab Cat # AF-296-NA de R&D systems) Dilución 1:1000 en leche al 5% en TBS-T- 1 hora a temperatura ambiente (también funciona a 4°C durante la noche). Se usó anticuerpo secundario de conejo HRP anti cabra a una dilución 1:10.000 en leche al 5% en TBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente. Todos los lavados se realizaron en TBS-T.

ES 2 763 184 T3

Protocolo de purificación para Ig154Y: Los cultivos se hacen crecer a 25°C en el sistema de autoinducción expreso nocturno 1 de Novagen (cat # 71300-4). El cultivo se centrifuga y los gránulos se extraen, se solubilizan y se vuelven a plegar para adquirir la Ig154Y antes de que pueda tener lugar la purificación.

Materiales para extracción, solubilización y replegamiento:

- 5 Regulador de lavado 10X: Tris-HCl 200 mM, pH 7.5, EDTA 100 mM, Triton X-100 al 10%
- Regulador de solubilización 10X: 500 mM CAPS, pH 11.0
- Regulador de diálisis 50X: Tris-HCl 1 M, pH 8.5
- 30% de N-laurilsarcosina - agregar como polvo (Sigma 61739-5G) 1M DTT
- Glutati3n reducido (Novagen 3541)
- 10 Glutati3n oxidado (Novagen 3542)
- A. Lisis celular y preparaci3n de cuerpos de inclusi3n
- Los sedimentos celulares se descongelaron y se volvieron a suspender en 30 ml de regulador de lavado 1X.
 - Se a1adieron a la suspensi3n inhibidores de proteasa (25 ul de 10X por 50 ml), DNasa (200 ul de 1 mg/ml por 50 ml) y MgCl₂ (500 ul de 1 M por 50 ml).
- 15
- Las c3lulas se sometieron a lisis por sonicaci3n con enfriamiento en hielo.
 - Tras la sonicaci3n, los cuerpos de inclusi3n se recogieron por centrifugaci3n a 10000 x g durante 12 minutos.
 - Se retir3 el sobrenadante y se volvi3 a suspender completamente el sedimento en 30 ml de regulador de lavado 1X.
 - Se repiti3 el paso 4.
 - El sedimento se resuspendi3 completamente en 30 ml de regulador de lavado 1X.
- 20
- Los cuerpos de inclusi3n se recogieron por centrifugaci3n a 10000 x g durante 10 minutos.
- B. Solubilizaci3n y replegamiento.
- A partir del peso h3medo de los cuerpos de inclusi3n a procesar, se calcula la cantidad de regulador de solubilizaci3n 1X necesaria para resuspender los cuerpos de inclusi3n a una concentraci3n de 10-15 mg/ml. Si el volumen calculado es superior a 250 ml, use 250 ml.
- 25
- A temperatura ambiente, preparar el volumen calculado de regulador de solubilizaci3n 1X suplementado con 0.3% de N-laurilsarcosina (se puede usar hasta 2% si es necesario para una mayor optimizaci3n) (300 mg/100 ml de regulador) y 1 mM de DTT.
 - Agregar la cantidad calculada de regulador de solubilizaci3n 1X del paso 2 a los cuerpos de inclusi3n y mezclar suavemente. Los desechos grandes se pueden romper por pipeteo repetido.
- 30
- Incubar en el agitador del refrigerador a 25°C, 50-100 rpm durante 4-5 horas (o m1s si es necesario para una mayor optimizaci3n).
 - Aclarar por centrifugaci3n a 10000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente.
 - Transferir el sobrenadante que contiene la prote3na soluble a un tubo limpio.
- C. Protocolo de di1lisis para el replegamiento de prote3nas
- 35
- Preparar el volumen requerido de regulador para la di1lisis de prote3nas solubilizadas. La di1lisis debe realizarse con al menos 2 cambios de regulador de m1s de 50 veces el volumen de la muestra. Diluir el regulador de di1lisis 50X a 1X en el volumen deseado y complemente con DTT 0.1 mM.
 - Dializar durante al menos 4 horas a 4°C. Cambiar el regulador y continuar. Dializar por 4 o m1s horas adicionales.
 - Preparar un regulador de di1lisis adicional como se determina en el paso 1, pero omita la TDT.
- 40
- Continuar la di1lisis a trav3s de dos cambios adicionales (minutos 4 horas cada uno), con el regulador de di1lisis sin DTT.
- D. Regulador de replegamiento r3dox para promover la formaci3n de enlaces disulfuro

ES 2 763 184 T3

- Preparar un regulador de diálisis que contenga glutatión reducido 1 mM (1.2 g/4L) y glutatión oxidado 0.2 mM (0.48 g/4L) en regulador de diálisis 1X. El volumen debe ser 25 veces mayor que el volumen de la muestra de proteína solubilizada. Enfriar a 4°C.

- Dializar la proteína replegada del paso 1 durante la noche a 4°C.

5 Materiales para purificación

Todos los procedimientos se realizan a 4°C.

Productos químicos:

Clorhidrato de Trizma (Sigma T5941-500G)

Solución de cloruro de sodio 5M (Sigma S6546-4L)

10 Hidróxido de sodio 10N (JT Baker 5674-02)

Imidazol (JT Baker N811-06)

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

Regulador A: Tris-HCL 20 mM + NaCl 500 mM pH 7.5

Regulador B: Regulador A + 500 mM Imidazol pH 7.5

15 Equilibrio de columna: Regulador A-5CV, Regulador B-5CV, Regulador A-10CV Cargar 20 ml de muestra por análisis en una columna de 20 ml a 0.5 ml/min.

Lavar la columna con 5CV de regulador A

Eluir columna con 5CV de imidazol 280mM.

Limpiar con 10CV de 100% de regulador B.

20 Equilibrar con 15CV de regulador A

Analizar fracciones con una mancha de plata en SDS-page

Reunir fracciones con Ig154Y

B. Eliminación de His-Tag

La eliminación de la etiqueta His se realiza con un kit de captura de escisión de trombina de Novagen (Cat# 69022-3).

25 Según las pruebas anteriores, las mejores condiciones son la temperatura ambiente durante 4 horas con trombina a 0.005U de enzima por μ l por cada 10 μ g de proteína Ig154Y. Después de cuatro horas de incubación, agregar 16 μ l de suspensión de estreptavidina agarosa por unidad de enzima trombina. Muestra de roca durante 30 minutos a temperatura ambiente. Recuperar la Ig154Y mediante filtración por rotación o filtrado estéril (dependiendo del volumen).

30 La escisión total se determina mediante EGF y inmunotransferencia Western anti-His.

C. Concentración de Ig154Y

Ajuste a la concentración deseada con el concentrador Millipore Centriprep 3000 MWCO 15 ml (Ultracel YM-3, 4320)

D. Almacenamiento en el regulador final

Se almacena en Tris 20 mM + NaCl 500 mM pH 7.5 y 1 X PBS + BSA al 0.2%.

35 Clonación, expresión y purificación de 156Q (EGF-Id) [NRG1b2 EGF dominio (156Q)]

ADN: El dominio NRG1b2 egf se clonó a partir de ADNc de cerebro humano y se clonó en el vector pet15b (Novagen cat # 69661-3) usando sitios de restricción Nde1 y BamH1. La proteína resultante es una etiqueta His de 6.92 kDa + ~3kDa (= 9.35 kDa).

Secuencia de ADN de NRG1b2 egf pet 15 clon

40 Las secuencias subrayadas son los sitios de clonación (Nde1 y BamH1)

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

La proteína traducida final del vector pet15b se muestra a continuación. El dominio egf se resalta en verde.

10 20 30
 MGSSHHHHH SGLVPRGSH MSHLVKCAEK EKTFCVNGGE CFMVKDLSNP
 60 70 80
SRYLCKCPNE FTGDRCONYV MASFYKAEEL YQ (SEQ ID NO: 19)

pl/Mw calculado: 7.69/9349.58

5 Expresión de proteínas

El clon se transformó en células B121 para la expresión de proteínas usando el Overnight Express Autoinduction System (Novagen) en medios LB a 25°C durante 24 horas. La expresión es principalmente en cuerpos de inclusión insolubles.

Replegamiento de proteínas: Adaptado del kit de replegamiento de proteínas Novagen, 70123-3.

10 Purificación de proteínas: La proteína se carga en una columna de intercambio aniónico DEAE a 2.5 ml/min. El fragmento EGF-Ig permanece en el flujo, mientras que los contaminantes se unen y eluyen en una sal más alta. El regulador de carga y lavado es Tris 50 mM pH 7.9 y el regulador de elución es Tris 50 mM pH 7.9 con NaCl 1 M. El flujo a través se agrupa y se concentra con Centriprep YM-3 de Millipore.

15 Inmunotransferencia Western: La expresión de proteínas se evalúa mediante inmunotransferencia Western. La banda resultante funciona a alrededor de 10 kD.

20 Se usó un gel de criterio 4-20% (Biorad) para la resolución de la proteína seguido de transferencia sobre papel de nitrocelulosa Protran (tamaño de poro de 0.1 µm de Schleicher AND Schull). La mancha se bloquea en leche al 5% en TBS-T (0.1%). Anticuerpo primario (Anti EGF Human NRG1-alpha/HRG1-alpha Affinity Purified Polyclonal Ab Cat # AF-296-NA de R&D systems) Dilución 1:1000 en leche al 5% en TBS-T- 1 hora a temperatura ambiente (también funciona a 4°C durante la noche). Se usó anticuerpo secundario de conejo HRP anti cabra a una dilución 1:10.000 en leche al 5% en TBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente. Todos los lavados se realizaron en TBS-T

Protocolo de purificación para NRG-156Q

25 Los cultivos se hacen crecer a 25°C en Overnight Express Autoinduction System 1 de Novagen (cat# 71300-4). Hay muy poco NRG-156Q soluble (EGF-Ig) presente. El cultivo se centrifuga y los gránulos se extraen, solubilizan y vuelven a plegar para adquirir el NRG-156Q antes de que pueda tener lugar la purificación.

Materiales para extracción, solubilización y replegamiento:

Regulador de lavado 10X: Tris-HCl 200 mM, pH 7.5, EDTA 100 mM, Triton X-100 al 10%

Regulador de solubilización 10X: 500 mM CAPS, pH 11.0

Regulador de diálisis 50X: Tris-HCl 1 M, pH 8.5

30 30% de N-laurilsarcosina - agregar como polvo (Sigma 61739-5G) 1M DTT

Glutatión reducido (Novagen 3541)

Glutatión oxidado (Novagen 3542)

A. Lisis celular y preparación de cuerpos de inclusión

35 • Descongelar y volver a suspender el sedimento celular en 30 ml de regulador de lavado 1X. Mezclar según sea necesario para la resuspensión completa.

• Agregar inhibidores de proteasa (25 ul de 10X por 50 ml), DNasa (200 ul de 1 mg/ml por 50 ml) y MgCl₂ (500 ul de 1 M por 50 ml) a la suspensión.

- Someter a lisis las células por sonicación.
 - a. Enfriar las células en hielo durante este paso.
 - b. Usando la punta cuadrada, someter a sonicación durante 30 segundos en el nivel 6, 10 veces hasta que la suspensión se volver menos viscosa. Dejar que la suspensión se enfríe en hielo durante 60 segundos entre cada sonicación. Mantener un volumen no superior a 40 ml en un tubo cónico de 50 ml al someter a sonicación.
- 5
- Cuando esté completo, transferir cada suspensión a botellas de centrifuga de cuello angulado de 250 ml para usar con el rotor F-16/250.
 - Recoger los cuerpos de inclusión por centrifugación a 10.000 x g durante 12 minutos.
- 10
- Retirar el sobrenadante (guardar una muestra para el análisis de la proteína soluble) y volver a suspender completamente el sedimento en 30 ml de regulador de lavado 1X.
 - Repetir la centrifugación como en el paso 4 y guardar el sedimento.
 - Nuevamente, volver a suspender completamente el sedimento en 30 ml de regulador de lavado 1X.
 - Recoger los cuerpos de inclusión por centrifugación a 10.000 x g durante 10 minutos. Decantar el sobrenadante y eliminar los últimos restos de líquido golpeando el tubo invertido sobre una toalla de papel.
- 15
- B. Solubilización y replegamiento.
- A partir del peso húmedo de los cuerpos de inclusión a procesar, calcular la cantidad de regulador de solubilización 1X necesaria para resuspender los cuerpos de inclusión a una concentración de 10-15 mg/ml. Si el volumen calculado es superior a 250 ml, usar 250 ml.
- 20
- A temperatura ambiente, preparar el volumen calculado de regulador de solubilización 1X suplementado con 0.3% de N-laurilsarcosina (se puede usar hasta 2% si es necesario para una mayor optimización) (300 mg/100 ml de regulador) y 1 mM de DTT.
 - Agregar la cantidad calculada de regulador de solubilización 1X del paso 2 a los cuerpos de inclusión y mezclar suavemente. Los desechos grandes se pueden romper por pipeteo repetido.
 - Incubar con agitador en refrigeración a 25°C, 50-100 rpm durante 4-5 horas.
- 25
- Aclarar por centrifugación a 10.000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- C. Protocolo de diálisis para el replegamiento de proteínas
- Preparar el volumen requerido de regulador para la diálisis de proteínas solubilizadas. La diálisis debe realizarse con al menos 2 cambios de regulador de más de 50 veces el volumen de la muestra.
 - Diluir el regulador de diálisis 50X a 1X en el volumen deseado y complementar con DTT 0.1 mM.
- 30
- Dializar durante al menos 4 horas a 4°C. Cambia el regulador y continúa. Dializar por 4 o más horas adicionales.
 - Preparar un regulador de diálisis adicional como se determina en el paso 1, pero omita la DTT.
 - Continuar la diálisis a través de dos cambios adicionales (minutos 4 horas cada uno), con el regulador de diálisis sin DTT.
- D. Regulador de redoblamiento rédox para promover Formación de enlace disulfuro B
- 35
- Preparar un regulador de diálisis que contenga glutatión reducido 1 mM (1.2 g/4L) y glutatión oxidado 0.2 mM (0.48 g/4l) en regulador de diálisis 1X. El volumen debe ser 25 veces mayor que el volumen de la muestra de proteína solubilizada. Enfriar a 4°C.
 - Dializar la proteína replegada del paso 1 durante la noche a 4°C.
- Materiales para purificación
- 40
- Todos los procedimientos se realizan a 4°C.
- Productos químicos:
- Clorhidrato de Trizma (Sigma T5941-500G)
- Solución de cloruro de sodio 5M (Sigma S6546-4L)

Hidróxido de sodio 10 N (JT Baker 5674-02)

E. Purificación en la columna aniónica DEAE HiPrep 16/10-20 ml (GE Healthcare)

Regulador A: 50 mM Tris-HCL pH 8.0

Regulador B: Tris-HCL 50 mM con NaCl 1M pH 8.0

5 Equilibrio de columna: Regulador A- 5CV, Regulador B- 5CV, Regulador A- 10CV

- Cargar 50 ml de muestra por análisis en una columna de 20 ml a 2.0 ml/min (NRG-156 (EGF-Id) está en el flujo).

- Lavar la columna de 20 ml con 5CV de regulador A

Columna de 20 ml con gradiente al 100% de B con 5CV. Esto es para eluir contaminantes.

- Limpiar con 10CV de 100% de regulador B.

10 • Equilibrar con 15CV de regulador A

- Analizar fracciones con una mancha plateada SDS-page

- Reunir fracciones con NRG-156Q (10kDa)

F. Concentración de NRG-156 (EGF-Id)

- Concentrado con concentrador Millipore Centriprep 3000 MWCO 15 ml (Ultracel YM-3, 4320)

15 • Utilizar el ensayo modificado de proteínas Lowry para determinar la concentración.

G. Eliminación de His-Tag

La eliminación de la etiqueta His se realiza con un kit de captura de escisión de trombina de Novagen (Cat# 69022-3). Según las pruebas anteriores, las mejores condiciones son temperatura ambiente durante 4 horas con trombina a 0.005 U de enzima por μ l por cada 10 μ g de proteína NRG-156Q (EGF-Id). Después de cuatro horas de incubación, agregar 16 μ l de suspensión de estreptavidina agarosa por unidad de enzima trombina. Agitar la muestra durante 30 minutos a temperatura ambiente. Recuperar el NRG-156Q mediante filtración por rotación o filtración estéril (según el volumen). La escisión completa se determina con un EGF y Anti-His Western.

20

H. Almacenamiento en el regulador final

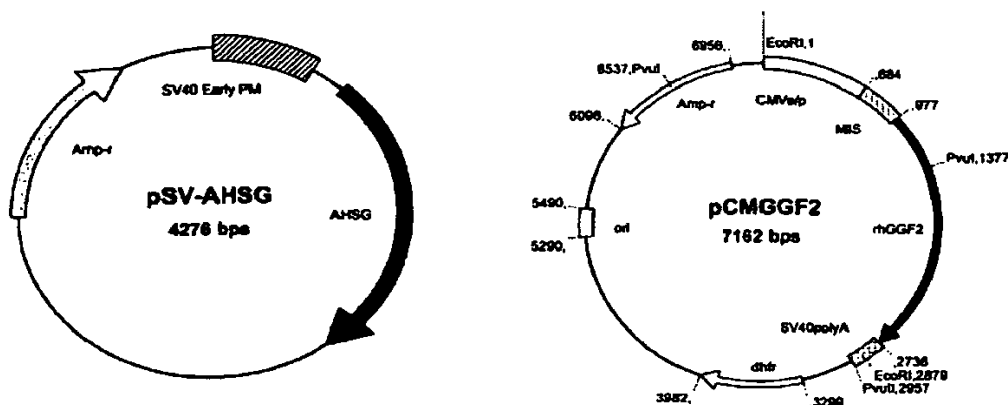
Almacenado en 1 X PBS con 0.2% de BSA a 4°C.

25 Expresión y purificación de GGF2

Para la información de clonación y antecedentes para GGF2, véase USPN 5,530,109. La línea celular se describe en USPN 6,051,401. El contenido completo de cada una de las USPN 5,530,109 y USPN 6,051,401.

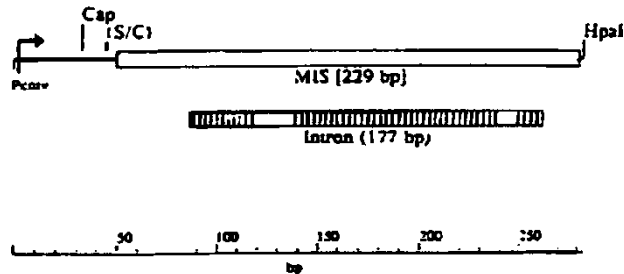
Línea celular CHO-(Alpha2HSG)-GGF: Esta línea celular fue diseñada para producir cantidades suficientes de fetuina (alpha2HSG humano) para soportar altas tasas de producción de rhGGF2 en condiciones libres de suero.

30 Las células Cho (dhfr-) se transfectaron con el vector de expresión que se muestra a continuación (pSV-AHSG). Se cultivaron células estables bajo selección con ampicilina. Se designó la línea celular (dhfr-/alpha2HSGP). Las células dhfr-/alpha2HSGP se transfectaron luego con el vector pCMGGF2 que se muestra a continuación que contiene la secuencia de codificación para GGF2 humano usando el reactivo lípido catiónico DMRIE-C (Life Technologies #10459-014).



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

- 5 Para mejorar la transcripción, la secuencia de codificación de GGF2 se colocó después de la secuencia intermedia de EBV BMLF-1 (MIS). Véanse diagramas a continuación.



Secuencia MIS (SEQ ID NO: 20)

CGATIAACTAGCAGCATTTCCTCCAACGAGGATCCCGCAG
(GTAAGAAGCTACACCGGCCAGTGGCCGGGGCC
CGATAACTAGCAGCATTTCCTCCAACGAGGATCCCGCAG(GTAAGAAGCTACACCGGCC
AGTGGCCGGGGCC
GTGGAGCCGGGGGCATCCGGTGCCTGAGACAGAGGTGCTCAAGGCAGTCTCCACCTTTT
GTCTCCCCTCTGCAG) AGAGCCACATTCTGGAA] GTT

- 10 Secuencia de codificación GGF2 (SEQ ID NO: 1) –

ES 2 763 184 T3

atgagatgg cgacgcgcc cgcgcgctc cgggcgtccc
 301 ggcccccggg cccagcgcgc cggctccgcc gcccgcctgt cgcgcgcgt gccgctgctg
 361 ccaactactgc tgctgctggg gaccgcggcc ctggcgccgg gggcggcggc cggcaacgag
 421 gcggetcccg cgggggcctc ggtgtgctac tcgtccccgc ccagcgtggg atcggtgca
 481 gagctagctc agcgcgcgcg ggtggtgatc gagggaaagg tgcacccgca gcggcggcag
 541 cagggggcac tcgacaggaa ggcggcggcg gcggcggcg aggcagggc gtggggcggc
 601 gatcgcgagc cgcagccgc gggcccacgg gcgctggggc cgcgcgcga ggagccgctg
 661 ctgcgcgcca acgggaccgt gccctcttgg cccaccgcc cggtgcccag cgcggcgag
 721 cccggggagg aggcgccta tctggtgaag gtgcaccagg tgtgggcggt gaaagccggg
 781 ggcttgaaga aggactcgt gctcaccgtg gcctgggga cctggggcca cccgccttc
 841 ccctcctgcg ggaggctcaa ggaggacagc aggtacatct tcttcatgga gcccgacgcc
 901 aacagcacca gccgcgcgc gccgccttc cgagcctct tccccctct ggagacgggc
 961 cggaaacctca agaaggaggt cagccgggtg ctgtgcaagc ggtgcgcctt gcctcccaa
 1021 ttgaaagaga tgaaaagcca ggaatcggct gcaggtcca aactagtcct tcggtgtgaa
 1081 accagttctg aatactcctc tctcagattc aagtggttca agaattggaa tgaattgaat
 1141 cgaaaaaaca aaccacaaaa tatcaagata caaaaaaagc cagggaaagtc agaacttcgc
 1201 attaacaaaag catcactggc tgattctgga gagtatatgt gcaaagtgat cagcaatta
 1261 ggaaatgaca gtgcctctgc caatatcacc atcgtggaat caaacgctac atctacatcc
 1321 accactggga caagccatct tgtaaaatgt gcggagaagg agaaaacttt ctgtgtgaat
 1381 ggaggggagt gcttcatggt gaaagacctt tcaaaccct cgagatactt gtgcaagtgc
 1441 ccaaatgagt ttactggtga tcgctgcaa aactacgtaa tggccagctt ctacagtacg
 1501 tccactcct ttctgtctct gcctgaatag

Secuencia de proteínas GGF2 (SEQ ID NO: 2) –

**MRWRRAPRRSGRPGPRAQRPGSAARSSPPLPLLPLLLLGTAAAL
 APGAAAGNEAAPAGASVCYSSPPSVGSVQELAQRAAVVIEGKVHPQRRQQGALDRKAA
 AAAGEAGAWGGDREPPAAGPRALGPPAEEPLLAANGTVPSWPTAPVPSAGEPGEEAPY
 LVKVHQVWAVKAGGLKKDSSLTVRLGTWGHPAFPSCGRLKEDSRYIFFMEPDANSTSR
 APAAFRASFPPLETGRNLKKEVSRVLCRRCALPPQLKEMKSQESAAGSKLVLRCESS
 EYSSLRFKWFKNGNELNRKNKPQNIKIQKPKGSELRINKASLADSGEYMCKVISKLG
 NDSASANITIVESNATSTSTTGTSHLVKCAEKEKTFVNGGECFMVKDLSNPSRYLCK
 CPNEFTGDRCQNYVMASFYSTSTPFLSLPE**

- 5 Producción de GGF2: Se descongeló un vial de GGF2 a 2.2 x 10⁶ células/ml en 100 ml de Medio 1 de Acorda (véase la Tabla 3) y se expandió hasta alcanzar cantidades suficientes para los recipientes de producción de semillas. Las células se inocularon en los medios de producción Acorda Medium 2 (véase la Tabla 4) a 1.0 x 10⁵ células/ml en botellas para rodillos ventilados de dos litros. Las botellas para rodillo se mantienen a 37°C durante 5 días y luego se reducen a 27°C durante 26 días. Las botellas para rodillos se controlan en cuanto a recuento celular y la apariencia

ES 2 763 184 T3

general, pero no reciben alimento. Una vez que la viabilidad es inferior al 10%, las células se extienden y los medios acondicionados se recogen y se filtran en esterilidad.

Tabla 3: Medio 1

Ítem	Proveedor	Número de Catálogo	Concentración final
CD-CHO	Invitrogen	10743-029	-Retirar 50 ml, luego agregar los componentes a continuación
FeSO ₄ .EDTA	Sigma	F-0518	1x (10 ml/L)
L-Glutamina	Cellgro	25-005-CI	4 mM (20 ml/L)
Insulina humana recombinante	Sigma	I-9278	290 U/L (1 ml/L)
Aminoácido no esencial	Cellgro	25-025-CI	1x (10 ml/L)
Peptona Tipo 4 Soja-HySoy	Sigma	P0521	Polvo – Se hace 20X en CD-CHO (50ml/L)
Gentamicina	Invitrogen	15750-078	100 µg (2 ml/L)

5

Tabla 4: Medio 2

Ítem	Proveedor	Número de Catálogo	Concentración final
CD-CHO	Invitrogen	10743-029	50% (-50ml primero)
HyQ SFX-CHO	HyClone	SH30187.02	50% (-50ml primero)
FeSO ₄ .EDTA	Sigma	F-0518	1x (10 ml/L)
L-Glutamina	Cellgro	25-005-CI	4 mM (20 ml/L)
Insulina humana recombinante	Sigma	I-9278	290 U/L (1 ml/L)
Aminoácido no esencial	Cellgro	25-025-CI	1x (10 ml/L)
Peptona Tipo 4 Soja-HySoy	Sigma	P0521	Polvo - Hecho 20X en CD-CHO (50ml/L)
Gentamicina	Invitrogen	15750-078	100 µg (2 ml/L)

Protocolo de purificación para GGF2

Todos los procedimientos se realizan a 4°C.

Productos químicos:

10 Acetato de sodio

Ácido acético glacial (para ajuste de pH)

ES 2 763 184 T3

NaOH 10N (para ajuste de pH)

NaCl

Sulfato de sodio

L-Arginina (JT Baker cat #: 2066-06)

5 Manitol (JT Baker cat #: 2553-01)

Material de partida: Sobrenadante de medio acondicionado. Ajustar el pH a 6.5. Paso 1:

Captura- Cromatografía de intercambio catiónico

HiPrep SP 16/10 (Amersham Biosciences)

Equilibrio de columna: Regulador A - 5CV, regulador B - 5CV, regulador 15% B - 5CV

10 Regulador A: Acetato de Na 20 mM, pH 6.0

Regulador B: Acetato de Na 20 mM, pH 6.0, 1M NaCl

Cargar la muestra a 2 ml/min con una carga continua durante la noche si es posible. La unión es mejor con carga continua.

Capacidad máxima para una muestra inicial: 5 mg de GGF2/ml de medio

15 Velocidad de flujo: 3 ml/min

Primer lavado: 15% B, 10CV

Segundo lavado: 35% B, 10CV

Elución de GGF2: 60% B, 8CV

Lavado de columna: 100% B, 8CV

Reguladores	Composiciones	Conductividad	Utilizar
15%B	Acetato de Na 20 mM, pH 6.0, 150 mM NaCl		Preequilibrio Primer lavado
35%B	Acetato de Na 20 mM, pH 6.0, 350 mM NaCl		Segundo lavado
60%B	Acetato de Na 20 mM, pH 6.0, 600 mM NaCl		Elución de GGF2
100%B	Acetato de Na 20 mM, pH 6.0, 1000 mM NaCl	88 mS/cm	Lavado de columna

20

Paso 2:

Refinamiento - Cromatografía de filtración en gel

Sephacryl S200 26/60

Regulador de elución:

25 Acetato de Na 20 mM, Sulfato de sodio 100 mM, manitol al 1%.

L-Arginina 10 mM, pH 6.5

Regulador de conductividad:

Muestra: Conjunto de elución SP GGF2 concentrado hasta ~ AU280 1.0

Velocidad de flujo: 1.3 ml/min.

30 Pico de elución: a ~ 0.36CV desde el inicio de la inyección

Paso 3: Eliminación de ADN y endotoxinas: filtración a través de la membrana Intercept Q.

Regulador de preequilibrio:

Acetato de Na 20 mM, Sulfato de sodio 100 mM, manitol al 1%,

L-Arginina 10 mM, pH 6.5

5 Recoge el flujo a través

Paso 4: Formulación final y preparación de la muestra

Agregar L-Arginina 90 mM adicional a la muestra

Concentrado

Filtración estéril

10 El artículo de vehículo/control utilizado en este documento es 0.2% de albúmina de suero bovino (BSA), fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.6.

Se usan cepas de ratas CD®IGS [CrI:CD®(SD)/MYOINFARCT] y Naive Sprague Dawley en el presente documento. Estas cepas fueron adquiridas de Charles River Laboratories. Los animales de prueba tienen aproximadamente 6-7 semanas de edad al llegar y pesan aproximadamente 160-200 g, en el momento del procedimiento quirúrgico. El rango real puede variar y está documentado en los datos.

15

Todos los animales ingenuos Sprague Dawley recibidos fueron puestos en estudio y asignados al Grupo 1. Los animales considerados adecuados para el estudio fueron pesados antes del tratamiento.

Todos los animales CD®IGS [CrI: CD®(SD)/MYOINFARCT] recibidos se aleatorizaron en grupos de tratamiento (Grupos 2-5) usando un procedimiento de aleatorización simple basado en la Fracción de Eyección calculada de los exámenes ecocardiográficos realizados el día 7 después de la cirugía procedimiento realizado en Charles River Laboratories. Se realizó una aleatorización simple para dar como resultado que cada grupo de tratamiento (Grupos 2-5) constara de un número aplicable de animales que resultara en una Fracción de Eyección media del grupo aproximadamente igual (\pm 3%) en el Grupo 2-5.

20

Todos los animales en el Grupo 2-6 se aclimataron en Charles River Laboratories de acuerdo con los Procedimientos Operativos Estándar de ese laboratorio. Los animales fueron aleatorizados posteriormente en grupos de tratamiento. Todos los animales ingenuos en el Grupo 1 se aclimataron durante aproximadamente 24 horas después de la recepción antes de sus exámenes ecocardiográficos primarios.

25

Los animales se alojaron individualmente en jaulas suspendidas de acero inoxidable, tipo malla de alambre, en general no se usaron jaulas de fondo sólido porque los roedores son coprofágicos y la ingestión de heces que contienen artículos de prueba excretados y productos metabólicos o la ingestión del lecho en sí mismo podría confundir la interpretación de los resultados en este estudio de toxicidad.

30

Se proporcionó iluminación fluorescente a través de un temporizador automático durante aproximadamente 12 horas por día. En ocasiones, el ciclo oscuro se interrumpió de manera intermitente debido a actividades relacionadas con el estudio. La temperatura y la humedad se monitorearon y registraron diariamente y se mantuvieron en la máxima medida posible entre 64 a 79°F y 30 a 70%, respectivamente.

35

La dieta basal era la dieta de roedores con certificación Lab Diet® Block #5002, PMI Nutrition International, Inc. Esta dieta estaba disponible ad libitum a menos que se indique lo contrario. Cada número de lote utilizado se identificó en los registros del estudio. Se suministró agua del grifo ad libitum a todos los animales mediante un sistema de agua automático a menos que se indique lo contrario.

40 Diseños de estudio

Tabla 5: Fragmento GGF2 versus EGF-Id (Liu et al., 2006) Dosificado durante 10 días a partir del día 7 después de LAD

Grupo	Tratamiento	Duración de la vida	Dosis	Intervalo de dosificación†	Puntos de tiempo ECHO (postoperatorio)
1 (n = 5 M; n = 5 F)	Control (Vehículo)	17 días postoperatorio	Solo vehículo	24 horas	Día 6, 17

ES 2 763 184 T3

Grupo	Tratamiento	Duración de la vida	Dosis	Intervalo de dosificación†	Puntos de tiempo ECHO (postoperatorio)
2 (n =6 M; n = 6 F)	GGF2	17 días post	0.0625 mg/kg	24 Horas	Día 6, 17
3 (n = 6 M; n = 6 F)	GGF2	17 días post	0.625 mg/kg	24 Horas	Día 6, 17
4 (n = 6 M; n = 7 F)	EGF-Id	17 días post	Equimolar	24 Horas	Día 6, 17
5 (n = 7 M; n = 6 F)	EGF-Id	17 días post	Equimolar	24 Horas	Día 6, 17

Tabla 6: Dosis más altas de GGF2 en comparación con EGF-Id y EGF-Ig dosificadas durante 20 días a partir del día 7 después de LAD. Lavado de 10 días.

Grupo	Tratamiento	Duración de la vida	Dosis	Intervalo de dosificación†	Puntos de tiempo ECHO (postoperatorio)
1 (n = 5 M; n = 5 F)	N/A: Controles ingenuos de edad coincidente	30 días después de la ECHO primaria	NA	NA	‡Día 1, 12,22, & 32
2 (n=6M; n=6F)	Control (Vehículo)	38 días postoperatorio	Solo vehículo	24 Horas	*Día 7, 18, 28, & 38
3 (n=6M; n=6F)	GGF-2	38 días postoperatorio	0.625 mg/kg	24 Horas	*Día 7, 18, 28, & 38
4 (n =6 M; n= 7 F)	GGF-2	38 días postoperatorio	3.25 mg/kg	24 Horas	*Día 7, 18, 28, & 38
5 (n = 7 M; n = 6 F)	EGF-Id	38 días postoperatorio	Equimolar	24 Horas	*Día 7, 18, 28, & 38
6 (n=7M; n=6F)	EGF-Ig	38 días postoperatorio	Equimolar	24 Horas	*Día 7, 18, 28, & 38

5

Tabla 7: Frecuencia de dosis de GGF2

Grupo	Tratamiento	Duración de la vida	Dosis	Intervalo de dosificación †	Puntos de tiempo ECHO (postoperatorio)
1 (n = 5 M; n = 5 F)	N/A: Controles ingenuos de edad coincidente	30 días después de la ECHO primaria	NA	NA	‡Día 1, 12, 22, & 32
2 (n = 6 M; n = 6 F)	Control (Vehículo)	38 días postoperatorio	Solo Vehículo	24 Horas	*Día 7, 18, 28, & 38

ES 2 763 184 T3

Grupo	Tratamiento	Duración de la vida	Dosis	Intervalo de dosificación †	Puntos de tiempo ECHO (postoperatorio)
3 (n = 6 M; n = 6 F)	GGF-2	38 días postoperatorio	3.25 mg/kg	24 Horas	*Día 7, 18, 28, & 38
4 (n = 6 M; n = 7 F)	GGF-2	38 días postoperatorio	3.25 mg/kg	48 Horas	*Día 7, 18,28, & 38
5 (n = 7 M; n = 6 F)	GGF-2	38 días postoperatorio	3.25 mg/kg	96 Horas	*Día 7, 18,28, & 38

TA 1- Artículo de prueba 1; M = machos; F = hembras.

Tabla 8: GGF2 con y sin BSA

Grupo	Tratamiento	Duración de la vida	Dosis	Intervalo de dosificación †	Puntos de tiempo ECHO (postoperatorio)
1 (n = 5 M; n = 5 F)	N/A: Controles ingenuos de edad coincidente	17 días postoperatorio	NA	NA	Día 6 y 17
2 (n =6 M; n =6 F)	Control (Vehículo)	17 días post	Solo Vehículo	24 Horas	Día 6 y 17
3 (n =6 M; n =6 F)	GGF-2 + BSA	17 días post	3.25 mg/kg	24 Horas	Día 6 y 17
4 (n = 6 M; n = 7 F)	GGF-2 sin BSA	17 días post	3.25 mg/kg	24 Horas	Día 6 y 17

Prueba y administración de artículos de control

5 Ruta de administración

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

10 Prueba de administración de artículos

Los artículos de prueba y control se administraron a través de la vena de la cola. Las dosis individuales se basaron en los pesos corporales más recientes. La dosis se administró mediante inyección en bolo, a menos que el Patrocinador indique lo contrario.

Preparación del sistema de prueba

15 Procedimiento quirúrgico: Ligadura de la arteria descendente anterior izquierda

Los procedimientos quirúrgicos se realizaron en Charles River Laboratories como se describe en Charles River Laboratories Surgical Capabilities Reference Paper, vol. 13, No.1, 2005. En resumen, se hace una incisión craneocaudal en el pecho, ligeramente a la izquierda del esternón, a través de la piel y los músculos pectorales. Las costillas tercera y cuarta son transectadas, y los músculos intercostales son disecados romos. La cavidad torácica es penetrada rápidamente y el pericardio se abre por completo. El corazón se exterioriza a través de la incisión. Se identifican el cono pulmonar y la aurícula izquierda. Se usa una pequeña aguja curva para pasar una pieza de sutura de seda 5-0 debajo de la arteria coronaria descendente anterior izquierda. La ligadura es atada y el corazón se reubica

en el tórax. El aire en la cavidad torácica se expulsa suavemente mientras se cierra la pared torácica y la incisión en la piel. El animal se resucita usando ventilación con presión positiva y se coloca en un ambiente rico en oxígeno.

Recuperación postoperatoria

5 Charles River Laboratories realizó la monitorización postoperatoria a corto plazo y la administración de analgésicos apropiados tal como se describe en Charles River Laboratories Surgical Capabilities Reference Paper, vol. 13, No. 1, 2005.

Se realizó un seguimiento postoperatorio a largo plazo para evaluar a los animales en busca de signos de dolor o infección. Las observaciones diarias del sitio de la incisión continuaron durante 7 días después de la recepción de los animales. Se administraron tratamiento complementario del dolor y terapia antimicrobiana según fuera necesario.

Tabla 9. Medicaciones y dosis programadas					
Fármaco	Intervalo, dosis y ruta				
	Postcirugía diariamente	Día 1/7* ECHO	Día 12/18* ECHO	Día 22/28* ECHO	Día 32/38* ECHO & Necropsia
Isoflurano		Para efectuar, inhalación	Para efectuar, inhalación	Para efectuar, inhalación	Para efectuar, inhalación
Buprenorfina	0.01 mg/kg, I.M. (solo según sea necesario)	-	-	-	-

* - Día del procedimiento ECHO definido por asignación de grupo animal como se indica a continuación.

10

Evaluaciones de estudio antemortem

Observaciones en jaula

15 Se observó a todos los animales al menos dos veces al día en busca de morbilidad, mortalidad, lesiones y disponibilidad de alimentos y agua. Se identificó cualquier animal con mala salud para monitorización adicional y posible eutanasia.

Pesos corporales

Se midieron y registraron los pesos corporales al menos una vez antes de la aleatorización y semanalmente durante el estudio.

Consumo de alimento

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

Exámenes ecocardiográficos

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

Para el examen ecocardiográfico, cada animal se anestesió de acuerdo con la Tabla 5 y se afeitó el pelo del tórax. Se aplicó gel de acoplamiento al transductor ecocardiográfico y se obtuvo una imagen para medir la función cardíaca a múltiples niveles. Se obtuvieron imágenes para cada animal en visión de eje corto (a nivel papilar medio u otro, según la ubicación del área de infarto observada por ecocardiografía).

30 Parámetros ecocardiográficos

Se tomaron imágenes de ECHO a nivel del músculo papilar medio, u otro dependiendo de la ubicación del área de infarto observada por ecocardiografía, del ventrículo izquierdo. Las imágenes en modo M y 2D fueron grabadas y almacenadas en CD y/o MOD. Los parámetros de medición obtenidos con ECHO incluyen: grosor de la pared septal intraventricular (diástole); unidades = cm; Espesor de la pared septal intraventricular (sístole); unidades = cm;

5 Dimensión interna ventricular izquierda (diástole); unidades = cm; Dimensión interna ventricular izquierda (sístole); unidades = cm; Grosor de la pared papilar ventricular izquierda (diástole); unidades = cm; Grosor de la pared papilar ventricular izquierda (sístole); unidades = cm; Fin del volumen diastólico; unidades = ml; Fin del volumen sistólico; unidades = ml; Fracción de eyección; reportado como un porcentaje; Volumen sistólico; unidades = ml; y porcentaje de acortamiento fraccional; reportado como un porcentaje.

Eutanasia

Morbilidad

10 Cualquier animal moribundo, tal como se define mediante un Testing Facility Standard Operating Procedure, se sacrificó por razones humanitarias. Todos los animales sacrificados in extremis o encontrados muertos fueron sometidos a una necropsia de rutina.

Método de eutanasia

La eutanasia se realizó mediante inyección saturada de cloruro de potasio en la vena cava seguida de un método aprobado para asegurar la muerte, por ejemplo, desangrado.

Disposición final

15 Todos los animales supervivientes puestos en estudio fueron sacrificados en su necropsia programada o, si es necesario, sacrificados in extremis.

Resultados

20 Estudio 1 - El tratamiento de ratas con GGF2 a 0.625 mg/kg iv al día resultó en una mejora significativa de la función cardíaca como se muestra aquí por los cambios en la fracción de eyección y el acortamiento fraccional. El fragmento EGF-1d no dio como resultado el mismo grado de mejora. Véase tabla 5.

Estudio 2: El tratamiento de ratas con GGF2 a 0.625 y 3.25 mg/kg iv al día resultó en una mejora significativa de la función cardíaca como se muestra aquí por los cambios en la fracción de eyección y el acortamiento fraccional. También se observaron mejoras significativas en los volúmenes sistólicos y diastólicos finales durante el período de tratamiento. Véase tabla 6.

25 Resultados del estudio 3: El tratamiento de ratas con GGF2 3.25 mg/kg iv cada 24, 48 o 96 horas resultó en una mejora significativa de la función cardíaca como se muestra aquí por los cambios en la fracción de eyección y el acortamiento fraccional. También se observaron mejoras significativas en los volúmenes sistólicos y diastólicos finales durante el período de tratamiento. Véase tabla 7.

30 Informes anteriores (Liu et al) han demostrado que se requiere una proteína transportadora tal como BSA para una estabilidad y actividad óptimas de neurregulina. GGF2 ha demostrado estabilidad sin portadores como BSA. Este experimento fue diseñado para probar si GGF2 es estable y activa en un régimen terapéutico sin BSA. Después de 10 días de tratamiento, tanto las formulaciones de GGF2 que contienen BSA como las que no contienen BSA dieron como resultado mejoras en la fracción de eyección en comparación con los controles del vehículo similares a los observados en estudios anteriores. Por lo tanto, es evidente a partir de este estudio que no se requiere BSA u otra proteína transportadora en las formulaciones de GGF2 para el tratamiento de la CHF. Véase tabla.

35

Tabla 10: Hallazgos de patología

Dosificación	Hiperplasia de la vaina del nervio ciático (NSH)	NSH mamaria	Sitio de inyección/cambios en la piel	Efectos cardíacos
Diarios.c.	++	++	++	+
Diarioi.v.	+	+	+	+/-
Intervalo de 48 horas i.v.	+/-	-	-	+/-
Intervalo de 96 horas i.v.	-	-	-	-

++ frecuentemente presente; + presente; +/- ocasionalmente observado, - raro o no observado

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

- 5 La hiperplasia y los efectos cardíacos a veces se ven con la administración de días alternos. No se han visto con dosificaciones menos frecuentes.

Se hace referencia a varias publicaciones y documentos de patente en esta solicitud para describir más completamente el estado de la técnica al que pertenece esta invención.

Listado de secuencias

- 10 <110> CAGGIANO, ANTHONY
IACI, JENNIFER
GANGULY, ANINDITA
PARRY, TOM
- 15 <120> Dosificación terapéutica de una neurregulina o una subsecuencia de la misma para tratamiento o profilaxis de insuficiencia cardíaca
<130> ACOR.P0040WO
<140> PCT/US2009/004130
<141> 2009-07-17
<150> 61/135,171
- 20 <151> 2008-07-17
<160> 24
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 2003
- 25 <212> ADN
<213> Homo sapiens
<220>
<221> características_misceláneas
<222> (31) .. (32)
- 30 <223> n es a, c, g, o t
<220>
<221> CDS
<222> (265)..(1530)
<400> 1

ES 2 763 184 T3

ggaattcctt tttttttttt tttttttcct nntttttttt tgcccttata cctcttcgcc	60
tttctgtggt tccatccact tcttccccct cctcctccca taaacaactc tcctaccct	120
gcacccccaa taaataaata aaaggaggag ggcaaggggg gaggaggagg agtggtgctg	180
cgaggggaag gaaaaggag gcagcgcgag aagagccggg cagagtccga accgacagcc	240
agaagcccgc acgcacctcg cacc atg aga tgg cga cgc gcc ccg cgc cgc	291
Met Arg Trp Arg Arg Ala Pro Arg Arg	
1 5	
tcc ggg cgt ccc ggc ccc cgg gcc cag cgc ccc ggc tcc gcc gcc cgc	339
Ser Gly Arg Pro Gly Pro Arg Ala Gln Arg Pro Gly Ser Ala Ala Arg	
10 15 20 25	
tcg tcg ccg ccg ctg ccg ctg ctg cca cta ctg ctg ctg ctg ggg acc	387
Ser Ser Pro Pro Leu Pro Leu Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Gly Thr	
30 35 40	
gcg gcc ctg gcg ccg ggg gcg gcg gcc ggc aac gag gcg gct ccc gcg	435
Ala Ala Leu Ala Pro Gly Ala Ala Ala Gly Asn Glu Ala Ala Pro Ala	
45 50 55	
ggg gcc tcg gtg tgc tac tcg tcc ccg ccc agc gtg gga tcg gtg cag	483

ES 2 763 184 T3

Gly	Ala	Ser	Val	Cys	Tyr	Ser	Ser	Pro	Pro	Ser	Val	Gly	Ser	Val	Gln		
		60					65					70					
gag	cta	gct	cag	cgc	gcc	gcg	gtg	gtg	atc	gag	gga	aag	gtg	cac	ccg		531
Glu	Leu	Ala	Gln	Arg	Ala	Ala	Val	Val	Ile	Glu	Gly	Lys	Val	His	Pro		
	75					80					85						
cag	cgg	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		
90				95					100						105		
ggc	gag	gca	ggg	gcg	tgg	ggc	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		
			110					115						120			
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		
			125					130						135			
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		
	140						145						150				
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		
	155					160						165					
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		
170					175					180					185		
cgc	gcg	ccg	gcc	gcc	ttc	cga	gcc	tct	ttc	ccc	cct	ctg	gag	acg	ggc		867
Arg	Ala	Pro	Ala	Ala	Phe	Arg	Ala	Ser	Phe	Pro	Pro	Leu	Glu	Thr	Gly		
				190					195						200		
cgg	aac	ctc	aag	aag	gag	gtc	agc	cgg	gtg	ctg	tgc	aag	cgg	tgc	gcc		915
Arg	Asn	Leu	Lys	Lys	Glu	Val	Ser	Arg	Val	Leu	Cys	Lys	Arg	Cys	Ala		
			205					210						215			
ttg	cct	ccc	caa	ttg	aaa	gag	atg	aaa	agc	cag	gaa	tcg	gct	gca	ggt		963
Leu	Pro	Pro	Gln	Leu	Lys	Glu	Met	Lys	Ser	Gln	Glu	Ser	Ala	Ala	Gly		
		220					225						230				
tcc	aaa	cta	gtc	ctt	cgg	tgt	gaa	acc	agt	tct	gaa	tac	tcc	tct	ctc		1011
Ser	Lys	Leu	Val	Leu	Arg	Cys	Glu	Thr	Ser	Ser	Glu	Tyr	Ser	Ser	Leu		
	235					240						245					
aga	ttc	aag	tgg	ttc	aag	aat	ggg	aat	gaa	ttg	aat	cga	aaa	aac	aaa		1059
Arg	Phe	Lys	Trp	Phe	Lys	Asn	Gly	Asn	Glu	Leu	Asn	Arg	Lys	Asn	Lys		
250					255					260					265		
cca	caa	aat	atc	aag	ata	caa	aaa	aag	cca	ggg	aag	tca	gaa	ctt	cgc		1107
Pro	Gln	Asn	Ile	Lys	Ile	Gln	Lys	Lys	Pro	Gly	Lys	Ser	Glu	Leu	Arg		
				270					275					280			
att	aac	aaa	gca	tca	ctg	gct	gat	tct	gga	gag	tat	atg	tgc	aaa	gtg		1155
Ile	Asn	Lys	Ala	Ser	Leu	Ala	Asp	Ser	Gly	Glu	Tyr	Met	Cys	Lys	Val		
			285				290							295			
atc	agc	aaa	tta	gga	aat	gac	agt	gcc	tct	gcc	aat	atc	acc	atc	gtg		1203
Ile	Ser	Lys	Leu	Gly	Asn	Asp	Ser	Ala	Ser	Ala	Asn	Ile	Thr	Ile	Val		
		300					305							310			

ES 2 763 184 T3

gaa tca aac gct aca tct aca tcc acc act ggg aca agc cat ctt gta 1251
 Glu Ser Asn Ala Thr Ser Thr Ser Thr Thr Gly Thr Ser His Leu Val
 315 320 325

ggg acc tgg ggc cac ccc gcc ttc ccc tcc tgc ggg agg ctc aag gag 1299
 Gly Thr Trp Gly His Pro Ala Phe Pro Ser Cys Gly Arg Leu Lys Glu
 330 335 340 345

gac agc agg tac atc ttc ttc atg gag ccc gac gcc aac agc acc agc 1347
 Asp Ser Arg Tyr Ile Phe Phe Met Glu Pro Asp Ala Asn Ser Thr Ser
 350 355 360

aaa tgt gcg gag aag gag aaa act ttc tgt gtg aat gga ggg gag tgc 1395
 Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys
 365 370 375

ttc atg gtg aaa gac ctt tca aac ccc tcg aga tac ttg tgc aag tgc 1443
 Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys
 380 385 390

cca aat gag ttt act ggt gat cgc tgc caa aac tac gta atg gcc agc 1491
 Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser
 395 400 405

ttc tac agt acg tcc act ccc ttt ctg tct ctg cct gaa taggagcatg 1540
 Phe Tyr Ser Thr Ser Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu
 410 415 420

ctcagttggt gctgctttct tgttgctgca tctcccctca gattccacct agagctagat 1600

gtgtottacc agatctaata ttgactgcct ctgcctgtcg catgagaaca ttaacaaaag 1660

caattgtatt acttcctctg ttcgcgacta gttggctctg agatactaat aggtgtgtga 1720

ggctccggat gtttctggaa ttgatattga atgatgtgat acaaattgat agtcaatc 1780

aagcagtgaa atatgataat aaaggcattt caaagtctca cttttattga taaaataaaa 1840

atcattctac tgaacagtcc atcttcttta tacaatgacc acatcctgaa aagggtgttg 1900

ctaagctgta accgatatgc acttgaaatg atggtaagtt aatthtgatt cagaatgtgt 1960

tatttgtcac aaataaacat aataaaagga aaaaaaaaaaaa aaa 2003

<210> 2

<211> 422

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 763 184 T3

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

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

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

ES 2 763 184 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Asp Ser Leu Leu Thr Val Arg Leu Arg Ala Pro Ala Ala Phe Arg
180 185 190

Ala Ser Phe Pro Pro Leu Glu Thr Gly Arg Asn Leu Lys Lys Glu Val
195 200 205

Ser Arg Val Leu Cys Lys Arg Cys Ala Leu Pro Pro Gln Leu Lys Glu
210 215 220

Met Lys Ser Gln Glu Ser Ala Ala Gly Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys
225 230 235 240

Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser Ser Leu Arg Phe Lys Trp Phe Lys Asn
245 250 255

Gly Asn Glu Leu Asn Arg Lys Asn Lys Pro Gln Asn Ile Lys Ile Gln
260 265 270

Lys Lys Pro Gly Lys Ser Glu Leu Arg Ile Asn Lys Ala Ser Leu Ala
275 280 285

Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys Lys Val Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp
290 295 300

ES 2 763 184 T3

Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr Ile Val Glu Ser Asn Ala Thr Ser Thr
 305 310 315 320

Ser Thr Thr Gly Thr Ser His Leu Val Gly Thr Trp Gly His Pro Ala
 325 330 335

Phe Pro Ser Cys Gly Arg Leu Lys Glu Asp Ser Arg Tyr Ile Phe Phe
 340 345 350

Met Glu Pro Asp Ala Asn Ser Thr Ser Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys
 355 360 365

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

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

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

Phe Leu Ser Leu Pro Glu
 420

<210> 3

<211> 198

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(195)

<400> 3

ES 2 763 184 T3

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
 1 5 10 15

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
 20 25 30

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
 35 40 45

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
 50 55 60

gaa tag 198
 Glu
 65

<210> 4

<211> 65

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

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

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

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

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

Glu
 65

<210> 5

10 <211> 192

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

15 <222> (1)..(192)

<400> 5

ES 2 763 184 T3

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
 1 5 10 15

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
 20 25 30

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
 35 40 45

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
 50 55 60

<210> 6

<211> 63

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 6

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

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

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

Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Ala Glu Glu Leu Tyr
 50 55 60

<210> 7

<211> 183

10 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(183)

15 <400> 7

ES 2 763 184 T3

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
 1 5 10 15

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
 20 25 30

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
 35 40 45

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
 50 55 60

<210> 8

<211> 60

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 8

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

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

Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr
 35 40 45
 Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu Glu Leu Tyr
 50 55 60

<210> 9

10 <211> 210

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

15 <222> (1)..(210)

<400> 9

ES 2 763 184 T3

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
 1 5 10 15

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
 20 25 30

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
 35 40 45

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
 50 55 60

gcg gag gag ctc tac taa 210
 Ala Glu Glu Leu Tyr
 65

<210> 10

<211> 69

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 10

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

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

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

Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys His Leu Gly Ile Glu Phe Met Glu Lys
 50 55 60

Ala Glu Glu Leu Tyr
 65

<210> 11

<211> 267

10 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(267)

15 <400> 11

ES 2 763 184 T3

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
 1 5 10 15

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
 20 25 30

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
 35 40 45

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
 50 55 60

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
 65 70 75 80

act ccc ttt ctg tct ctg cct gaa tag 267
 Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu
 85

<210> 12

<211> 88

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 12

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

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

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

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

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

Thr Pro Phe Leu Ser Leu Pro Glu
 85

<210> 13

10 <211> 252

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

ES 2 763 184 T3

<221> CDS

<222> (1)..(252)

<400> 13

```

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
1              5              10              15

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
              20              25              30

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
              35              40              45

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
              50              55              60

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
65              70              75              80

gag ctc tac taa
Glu Leu Tyr
                                                    252

```

5 <210> 14

<211> 83

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

```

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

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

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

Val Pro Met Lys Val Gln Thr Gln Glu Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr
              50              55              60
10 Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys Ala Glu
65              70              75              80

Glu Leu Tyr

```

<210> 15

<211> 498

<212> ADN

ES 2 763 184 T3

<213> Homo sapiens

<400> 15

```
gccagcttct acggatccag atacttgtgc aagtgcccaa atgagtttac tggatgatcgc      60
tgccaaaact acgtaatgaa aactttctgt gtgaatggag gggagtgctt catggtgaaa      120
gacctttcaa acccctcgaa cgctacatct acatccacca ctgggacaag ccatcttgta      180
aaatgtgctg agaaggagaa agtgatcagc aaattaggaa atgacagtgc ctctgccaat      240
atcaccatcg tggaatcagg gaagtcagaa ctctgcatta acaaagcatc actggctgat      300
tctggagagt atatgtgcaa tgggaatgaa ttgaatcgaa aaaacaaacc acaaaatctc      360
aagatacaaa aaaagccact agtccttcgg tgtgaaacca gttctgaata ctctctctc      420
agattcaagt ggttcaagca tatggtgcct cccaattga aagagatgaa aagccaggaa      480
tcggctgcag gttccaaa
```

<210> 16

5 <211> 162

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 763 184 T3

Leu Pro Pro Gln Leu Lys Glu Met Lys Ser Gln Glu Ser Ala Ala Gly
 1 5 10 15

Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser Ser Glu Tyr Ser Ser Leu
 20 25 30

Arg Phe Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu Asn Arg Lys Asn Lys
 35 40 45

Pro Gln Asn Ile Lys Ile Gln Lys Lys Pro Gly Lys Ser Glu Leu Arg
 50 55 60

Ile Asn Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr Met Cys Lys Val
 65 70 75 80

<400> 16 Ile Ser Lys Leu Gly Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn Ile Thr Ile Val
 85 90 95

Glu Ser Asn Ala Thr Ser Thr Ser Thr Thr Gly Thr Ser His Leu Val
 100 105 110

Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys
 115 120 125

Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys
 130 135 140

Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser
 145 150 155 160

Phe Tyr

<210> 17

<211> 198

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

ES 2 763 184 T3

Met Gly Gly Ser His His His His His His Gly Met Ala Ser Met Thr
1 5 10 15

Gly Gly Thr Ala Asn Gly Val Gly Asp Leu Tyr Asp Asp Asp Asp Lys
20 25 30

Val Pro Gly Ser Leu Pro Pro Gln Leu Lys Glu Met Lys Ser Gln Glu
35 40 45

Ser Ala Ala Gly Ser Lys Leu Val Leu Arg Cys Glu Thr Ser Ser Glu
50 55 60

Tyr Ser Ser Leu Arg Phe Lys Trp Phe Lys Asn Gly Asn Glu Leu Asn
65 70 75 80

Arg Lys Asn Lys Pro Gln Asn Ile Lys Ile Gln Lys Lys Pro Gly Lys
85 90 95

Ser Glu Leu Arg Ile Asn Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ser Gly Glu Tyr
100 105 110

Met Cys Lys Val Ile Ser Lys Leu Glu Asn Asp Ser Ala Ser Ala Asn
115 120 125

Ile Thr Ile Val Glu Ser Asn Ala Thr Ser Thr Ser Thr Thr Gly Thr
130 135 140

Ser His Leu Val Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
145 150 155 160

Gly Gly Glu Cys Phe Met Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
165 170 175

Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr
180 185 190

Val Met Ala Ser Phe Tyr
195

<210> 18

<211> 198

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

ES 2 763 184 T3

<400> 18

catatgagcc atcttgtaaa atgtgcggag aaggagaaaa ctttctgtgt gaatggaggg 60
 gagtgcttca tggtgaaaga cttttcaaac ccctcgagat acttgtgcaa gtgcccaaat 120
 gagtttactg gtgatcgctg ccaaaactac gtaatggcca gcttctacaa ggcggaggag 180
 ctgtaccagt aaggatcc 198

<210> 19

<211> 82

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

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

Tyr Gln

<210> 20

10 <211> 236

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 20

cgataactag cagcatttcc tccaacgagg atcccgcagc taagaagcta caccggccag 60
 tggccggggc ccgataacta gcagcatttc ctccaacgag gatcccgcag gtaagaagct 120
 acaccggcca gtggccgggg ccgtggagcc gggggcatcc ggtgcctgag acagaggtgc 180
 tcaaggcagt ctccacctt tgtctcccct ctgcagagag ccacattctg gaagtt 236

15 <210> 21

<211> 60

<212> PRT

ES 2 763 184 T3

<213> Homo sapiens

<400> 21

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

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

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

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

<210> 22

5 <211> 61

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

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

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

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

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

10 <210> 23

<211> 1269

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 23

ES 2 763 184 T3

atgagatggc gacgcgcccc gcgcgcctcc gggcgtcccg gccccgggc ccagcgcccc 60
 ggctccgccc cccgctcgtc gccgcgcgtg ccgctgctgc cactactgct gctgctgggg 120
 accgcggccc tggcgccggg ggcggcggcc ggcaacgagg cggctcccgc gggggcctcg 180
 gtgtgctact cgtccccgcc cagcgtggga tcggtgcagg agctagctca gcgcgccgcg 240
 gtggtgatcg agggaaaggt gcaccgcgag cggcggcagc agggggcact cgacaggaag 300
 gcggcgggcg cggcggcgca ggcagggcg tggggcggcg atcgcgagcc gccagccgcg 360
 ggcccacggg cgctggggcc gcccgccgag gagccgctgc tcgcccga cgggaccgtg 420
 ccctcttggc ccaccgcccc ggtgcccgag gccggcgagc ccggggagga ggcgcctat 480
 ctggtgaagg tgcaccaggt gtgggcgggtg aaagccgggg gcttgaagaa ggactcgtg 540
 ctaccgctgc gectggggac ctggggccac cccgccttcc cctcctgcgg gaggtcaag 600
 gaggacagca ggtacatctt cttcatggag cccgacgcca acagcaccag ccgcgcgccg 660
 gccgccttcc gagcctcttt cccccctctg gagacgggcc ggaacctcaa gaaggagtc 720
 agccgggtgc tgtgcaagcg gtgcgccttg cctcccgaat tgaaagagat gaaaagccag 780
 gaatcggctg caggttccaa actagtcctt cgggtgtgaaa ccagttctga atactcctct 840
 ctcagattca agtggttcaa gaatgggaat gaattgaatc gaaaaaaca accacaaaat 900
 atcaagatac aaaaaagcc agggaagtca gaacttcgca ttaacaaagc atcactggct 960
 gattctggag agtatatgtg caaagtgatc agcaaattag gaaatgacag tgcctctgcc 1020
 aatatcacca tcgtggaatc aaacgctaca tctacatcca ccaactgggac aagccatctt 1080
 gtaaaatgtg cggagaagga gaaaactttc tgtgtgaatg gaggggagtg cttcatggtg 1140
 aaagaccttt caaacccctc gagatacttg tgcaagtgcc caaatgagtt tactggtgat 1200
 cgctgcaaaa actacgtaat ggccagcttc tacagtacgt ccaactccctt tctgtctctg 1260
 cctgaatag 1269

<210> 24

<211> 422

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 24

ES 2 763 184 T3

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

Ala Gln Arg Pro Gly Ser Ala Ala Arg Ser Ser Pro Pro Leu Pro Leu

ES 2 763 184 T3

	20		25		30												
Leu	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Ala	Pro	Gly	Ala		
		35					40					45					
Ala	Ala	Gly	Asn	Glu	Ala	Ala	Pro	Ala	Gly	Ala	Ser	Val	Cys	Tyr	Ser		
	50					55					60						
Ser	Pro	Pro	Ser	Val	Gly	Ser	Val	Gln	Glu	Leu	Ala	Gln	Arg	Ala	Ala		
65					70					75					80		
Val	Val	Ile	Glu	Gly	Lys	Val	His	Pro	Gln	Arg	Arg	Gln	Gln	Gly	Ala		
				85					90					95			
Leu	Asp	Arg	Lys	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	Glu	Ala	Gly	Ala	Trp	Gly		
			100					105					110				
Gly	Asp	Arg	Glu	Pro	Pro	Ala	Ala	Gly	Pro	Arg	Ala	Leu	Gly	Pro	Pro		
		115					120						125				
Ala	Glu	Glu	Pro	Leu	Leu	Ala	Ala	Asn	Gly	Thr	Val	Pro	Ser	Trp	Pro		
	130					135					140						
Thr	Ala	Pro	Val	Pro	Ser	Ala	Gly	Glu	Pro	Gly	Glu	Glu	Ala	Pro	Tyr		
145					150					155					160		
Leu	Val	Lys	Val	His	Gln	Val	Trp	Ala	Val	Lys	Ala	Gly	Gly	Leu	Lys		
				165					170					175			
Lys	Asp	Ser	Leu	Leu	Thr	Val	Arg	Leu	Gly	Thr	Trp	Gly	His	Pro	Ala		
			180					185					190				
Phe	Pro	Ser	Cys	Gly	Arg	Leu	Lys	Glu	Asp	Ser	Arg	Tyr	Ile	Phe	Phe		
		195					200					205					
Met	Glu	Pro	Asp	Ala	Asn	Ser	Thr	Ser	Arg	Ala	Pro	Ala	Ala	Phe	Arg		
	210					215						220					
Ala	Ser	Phe	Pro	Pro	Leu	Glu	Thr	Gly	Arg	Asn	Leu	Lys	Lys	Glu	Val		
225					230					235					240		
Ser	Arg	Val	Leu	Cys	Lys	Arg	Cys	Ala	Leu	Pro	Pro	Gln	Leu	Lys	Glu		
				245					250					255			
Met	Lys	Ser	Gln	Glu	Ser	Ala	Ala	Gly	Ser	Lys	Leu	Val	Leu	Arg	Cys		
			260					265					270				

ES 2 763 184 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Leu Ser Leu Pro Glu
 420

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido que comprende un dominio similar al factor de crecimiento epidérmico (similar a EGF), en donde el péptido es neurregulina, para su uso en la reducción de los efectos secundarios debido a los niveles suprafisiológicos del péptido tras la administración mientras se trata o previene la insuficiencia cardíaca en un mamífero sobre un tiempo prolongado en donde una cantidad terapéuticamente efectiva de dicho péptido se administra a un mamífero en un intervalo de al menos 96 horas, en donde dicha cantidad terapéuticamente efectiva es efectiva para tratar o prevenir la insuficiencia cardíaca en dicho mamífero.
2. El péptido para uso de la reivindicación 1, en donde dicha administración se realiza cada 96 horas.
- 10 3. El péptido para uso de la reivindicación 1, en donde dicha administración se realiza en un régimen seleccionado del grupo que consiste en cada: cuatro días, semana, 10 días, 14 días, mes, dos meses, tres meses o cuatro meses.
4. El péptido para uso de la reivindicación 1, en donde dicho mamífero es un humano.
5. El péptido para uso de la reivindicación 1, en donde dicho péptido es el factor de crecimiento glial humano recombinante 2 (GGF2).
6. El péptido para uso de la reivindicación 1, en donde el péptido es:
- 15 SHLVKCAEKEKTFCVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCQNYVMASFYKAEE
LYQ.
7. El péptido para uso de la reivindicación 1, en donde el péptido es:
- SHLVKCAEKEKTFCVNGGECFMVKDLSNPSRYLCKCPNEFTGDRCQNYVMASFYKAEE
LY.
8. El péptido para uso de la reivindicación 1, en donde dicho péptido es codificado por el gen neurregulina (NRG)-1, el gen neurregulina (NRG)-2, el gen neurregulina (NRG)-3 o el gen neurregulina (NRG)- 4.

20

Figura 1

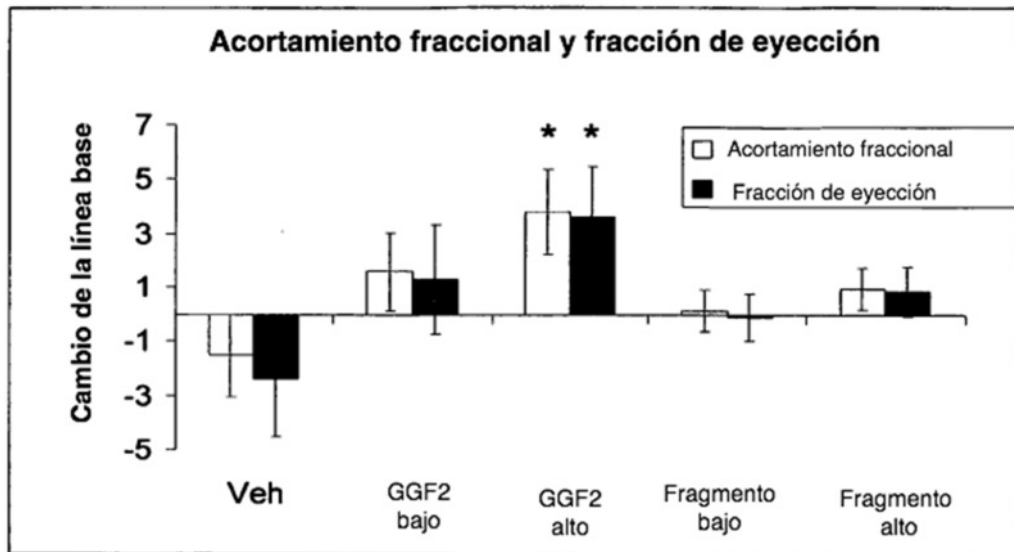


Figura 2

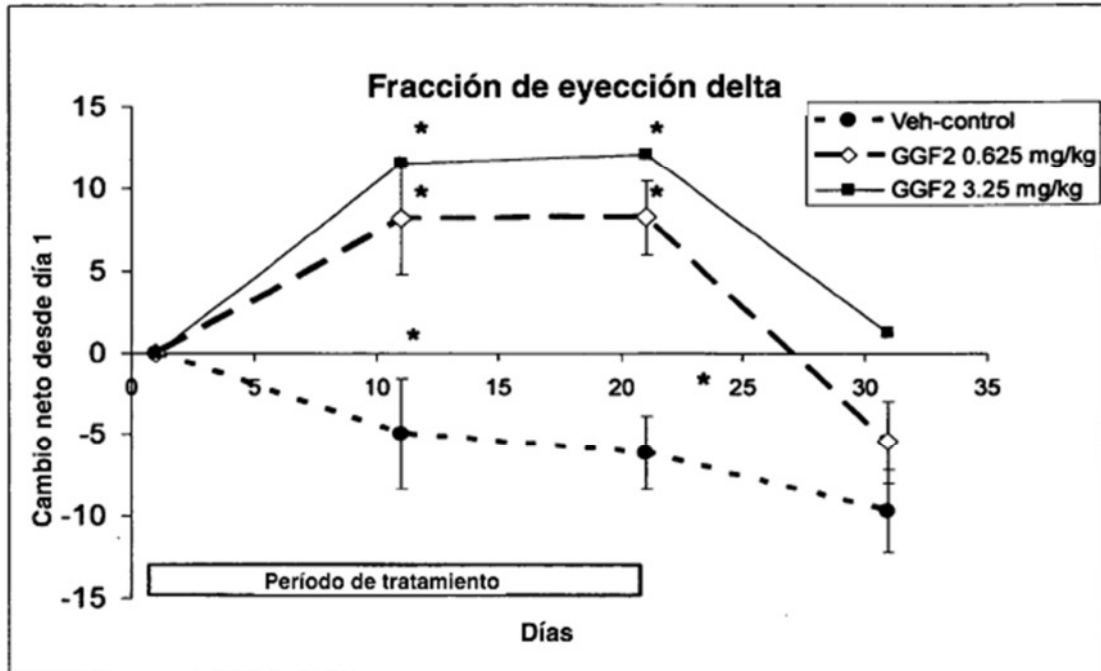


Figura 3

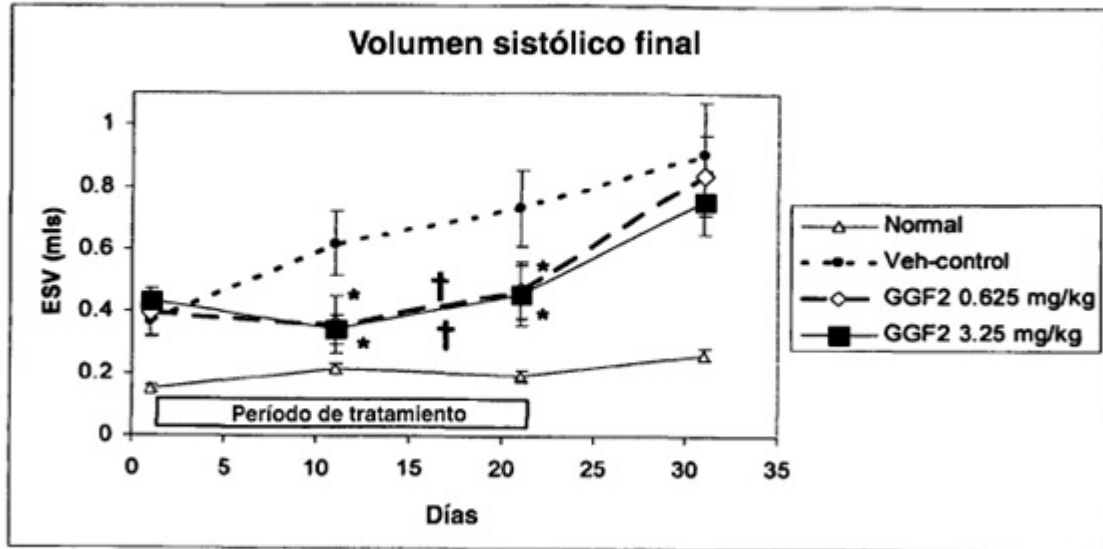


Figura 4

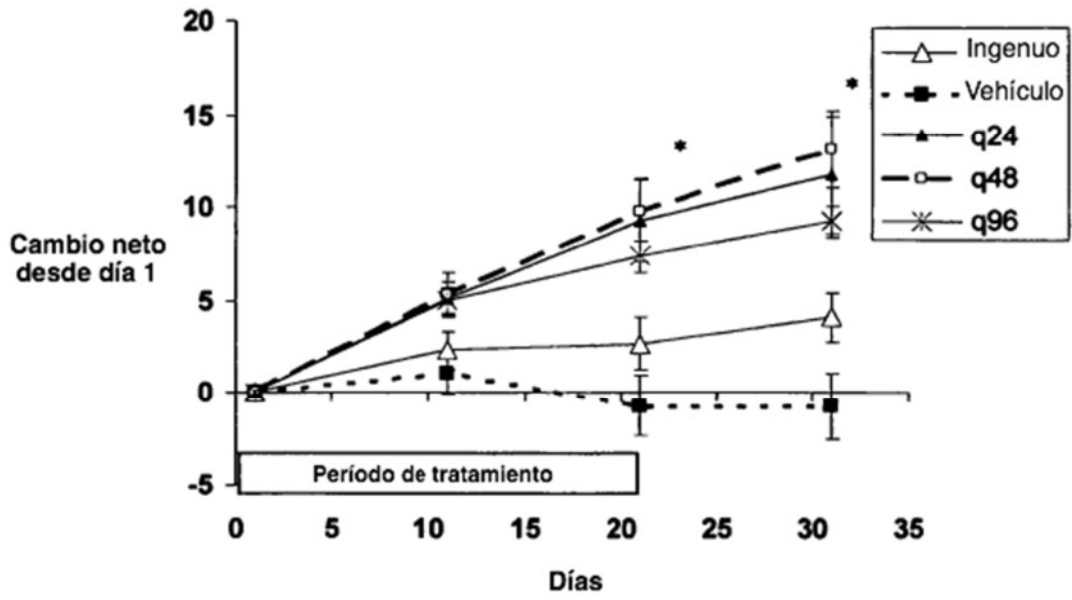


Figura 5

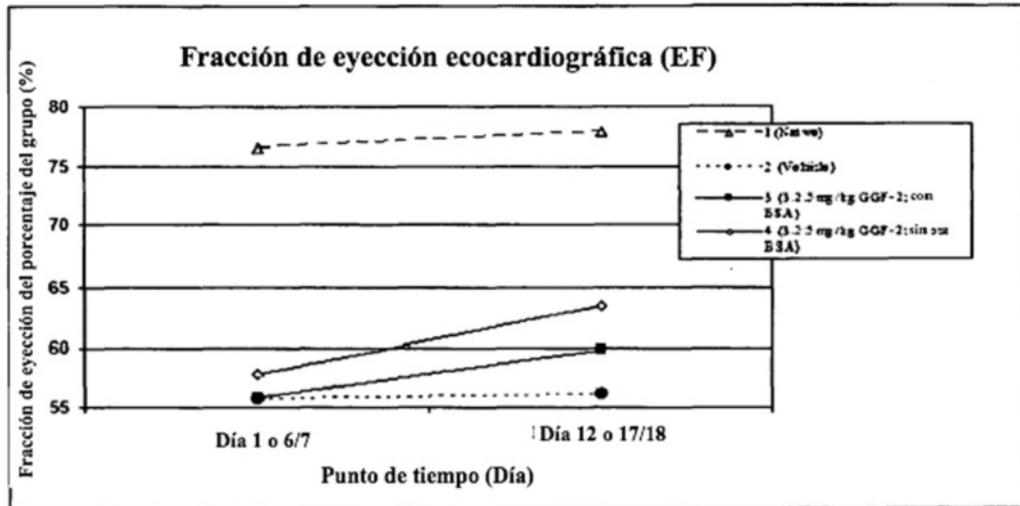


Figura 6

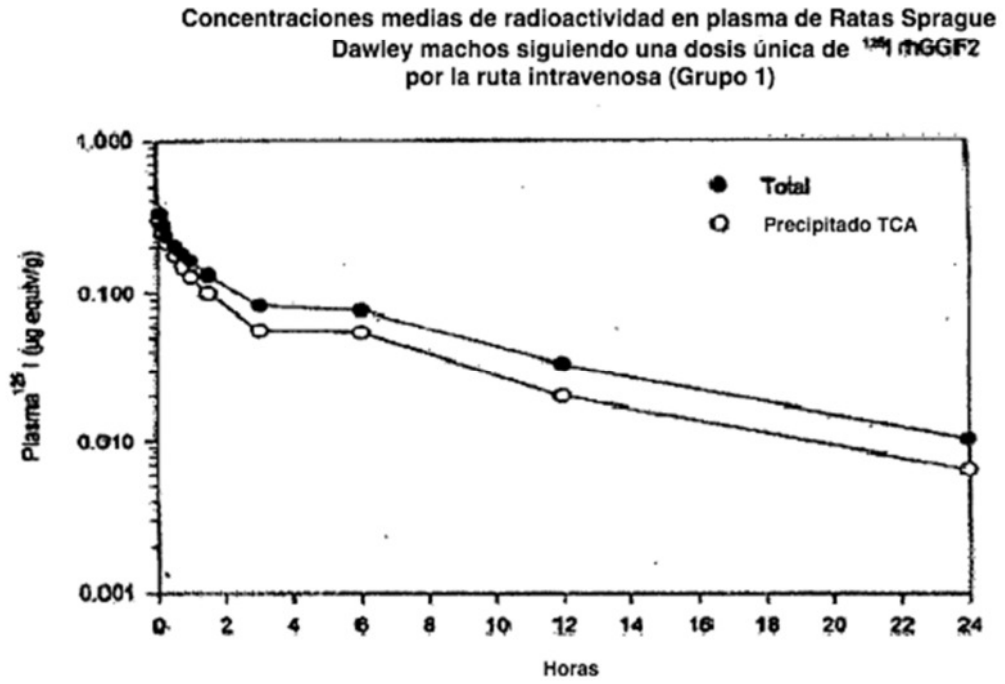


Figura 7

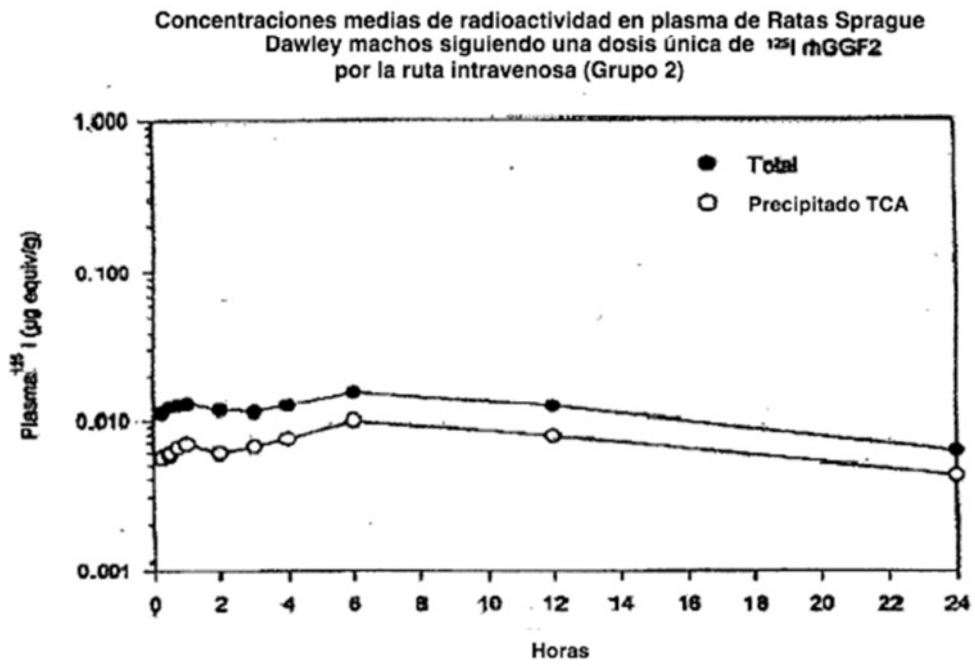


Figura 8A

Secuencia de nucleótido y secuencia de ácido deducida de GGF2HBS5

GGAATCCTT TTTTTTTTTT TTTTTTCTT NNTTTTTTTTTT TGCCCTTATA CCTCTTCGCC	60
TTTCTGTGGT TCCATCCACT TCTTCCCCTT CCTCCTCCA TAAACAAC TCCTACCCCT	120
GCACCCCAA TAAATAAATA AAAGGAGGAG GGCAAGGGGG GAGGAGGAG AGTGGTGCTG	180
CGAGGGGAAG GAAAAGGGAG GCAGCGGAG AAGAGCCGG CAGAGTCCGA ACCGACAGCC	240
AGAAGCCCGC ACGCACCTCG CACC ATG AGA TGG CGA CGC GCC CCG CGC CGC	291
Met Arg Trp Arg Arg Ala Pro Arg Arg	
TCC GGG CGT CCC GGC CCC CGG GCC CAG CGC CCC GGC TCC GCC GCC CGC	339
Ser Gly Arg Pro Gly Pro Arg Ala Gln Arg Pro Gly Ser Ala Ala Arg	
TCG TCG CCG CCG CTG CCG CTG CTG CCA CTA CTG CTG CTG CTG GGG ACC	387
Ser Ser Pro Pro Leu Pro Leu Leu Pro Leu Leu Leu Leu Gly Thr	
Val Cys Leu Leu Thr Val	
GGF-II 09	
GCG GCC CTG GCG CCG GGG GCG GCG GCC GGC AAC GAG GCG GCT CCC GCG	435
Ala Ala Leu Ala Pro Gly Ala Ala Ala Gly Asn Glu Ala Ala Pro Ala	
Ala Ala Leu Pro Pro	
GGG GCC TCG GTG TGC TAC TCG TCC CCG CCC AGC GTG GGA TCG GTG CAG	483
Gly Ala Ser Val Cys Tyr Ser Ser Pro Pro Ser Val Gly Ser Val Gln	
Ala Ser Pro Val Ser Val Gly Ser Val Gln	
GGF-II 08	
GAG CTA GCT CAG CGC GCC GCG GTG GTG ATC GAG GGA AAG GTG CAC CCG	531
Glu Leu Ala Gln Arg Ala Ala Val Val Ile Glu Gly Lys Val His Pro	
Glu Leu Val Gln Arg Trp Phe Val Val Ile Glu Gly Lys	
GGF-II 04	

Figura 8B

Secuencia de nucleótido y secuencia de ácido deducida de GGF2HBS5

CAG CGG 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 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 Leu	
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	

Figura 8C

Secuencia de nucleótido y secuencia de ácido deducida de GGF2HBS5

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

Figura 8D

Secuencia de nucleótido y secuencia de ácido deducida de GGF2HBS5

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 GCTGCTTCT TGTGCTGCA TCTCCCCTCA GATTCCACCT	1590
AGAGCTAGAT GTGTCTTACC AGATCTAATA TTGACTGCCT CTGCCTGTCG CATGAGAACA	1650
TTAACAAAAG CAATTGTATT ACTTCCTCTG TTCGCGACTA GTTGGCTCTG AGATACTAAT	1710
AGGTGTGTGA GGCTCCGGAT GTTTCTGGAA TTGATATTGA ATGATGTGAT ACAAATGAT	1770
AGTCAATATC AAGCAGTGAA ATATGATAAT AAAGGCATTT CAAAGTCTCA CTTTTATTGA	1830
TAAAATAAAA ATCATTCTAC TGAACAGTCC ATCTTCTTTA TACAATGACC ACATCCTGAA	1890
AAGGGTGTG CTAAGCTGTA ACCGATATGC ACTTGAAATG ATGGTAAGTT AATTTTGATT	1950
CAGAATGTGT TATTTGTCAC AAATAAACAT AATAAAAGGA AAAAAAAAAA AAA	2003

Figura 9

EGFL1

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

Figura 10

EGFL2

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

Figura 11

EGFL3

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

Figura 12

EGFL4

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

Figura 13

EGFL5

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

Figura 14**EGFL6**

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

Figura 15

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