



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 96926

(13) C2

(51) МПК

A61K 38/19 (2006.01)

A61K 38/21 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЗАСТОСУВАННЯ SDF-1 ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ТА/АБО ПРОФІЛАКТИКИ НЕВРОЛОГІЧНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

1

2

(21) а200802964

(22) 30.10.2006

(24) 26.12.2011

(86) PCT/EP2006/067949, 30.10.2006

(31) 05110206.9

(32) 31.10.2005

(33) EP

(31) 60/734,142

(32) 07.11.2005

(33) US

(46) 26.12.2011, Бюл.№ 24, 2011 р.

(72) БОШЕРТ УРСУЛА, СН, ПРАУДФУТ АМАНДА, FR, КАДІ ЛІНДА, FR, БІТТ П'ЄР АЛЕН, FR, ВОЖСІК ЖЕРОМ, FR

(73) МЕРК СЕРОНО СА, СН

(56) US 2003/0215792 A 20.11.2003

US 5,756,084 A 26.05.1998

(57) 1. Застосування SDF-1 для виготовлення лікарського засобу для лікування та/або профілактики неврологічного захворювання, вибраного з групи, яку складають невротія, демієлінізуюче захворювання периферичної нервової системи, периферична невротія, первинний прогресуючий розсіяний склероз (MS), вторинний прогресуючий розсіяний склероз (MS), хронічний запальний розсіяний склероз, демієлінізуюча поліневротія (CIPD) та синдром Гієсна-Барре (GBS), причому SDF-1 вибраний з групи, яку складають:

а) поліпептид, який містить амінокислоти послідовності № 1;

б) поліпептид, який містить амінокислоти послідовності № 4;

в) поліпептид, який містить амінокислоти послідовності № 7;

г) поліпептид (а)-(с), який додатково містить сигнальну послідовність, за варіантом, якому віддається перевага, амінокислоти послідовності № 5;

д) мутеїн будь-якого з поліпептидів (а)-(д), де амінокислотна послідовність має щонайменше 80% або 90% ідентичність із щонайменше однією з

послідовностей від (а) до (с), причому цей мутеїн зв'язується з рецептором CXCR4;

е) мутеїн будь-якого з поліпептидів (а)-(д), який кодується послідовністю ДНК, яка гібридується з комплементом нативної послідовності ДНК, яка кодує будь-який з поліпептидів (а)-(с) за умов підвищеної жорсткості, причому цей мутеїн зв'язується з рецептором CXCR4;

ж) мутеїн будь-якого з поліпептидів (а)-(д), де всі зміни в амінокислотній послідовності є консервативними амінокислотними замінами в амінокислотних послідовностях будь-якого з поліпептидів (а)-(с);

з) сіль або ізоформа, гібридний білок, функціональна похідна або активна фракція будь-якого з поліпептидів (а)-(д), що зв'язується з рецептором CXCR4.

2. Застосування за п. 1, причому периферичною невротією є діабетична невротія або біль невротичного походження.

3. Застосування за будь-яким із попередніх пунктів, причому SDF-1 злитий з молекулою-носієм, пептидом або білком, який стимулює перехід через гематоенцефалічний бар'єр.

4. Застосування за будь-яким із попередніх пунктів, причому SDF-1 є пегільованим.

5. Застосування за п. 3, причому гібридний білок характеризується злиттям з імуноглобуліном (Ig).

6. Застосування за будь-яким із попередніх пунктів, причому лікарський засіб додатково містить інтерферон та/або остеопонтин, та/або кластерин для одночасного, послідовного або окремого застосування.

7. Застосування за п. 6, причому інтерфероном є β-інтерферон.

8. Застосування за будь-яким із попередніх пунктів, причому SDF-1 застосовують у кількості приблизно від 0,001 до 1 мг/кг маси тіла або приблизно від 0,01 до 10 мг/кг маси тіла чи приблизно 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 або 1 мг/кг маси тіла чи приблизно від 0,1 до 1 мг/кг маси тіла.

9. Застосування нуклеїновокислотної молекули для виготовлення лікарського засобу для

(13) C2

(11) 96926

(19) UA

лікування та/або профілактики неврологічного захворювання, вибраного з групи, яку складають невропатія, демієлінізуюче захворювання периферичної нервової системи, периферична невропатія, первинний прогресуючий розсіяний склероз (MS), вторинний прогресуючий розсіяний склероз (MS), хронічний запальний розсіяний склероз, демієлінізуюча поліневропатія (CIDP) та синдром Гійєна-Барре (GBS), причому згадана нуклеїновокислотна молекула містить нуклеїновокислотну ПОСЛІДОВНІСТЬ № 6 або нуклеїновокислотну послідовність, яка кодує поліпептид, який містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, яку складають:

- a) поліпептид, який містить амінокислоти послідовності № 1;
- b) поліпептид, який містить амінокислоти послідовності № 4;
- c) поліпептид, який містить амінокислоти послідовності № 7;
- d) поліпептид (a)-(c), який додатково містить сигнальну послідовність, за варіантом, якому віддається перевага, амінокислоти послідовності № 5;
- e) мутеїн будь-якого з поліпептидів (a)-(d), де амінокислотна послідовність має щонайменше 80% або 90% ідентичність із щонайменше однією з послідовностей від (a) до (c), причому цей мутеїн зв'язується з рецептором CXCR4;
- f) мутеїн будь-якого з поліпептидів (a)-(d), який кодується послідовністю ДНК, яка гібридується з комплементом нативної послідовності ДНК, яка кодує будь-який з поліпептидів (a)-(c) за умов підвищеної жорсткості, причому цей мутеїн зв'язується з рецептором CXCR4;
- g) мутеїн будь-якого з поліпептидів (a)-(d), де всі зміни в амінокислотній послідовності є консервативними амінокислотними замінами в амінокислотних послідовностях будь-якого з поліпептидів (a)-(c);
- h) сіль або ізоформа, гібридний білок, функціональна похідна або активна фракція будь-якого з поліпептидів (a)-(d), що зв'язується з рецептором CXCR4.

10. Застосування за п. 9, причому нуклеїновокислотна молекула додатково містить послідовність експресійного вектора.

11. Застосування за будь-яким із пп. 9-10 для генотерапії.

12. Застосування вектора для спричинення та/або посилення ендогенного продукування SDF-1 у клітині при виготовленні лікарського засобу для лікування та/або профілактики неврологічного захворювання, вибраного з групи, яку складають невропатія, демієлінізуюче захворювання периферичної нервової системи, периферична невропатія, первинний прогресуючий розсіяний склероз (MS), вторинний прогресуючий розсіяний склероз (MS), хронічний запальний розсіяний склероз, демієлінізуюча поліневропатія (CIDP) та синдром Гійєна-Барре (GBS), причому SDF-1 вибраний з групи, яку складають:

- a) поліпептид, який містить амінокислоти послідовності № 1;

b) поліпептид (a), який додатково містить сигнальну послідовність, за варіантом, якому віддається перевага, амінокислоти послідовності № 5;

c) мутеїн будь-якого з поліпептидів (a)-(b), де амінокислотна послідовність має щонайменше 80% або 90% ідентичність із послідовністю (a), причому цей мутеїн зв'язується з рецептором CXCR4;

d) мутеїн будь-якого з поліпептидів (a)-(b), який кодується послідовністю ДНК, яка гібридується з комплементом нативної послідовності ДНК, яка кодує поліпептид (a) за умов підвищеної жорсткості, причому цей мутеїн зв'язується з рецептором CXCR4;

e) мутеїн будь-якого з поліпептидів (a)-(b), де всі зміни в амінокислотній послідовності є консервативними амінокислотними замінами в амінокислотних послідовностях поліпептиду (a).

13. Застосування за п. 12 для генотерапії.

14. Застосування клітини, яка зазнала генетичної модифікації, для продукування SDF-1 при виготовленні лікарського засобу для лікування та/або профілактики неврологічного захворювання, вибраного з групи, яку складають невропатія, демієлінізуюче захворювання периферичної нервової системи, периферична невропатія, первинний прогресуючий розсіяний склероз (MS), вторинний прогресуючий розсіяний склероз (MS), хронічний запальний розсіяний склероз, демієлінізуюча поліневропатія (CIDP) та синдром Гійєна-Барре (GBS), причому SDF-1 вибраний з групи, яку складають:

- a) поліпептид, який містить амінокислоти послідовності № 1;
- b) поліпептид, який містить амінокислоти послідовності № 4;
- c) поліпептид, який містить амінокислоти послідовності № 7;
- d) поліпептид (a)-(c), який додатково містить сигнальну послідовність, за варіантом, якому віддається перевага, амінокислоти послідовності № 5;

e) мутеїн будь-якого з поліпептидів (a)-(d), де амінокислотна послідовність має щонайменше 80% або 90% ідентичність із щонайменше однією з послідовностей від (a) до (c), причому цей мутеїн зв'язується з рецептором CXCR4;

f) мутеїн будь-якого з поліпептидів (a)-(d), який кодується послідовністю ДНК, яка гібридується з комплементом нативної послідовності ДНК, яка кодує будь-який з поліпептидів (a)-(c) за умов підвищеної жорсткості, причому цей мутеїн зв'язується з рецептором CXCR4;

g) мутеїн будь-якого з поліпептидів (a)-(d), де всі зміни в амінокислотній послідовності є консервативними амінокислотними замінами в амінокислотних послідовностях будь-якого з поліпептидів (a)-(c);

h) сіль або ізоформа, гібридний білок, функціональна похідна або активна фракція будь-якого з поліпептидів (a)-(d), що зв'язується з рецептором CXCR4.

15. Фармацевтична композиція, яка містить SDF-1 та інтерферон, факультативно разом з одним або декількома фармацевтично прийнятними напов-

нювачами, для лікування та/або профілактики неврологічного захворювання, вибраного з групи, яку складають невропатія, демієлінізуюче захворювання периферичної нервової системи, периферична невропатія, первинний прогресуючий розсіяний склероз (MS), вторинний прогресуючий розсіяний склероз (MS), хронічний запальний розсіяний склероз, демієлінізуюча поліневропатія (CIDP) та синдром Гійєна-Барре (GBS), причому SDF-1 вибраний з групи, яку складають:

- a) поліпептид, який містить амінокислоти послідовності № 1;
- b) поліпептид, який містить амінокислоти послідовності № 4;
- c) поліпептид, який містить амінокислоти послідовності № 7;
- d) поліпептид (a)-(c), який додатково містить сигнальну послідовність, за варіантом, якому віддається перевага, амінокислоти послідовності № 5;

e) мутеїн будь-якого з поліпептидів (a)-(d), де амінокислотна послідовність має щонайменше 80% або 90% ідентичність із щонайменше однією з послідовностей від (a) до (c), причому цей мутеїн зв'язується з рецептором CXCR4;

f) мутеїн будь-якого з поліпептидів (a)-(d), який кодується послідовністю ДНК, яка гібридується з комплементом нативної послідовності ДНК, яка кодує будь-який з поліпептидів (a)-(c) за умов підвищеної жорсткості, причому цей мутеїн зв'язується з рецептором CXCR4;

g) мутеїн будь-якого з поліпептидів (a)-(d), де всі зміни в амінокислотній послідовності є консервативними амінокислотними замінами в амінокислотних послідовностях будь-якого з поліпептидів (a)-(c);

h) сіль або ізоформа, гібридний білок, функціональна похідна або активна фракція будь-якого з поліпептидів (a)-(d), що зв'язується з рецептором CXCR4.

16. Фармацевтична композиція, яка містить SDF-1 та остеопонтин, факультативно разом з одним або декількома фармацевтично прийнятними наповнювачами, для лікування та/або профілактики неврологічного захворювання, вибраного з групи, яку складають невропатія, демієлінізуюче захворювання периферичної нервової системи, периферична невропатія, первинний прогресуючий розсіяний склероз (MS), вторинний прогресуючий розсіяний склероз (MS), хронічний запальний розсіяний склероз, демієлінізуюча поліневропатія (CIDP) та синдром Гійєна-Барре (GBS), причому SDF-1 вибраний з групи, яку складають:

- a) поліпептид, який містить амінокислоти послідовності № 1;
- b) поліпептид, який містить амінокислоти послідовності № 4;
- c) поліпептид, який містить амінокислоти послідовності № 7;
- d) поліпептид (a)-(c), який додатково містить сигнальну послідовність, за варіантом, якому віддається перевага, амінокислоти послідовності № 5;

e) мутеїн будь-якого з поліпептидів (a)-(d), де амінокислотна послідовність має щонайменше 80% або 90% ідентичність із щонайменше однією з послідовностей від (a) до (c), причому цей мутеїн зв'язується з рецептором CXCR4;

f) мутеїн будь-якого з поліпептидів (a)-(d), який кодується послідовністю ДНК, яка гібридується з комплементом нативної послідовності ДНК, яка кодує будь-який з поліпептидів (a)-(c) за умов підвищеної жорсткості, причому цей мутеїн зв'язується з рецептором CXCR4;

g) мутеїн будь-якого з поліпептидів (a)-(d), де всі зміни в амінокислотній послідовності є консервативними амінокислотними замінами в амінокислотних послідовностях будь-якого з поліпептидів (a)-(c);

h) сіль або ізоформа, гібридний білок, функціональна похідна або активна фракція будь-якого з поліпептидів (a)-(d), що зв'язується з рецептором CXCR4.

17. Фармацевтична композиція, яка містить SDF-1 та кластерин, факультативно разом з одним або декількома фармацевтично прийнятними наповнювачами, для лікування та/або профілактики захворювання, вибраного з групи, яку складають невропатія, демієлінізуюче захворювання периферичної нервової системи, периферична невропатія, первинний прогресуючий розсіяний склероз (MS), вторинний прогресуючий розсіяний склероз (MS), хронічний запальний розсіяний склероз, демієлінізуюча поліневропатія (CIDP) та синдром Гійєна-Барре (GBS), причому SDF-1 вибраний з групи, яку складають:

- a) поліпептид, який містить амінокислоти послідовності № 1;
- b) поліпептид, який містить амінокислоти послідовності № 4;
- c) поліпептид, який містить амінокислоти послідовності № 7;
- d) поліпептид (a)-(c), який додатково містить сигнальну послідовність, за варіантом, якому віддається перевага, амінокислоти послідовності № 5;

e) мутеїн будь-якого з поліпептидів (a)-(d), де амінокислотна послідовність має щонайменше 80% або 90% ідентичність із щонайменше однією з послідовностей від (a) до (c), причому цей мутеїн зв'язується з рецептором CXCR4;

f) мутеїн будь-якого з поліпептидів (a)-(d), який кодується послідовністю ДНК, яка гібридується з комплементом нативної послідовності ДНК, яка кодує будь-який з поліпептидів (a)-(c) за умов підвищеної жорсткості, причому цей мутеїн зв'язується з рецептором CXCR4;

g) мутеїн будь-якого з поліпептидів (a)-(d), де всі зміни в амінокислотній послідовності є консервативними амінокислотними замінами в амінокислотних послідовностях будь-якого з поліпептидів (a)-(c);

h) сіль або ізоформа, гібридний білок, функціональна похідна або активна фракція будь-якого з поліпептидів (a)-(d), що зв'язується з рецептором CXCR4.

Цей винахід, взагалі, належить до галузі неврологічних захворювань, пов'язаних із запаленням нервових волокон. Конкретніше, цей винахід має відношення до застосування SDF-1 для виготовлення лікарського засобу для лікування та/або профілактики неврологічного захворювання.

Передумови створення винаходу

Неврологічні захворювання, пов'язані із запаленням нервових волокон Запалення нервових волокон є загальною відмінною ознакою більшості неврологічних захворювань. Багато подразників ініціюють запалення нервових волокон, яке може бути спричинене ураженням нервових клітин або олігодендрогліоцитів чи бути наслідком травми, пошкодження нервів центральної нервової системи або периферичних нервів чи вірусної або бактеріальної інфекції. Головними наслідками запалення нервових волокон є i) секреція різних запальних хемокінів астроцитами, гліальними макрофагами; та ii) рекрутинг додаткових лейкоцитів, які будуть додатково стимулювати астроцити або мікроглію. У разі хронічних нейродегенеративних захворювань, наприклад, розсіяного склерозу (MS), хвороби Альцгеймера (AD) або бічного аміотрофічного склерозу (ALS), присутність стійкого запалення нервових волокон, як гадають, приймає участь у прогресуванні захворювання. Неврологічні захворювання, пов'язані із запаленням нервових волокон, можуть називатись також неврологічними запальними захворюваннями.

Хронічні нейродегенеративні захворювання

У разі хронічних нейродегенеративних захворювань, патологія пов'язується із запальною реакцією. Нещодавно одержані наукові дані дозволяють зробити припущення про те, що системне запалення може впливати на місцеве запалення хворого головного мозку, наслідком чого є надмірний синтез запальних цитокінів та інших медіаторів у головному мозку, що, у свою чергу, може впливати на поведінку (Перрі (Perry), 2004). До числа хронічних нейродегенеративних захворювань належать, разом з іншими, розсіяний склероз (MS), хвороба Альцгеймера (AD), хвороба Паркінсона (PD), хорея Гентингтона (HD), бічний аміотрофічний склероз (ALS), множинна системна атрофія (MSA), пріонні захворювання і синдром Дауна.

Хвороба Альцгеймера (AD) являє собою розлад, який включає погіршення розумової діяльності унаслідок змін у тканинах головного мозку. Згадані зміни включають зморщування тканин головного мозку, яке не спричинюється розладами кровоносних судин, первинну дегенеративну деменцію і дифузну атрофію головного мозку. Хворобу Альцгеймера називають також старечим слабоумством альцгеймерівського типу (SDAT). Значний обсяг наукових даних, які були одержані впродовж минулого десятиріччя, підтримує висновок, суть якого полягає у тому, що запалення нервових волокон пов'язується з патологією хвороби Альцгеймера (AD) (Таппо (Tappo), та Аріас (Arias), 2005).

Хвороба Паркінсона (PD) являє собою розлад головного мозку, який характеризується тремтін-

ням та труднощами, які виникають під час ходіння, здійснення рухів та їх координації. Згадана хвороба пов'язується з пошкодженням частини головного мозку, яка контролює рух м'язів. Її називають також паркінсоновим тремором або тремтливим паралічем. Зростаючий обсяг даних, які одержують при проведенні дослідів на людях і тваринах, дозволив висунути припущення про те, що запалення нервових волокон є важливим вкладником до загибелі нейронів у разі хвороби Паркінсона (Гао (Gao) та інші, 2003).

Хорея Гентингтона (HD) являє собою спадкове, автосомно-домінантне неврологічне запальне захворювання. Клінічні ознаки цього захворювання з'являються, як правило, не раніше п'ятого десятиріччя життя, і його проявами є психіатричні порушення, розлад мимовільних рухів та погіршення розумової діяльності, пов'язані з невблаганним розвитком захворювання до смерті, яка настає, як правило, через 17 років після його початку.

Бічний аміотрофічний склероз (ALS) являє собою розлад, який спричинює прогресуючу втрату регуляції нервовою системою довільно скоротних м'язів внаслідок руйнування нервових клітин у головному та спинному мозку. Бічний аміотрофічний склероз, який називають також хворобою Лу Геріга, являє собою розлад, який включає втрату спроможності застосування та контролювання м'язів. Нерви, які контролюють ці м'язи, зморщуються і зникають, наслідком чого є втрата м'язової тканини унаслідок відсутності нервової стимуляції. Хоча головна причина бічного аміотрофічного склерозу залишається невідомою, ключову роль у перебігу цього захворювання може відігравати запалення нервових волокон (Консілівіо (Consilvio) та інші, 2004).

Множинна системна атрофія (MSA) являє собою спорадичне нейродегенеративне захворювання невідомої етіології, на яке хворіють дорослі. Згаданий стан можна вважати виключним серед хронічних нейродегенеративних захворювань завдяки провідній, якщо не головній, ролі, яку у патогенетичному процесі відіграють олігодендрогліоцити. Дані підтверджують роль генів, які мають відношення до запалення, у ризикі виникнення бічного аміотрофічного склерозу (Інфанте (Infante) та інші, 2005). Головна відмінність від хвороби Паркінсона полягає у тому, що хворі на бічний аміотрофічний склероз не реагують на лікування L-ДОФА.

Розсіяний склероз (MS) являє собою запальне демієлінізуюче захворювання центральної нервової системи (ЦНС), яке набуває рецидивно-ремітуючого або прогресуючого перебігу. Розсіяний склероз не є єдиним демієлінізуючим захворюванням. Аналогом цього захворювання у периферичній нервовій системі (PNS) є хронічна запальна демієлінізуюча полірадикулоневропатія (CIDP). На додаток до цього, існують гострі монофазні розлади, наприклад, запальна демієлінізуюча полірадикулоневропатія, яку називають синдромом Гійєна-Барре (GBS), у периферичній нервовій системі, та гострий розсіяний енцефаломієліт (ADEM) у центральній нервовій системі. Як

розсіяний склероз, так і синдром Гійєна-Барре є гетерогенними синдромами. У разі розсіяного склерозу, унаслідок різноманітних зовнішніх причин разом із генетичними факторами, захворювання може набувати такого перебігу, яке, зрештою, задовольняє діагностичні критерії. У разі обох захворювань, пошкодження аксонів може додаватися до первинної демієлінізації і спричинювати постійні неврологічні розлади. Розсіяний склероз являє собою автоімунний розлад, у разі якого лейкоцити імунної системи чинять руйнівний вплив на білу речовину центральної нервової системи (ЦНС). Залучатись може також і сіра речовина. Незважаючи на те, що точна етіологія розсіяного склерозу є невідомою, сприятливі фактори можуть включати генетичну, бактеріальну та вірусну інфекцію. У разі свого класичного прояву (85% усіх випадків), розсіяний склероз характеризується переміжними рецидивно-ремісивними стадіями, які відповідають періодам порушення функціонування нервової системи, тривалість яких становить декілька тижнів, із подальшим значним або повним відновленням (Ноузуорті (Noseworthy), 1999). Періоди ремісії із часом скорочуються. Після цього у багатьох хворих розпочинається кінцева стадія захворювання, яка характеризується поступовим зникненням функціонування нервової системи із частковим одужанням або без одужання. Цю стадію називають вторинним прогресуючим розсіяним склерозом. У невеликій частини (~15% усіх хворих на розсіяний склероз) спостерігається поступове і безперервне погіршення функціонування нервової системи з подальшим започаткуванням захворювання (первинний прогресуючий розсіяний склероз).

Було показано, що пріонні захворювання і синдром Дауна також включають запалення нервових волокон (Ейкеленбум (Eikelenboom) та інші, 2002; Хантер (Hunter) та інші, 2004).

Неврологічні запальні захворювання після інфекції

Деякі невропатії, такі, наприклад, як гострий розсіяний енцефаломієліт, виникають, як правило, після вірусної інфекції або вакцинації вірусною вакциною (або, дуже рідко, вакцинації бактеріальною вакциною), що дозволяє припустити імунологічну причину згаданого захворювання. Гострі запальні периферичні невропатії, які виникають після вакцинації вірусною вакциною або синдрому Гійєна-Барре, є подібними демієлінізуючими розладами з однаковим гаданим імунопатогенезом, але вони уражають лише периферичні структури.

Мієлопатія, пов'язана з вірусом людського Т-клітинного лейкозу (HTLV), це повільно прогресуюче захворювання спинного мозку, пов'язане з інфікуванням людським Т-клітинним лімфотрофним вірусом, характеризується спастичною слабкістю обох ніг.

Інфекції центральної нервової системи є надзвичайно серйозними інфекціями; менінгіт уражає оболонки, які оточують головний мозок, а енцефаліт спинного мозку уражає сам головний мозок. До числа вірусів, які інфікують центральну нервову систему (головний і спинний мозок) належать герпесвіруси, арбовіруси, віруси Коксаки, віруси ECHO

та ентеровіруси. Деякі із цих інфекцій уражають, головним чином, м'які мозкові оболонки (тканини, які вкривають головний мозок), унаслідок чого виникає менінгіт; інші переважно уражають головний мозок, унаслідок чого виникає енцефаліт; багато з них уражають як м'які мозкові оболонки, так і головний мозок, наслідком чого є менінгоенцефаліт. Менінгіт є набагато поширенішим у дітей, аніж енцефаліт. Віруси уражають центральну нервову систему двома шляхами. Вони безпосередньо інфікують і знищують клітини під час гострого захворювання. Після видужання від інфекції, імунна реакція організму на згадану інфекцію подеколи спричинює вторинне пошкодження клітин, які знаходяться довкола нервів. Унаслідок цього вторинного пошкодження (постінфекційний енцефаломієліт) симптоми у дитини зберігаються впродовж декількох тижнів після одужання від гострого захворювання.

Неврологічні захворювання після ушкоджень

Ушкодження ЦНС, спричинені гострими ураженнями, у тому числі травмою, гіпоксією та ішемією, можуть впливати як на сіру, так і на білу речовину. Ушкодження ЦНС включає запалення нервових волокон. Наприклад, інфільтрація лейкоцитів до ЦНС після травми або запалення частково ініціюється активацією хемокіну MCP-1 (білок хемоатракції моноцитів) у астроцитах (Паненка (Panenka) та інші, 2001).

Травма є ураженням або пошкодженням нерва. Це може бути травма спинного мозку, яка являє собою ушкодження спинного мозку, яке впливає на усі нервові функції, які контролюються на рівні і нижче рівня ушкодження, у тому числі регуляцію функціонування і чутливості м'язів, або мозкова травма, наприклад, травма, спричинена закритою травмою черепа.

Гіпоксія півкуль головного мозку являє собою нестачу кисню, конкретно, для півкуль головного мозку, а більш типово цей термін вживають для означення нестачі кисню для головного мозку у цілому. У залежності від тяжкості гіпоксії, симптоми можуть коливатись у межах від сплутаності свідомості до незворотного ушкодження головного мозку, коматозного стану і смерті.

Причиною інсульту є, як правило, зменшення кровопостачання (ішемія) головного мозку. Інсульт називають також хворобою судин головного мозку. Це група розладів головного мозку, які включають припинення функціонування головного мозку, яке відбувається у разі припинення кровопостачання до будь-якої частини головного мозку. Головний мозок потребує приблизно 20% крові, яка циркулює у організмі. Основне постачання головного мозку кров'ю здійснюється через 2 шийні артерії (сонні артерії), які у подальшому розгалужуються у межах головного мозку на численні артерії, кожна з яких постачає кров до конкретної ділянки головного мозку. Навіть короткочасне припинення кровотоку може викликати погіршення функціонування головного мозку (неврологічний розлад). Симптоми різняться у залежності від ураженої ділянки головного мозку і, як правило, включають такі проблеми, як зміни зору, зміни речі, погіршення рухів або чутливості частини тіла чи зміни рівня

свідомості. Якщо припинення кровотоку триває довше декількох секунд, клітини головного мозку на цій ділянці руйнуються (відмирають) зі спричиненням постійного пошкодження на цій ділянці головного мозку або навіть смерті.

Травматичне ушкодження нервів може стосуватись як центральної, так і периферичної нервової системи. Травматичне ушкодження головного мозку, яке просто називають ушкодженням голови або закритою травмою черепа, означає травму з ушкодженням головного мозку унаслідок зовнішнього удару по голові. Це трапляється, головним чином, під час автомобільних аварій або нещасних випадків із велосипедистами, але може відбуватись також унаслідок короткочасного утоплення, серцевого нападу, інсульту та інфекцій. Травматичне ушкодження головного мозку цього типу є, як правило, наслідком нестачі кисню або браку кровопостачання головного мозку і, унаслідок цього, може називатись "ушкодженням від аноксії". Ушкодження головного мозку або закрита травма черепа трапляється у разі удару по голові, наприклад, у разі дорожньо-транспортної пригоди або падіння. Негайно після травми може спостерігатись непритомний стан, тривалість якого може становити хвилини, тижні або місяці. Головне ушкодження головного мозку відбувається під час травми, головним чином, на місцях удару, зокрема, у разі присутності перелому черепа. Значні контузії можуть пов'язуватись із внутрішньомозковим крововиливом або супроводжуватись розривами кори головного мозку. Розсіяні пошкодження аксонів виникають унаслідок зсувних зусиль і відносного подовження нейронних відростків, які спричинюються ротаційними рухами головного мозку усередині черепа. Можуть спостерігатись ураження унаслідок крововиливів або розсіяні ушкодження аксонів, які можуть виявлятися лише у разі мікроскопічного дослідження. Вторинні ушкодження головного мозку з'являються унаслідок ускладнень, які розвиваються після моменту травмування. До їх числа належить внутрішньочерепний крововилив, травматичне ушкодження екстрацеребральних артерій, утворення черепної грижі, ушкодження головного мозку унаслідок гіпоксії або менінгіт.

Травмами спинного мозку пояснюється більшість випадків госпіталізації з приводу параплегії та тетраплегії. Більше 80% з них є наслідком дорожньо-транспортного травматизму. Клінічно визнаними є травми двох головних груп: відкриті травми та закриті травми. Відкриті травми є причиною безпосереднього ушкодження спинного мозку та нервових корінців. Наскрізні травми можуть спричинювати широкі розриви і кровотечу. Закритими травмами пояснюється більшість ушкоджень спинного мозку, і вони, як правило, пов'язуються з переломами/зміщеннями хребетного стовпа, що, як правило, демонструється рентгенологічним шляхом. Ушкодження спинного мозку залежить від ступеня ушкодження кісток і може розглядатись на двох головних стадіях: первинне ушкодження, яким є контузії, розсікання нервового волокна і геморагічний некроз, і вторинне

ушкодження, яким є екстрадуральна гематома, відмирання, інфекція і набряк.

Травма є найпоширенішою причиною локалізованого ушкодження одиночного нерва. Інтенсивна м'язова діяльність або примусове надмірне розтягнення суглобу може викликати вогнищеву невралгію, як і повторні невеликі травми (наприклад, щільне стискання невеликих знарядь, надмірна вібрація пневматичних відбійних молотків). Параліч від здавлення нерва, як правило, уражає поверхневі нерви (ліктьовий, променевий, перонеальний) на виступах кісток (наприклад, під час глибокого сну або під час анестезії у худих або виснажених людей і, часто, у алкоголіків) або у вузьких каналах (наприклад, у разі синдрому каналу зап'ястя). Параліч від здавлення нерва може також бути наслідком пухлин, кісткового гіперостозу, гіпсових пов'язок (шин), милиць або тривалого знаходження у незручній позі (наприклад, під час садового-городніх робіт). Травматичні пошкодження можуть також траплятись під час хірургічних процедур.

Периферична невралгія

Периферична невралгія є синдромом втрати чутливості, слабкості та атрофії м'язів, ослаблення глибоких сухожильних рефлексів і вазомоторних симптомів, самостійно або у будь-якій комбінації. Периферична невралгія пов'язується з дегенерацією аксонів, із процесом, який називають також валлерівським переродженням. Запалення нервових волокон відіграє роль у валлерівському переродженні (Штолль (Stoll) та інші, 2002).

Згадане захворювання може уражати одиночний нерв (мононевралгія), два або декілька нервів на окремих ділянках (множинна мононевралгія) або багато нервів одночасно (поліневралгія). Уражатись може, головним чином, аксон (наприклад, у разі цукрового діабету, хвороби Ліма, уремії або токсичними агентами) або мієлінова оболонка чи шванівська клітина (наприклад, у разі гострої або хронічної запальної поліневралгії, лейкоцистозів або синдрому Гієна-Барре). Наслідком ушкодження немієлінізованих та мієлінізованих волокон є, головним чином, втрата відчуття температури і болю; наслідком ушкодження великих мієлінізованих волокон є порушення рухової активності або пропріоцепції. Деякі невралгії (наприклад, спричинені токсичністю свинцю, застосуванням дапсону, хворобою Ліма (яка викликається укусом кліща), порфірією або синдромом Гієна-Барре) уражають, головним чином, рухові нервові волокна, інші (наприклад, спричинені раковими гангліонітами задніх корінців спинного мозку, проказою, СНІД, цукровим діабетом або хронічною інтоксикацією піридоксином) уражають, головним чином, ганглії задніх корінців спинного мозку або сенсорні нервові волокна з наслідковими сенсорними симптомами. Подеколи залучаються також черепні нерви (наприклад, у разі синдрому Гієна-Барре, хвороби Ліма, цукрового діабету і дифтерії). Встановлення залучених способів впливу допомагає визначити причину.

Множинна мононевралгія є, як правило, вторинною відносно дифузної хвороби сполучної тканини судин (наприклад, нодозний поліартеріїт,

системний червоний вовчак, синдром Гужеро-Шегрена, ревматоїдний артрит), саркоїдозу, хвороб обміну речовин (наприклад, діабет, амілоїдоз) або інфекційних захворювань (наприклад, хвороба Ліма, ВІЛ-інфекція). Мікроорганізми можуть викликати множинну мононевропатію шляхом прямого проникнення до нерва (наприклад, у разі прокази).

Поліневропатія, спричинена гострими лихоманковими захворюваннями, може бути наслідком дії токсину (наприклад, у разі дифтерії) або автоімунної реакції (наприклад, у разі синдрому Гійєна-Барре); поліневропатія, яка іноді виникає після імунізації, ймовірно, також є автоімунною.

Токсичні агенти, як правило, викликають поліневропатію, але подеколи мононевропатію. До їх числа належить еметин, гексобарбітал, барбітал, хлорбутанол, сульфонаміди, фенітоїн, нітрофурантоїн, алкалоїди барвинку, важкі метали, монооксид вуглецю, триортокрезилфосфат, ортодинітрофенол, багато розчинників, інші промислові отрути і певні лікарські засоби проти СНІД (наприклад, зальцитабін, діданозин).

Невропатія, спричинена хіміотерапевтичними засобами, є явно вираженим і серйозним побічним ефектом декількох широко застосовуваних хіміотерапевтичних засобів, у тому числі алкалоїдів барвинку (вінбластин, вінкрестин та віндезин), платиновмісних лікарських засобів (цисплатин) та таксанів (паклітаксел). Спричинення периферичної невропатії є поширеним фактором обмеження лікування із застосуванням хіміотерапевтичних лікарських засобів.

Поліневропатія може бути наслідком дефіцитів поживних речовин та розладів обміну речовин. Причиною часто є В-вітамінна недостатність (наприклад, у разі алкоголізму, бері-бері, злоякісної анемії, дефіциту піридоксину, спричиненого ізоніазидом, синдрому мальабсорбції і невтримного блювання вагітних). Поліневропатія також спостерігається у разі гіпотиреозу, порфірії, саркоїдозу, амілоїдозу і уремії. Цукровий діабет може спричинити поліневропатію дистальних сенсорно-рухових нервів (найпоширенішу), множинну мононевропатію і вогнищеву мононевропатію (наприклад, око-рухових або відвідних черепних нервів).

Поліневропатія унаслідок розладів обміну речовин (наприклад, цукровий діабет) або ниркової недостатності розвивається повільно, часто впродовж місяців або років. Вона часто розпочинається сенсорними порушеннями у нижніх кінцівках, які є часто більш тяжкими на дистальних, аніж на проксимальних сегментах кінцівок. Часто найбільш вираженим є відчуття поколювання на периферичних ділянках, оніміння, пекучий біль або порушення суглобової пропріоцепції і відчуття вібрації. Біль часто погіршується у нічний час і може загострюватись у разі торкання ураженої ділянки або змінами температури. У тяжких випадках, існують об'єктивні ознаки втрати чутливості, як правило, з локалізацією на кінцевих ділянках кінцівок. Рефлекс п'яtkового сухожилля та інші глибокі сухожильні рефлекс є ослабленими або відсутніми. У разі глибокої втрати чутливості можуть розвиватись безболісні виразки або суглоби Шарко. Сенсорні або пропріоцептивні розлади можуть викли-

кати порушення ходи. Наслідком залучення рухових нервових волокон може бути слабкість і атрофія дистальних м'язів. Додатково або вибірно може залучатись вегетативна нервова система, наслідком чого є нічна діарея, нетримання сечі або калу, імпотенція або ортостатична гіпотензія. Вазомоторні симптоми різняться. Шкіра може бути блідшою і сухішою за нормальну, подеколи зі зміною забарвлення на смагляве; потовиділення може бути надмірним. У тяжких, тривалих випадках поширеними є трофічні зміни (гладенька і блиска шкіра, нігті із заглибленнями або виступами, остеопороз).

Трофічна поліневропатія є звичайним явищем серед алкоголіків та людей з порушенням або недостатністю харчування. Первинна аксонопатія може привести до вторинної демієлінізації і руйнування аксонів найдовших і найбільших нервів. Невідомо, чи є причиною недостатність тіаміну або іншого вітаміну (наприклад, піридоксину, пантотенової кислоти, фолієвої кислоти). Невропатія унаслідок піридоксинової недостатності спостерігається, як правило, лише у людей, які приймають ізоніазид із приводу туберкульозу; у дітей із недостатністю або залежністю від піридоксину можуть траплятись конвульсії. Виснаження і симетрична слабкість дистальних кінцівок розвивається, як правило, поступово, однак може швидко прогресувати, подеколи супроводжувана втратою чутливості, парестезією і болем.

Тривалий, тупий біль, судоми, відчуття холоду, печії і оніміння у литках і стопах можуть погіршуватись у разі дотику. У разі невизначеної етіології можуть застосовуватись численні вітаміни, але вони не чинять доведеної сприятливої дії.

Спадкові невропатії підрозділяються на сенсорно-рухові невропатії або сенсорні невропатії. Хвороба Шарко-Марі-Тута є найпоширенішою спадковою сенсорно-руховою невропатією. Менш поширені сенсорно-рухові невропатії розпочинаються при народженні і є причиною більш тяжкої інвалідності. У разі сенсорних невропатій, які є рідким явищем, втрата відчуття периферичного болю і температури є більш вираженою, аніж втрата відчуття вібрації і положення. Головною проблемою є каліцтва ступні унаслідок нечутливості до болю, з частими інфекціями і остеомієлітом. До числа спадкових невропатій належать також гіпертрофічна інтерстиціальна невропатія і синдром Дежеріна.

Злоякісне новоутворення може також спричинити поліневропатію через моноклональну гаммапатію (множинна мієлома, лімфома), проникнення амілоїду або трофічні недостатності чи у формі паранеопластичного синдрому.

Незважаючи на різну етіологію, наприклад, інфекційні патогени або автоімунні реакції, наслідком усіх неврологічних запальних захворювань є втрата неврологічних функцій і вони можуть привести до паралічу і смерті. Хоча для деяких неврологічних запальних захворювань є доступними нечисленні терапевтичні засоби, які ослаблюють запальні реакції, існує необхідність у розробці нових лікарських засобів, результатом застосування

яких могло б бути відновлення неврологічних функцій.

SDF-1 (стромальний фактор-1)

Хемокини (хемотактичні цитокини) утворюють надродину невеликих (8-10 кДа) цитокинів, які активують сім трансмембранних, зв'язаних з G-білком рецепторів, залучених як до основної спрямованої міграції, так і до запальних реакцій, і відіграють роль, головним чином, хемоатрактантів і активаторів лейкоцитів.

Стромальний фактор 1 α , SDF-1 α , та 2 його ізоформи (β , γ) представляють собою невеликі хемотактичні цитокини, що належать до родини інтеркринів, члени якої активують лейкоцити і часто спричиняються передзапальними подразниками, наприклад, ліпополісахаридом, TNF (фактор некрозу пухлин) або IL-1 (інтерлейкін-1). Інтеркрини характеризуються присутністю 4 консервативних залишків цистеїну, які утворюють 2 дисульфідні зв'язки. Їх можна підрозділити на 2 підродини. У підродини CC, яка включає бета-хемокін, залишки цистеїну є взаємоприлеглими. У підродини CXC, яка включає альфа-хемокін, вони відокремлені проміжною амінокислотою. Білки SDF-1 належать до останньої згаданої групи. SDF-1 є природним лігандом CXCR4 (LESTR/фузин) хемокінного рецептора. Альфа, бета і гамма ізоформи є наслідком альтернативного сплайсингу одного гена. Альфа-форма є похідною екзонів 1-3, у той час як бета-форма містить додаткову послідовність з екзону 4. Перші три екзони SDF-1 γ є ідентичними екзонам SDF-1 α та SDF-1 β . Четвертий екзон SDF-1 γ розміщується через 3200 п.н. у 5'-3'-напрямку від третього екзону на локусі SDF-1 і знаходиться між третім і четвертим екзонами SDF-1 β .

Нещодавно були описані три нові ізоформи SDF-1, SDF-1 дельта, SDF-1 епсилон та SDF-1 фі (Ю (Yu) та інші, 2006). Ізоформа SDF-1 δ є альтернативно сплайсованою на останньому кодоні відкритої рамки зчитування SDF-1 α , результатом чого є одержання інтрону довжиною 731 п.н., де кінцевий екзон SDF-1 α є розщепленим на дві частини. Перші три екзони SDF-1 ϵ та SDF-1 ϕ є на 100% ідентичними екзонам ізоформ SDF-1 β та SDF-1 γ .

Ген SDF-1 експресується повсюдно, за виключенням клітин крові; він чинить *in vitro* дію на лімфоцити і моноцити, але не на нейтрофіли, і є високоактивним хемоатрактантом для мононуклеарів *in vivo*. *In vitro* та *in vivo* SDF також відіграє роль хемоатрактанту для людських гемопоетичних клітин-попередників, що експресують CD34.

SDF-1 та його рецептор CXCR4 відіграють важливу роль у системі кровотворення і нервовій системі, оскільки видалення ліганду або рецептора є смертельним для зародка унаслідок аномального розвитку ЦНС (Ma (Ma) та інші, 1998; Zu (Zou) та інші, 1998).

SDF-1 α , завдяки взаємодії із своїм рецептором CXCR4, може безпосередньо спричинювати загибель клітин шляхом апоптозу у людській нейронній клітинній лінії hNT, які нагадують незрілі постміотичні холінергічні нейрони і мають ряд нейронних характеристик (Хессельгессер (Hesseltgesser) та інші, 1998).

Роль SDF-1 у розвитку і визріванні центральної нервової системи розглядається у роботі Лазаріні та інших (Лазаріні (Lazarini) та інші, 2003).

Хемокини безсумнівно залучені до запалення нервових волокон у ЦНС, але до числа їх активностей долучається також їхній вплив як біологічно важливих пептидів безпосередньо на нейроепітеліальні клітини (у тому числі нейрони, астроцити і олігодендроцити). Зокрема, хемокини впливають на проліферацію попередників олігодендроцитів (OLP), що ілюструється GRO- α /CXCL1 (Робінсон (Robinson) та інші, 1998), на структуру тканинних базofilних гранулоцитів мозочка, у разі SDF-1 α (Жу (Zhu) та інші, 2002) та активаційні стани мікроглії, прикладом чого є фракталін/CX3CL1 (Зуйовіч (Zujovic) та інші, 2000), окрім усього іншого. Таким чином, як у імунній, так і у нервовій системах, хемокини можуть здійснювати цілий ряд подібних дій, у тому числі регуляцію проліферації, міграції, активації та диференціації.

Багато хемокінів та рецепторів хемокінів експресуються у ЦНС конститутивним шляхом або стимулюються медіаторами запалення. Вони залучені до багатьох нейропатологічних процесів, у тому числі розсіяного склерозу (MS) (Байетто (Bajetto) та інші, 2001; Соренсен (Sorensen) та інші, 2002).

Було показано, що експресія SDF-1 у ендотеліальних клітинах головного мозку сприяє рекрутингу імунокомпетентних клітин до ішемічної ЦНС (Стамм (Stumm) та інші, 2002), що дозволяє припустити шкідливу роль SDF-1 у запаленні нервових волокон. У контексті деменції унаслідок СНІД, було описано, що SDF-1 стимулює нейротоксичність шляхом стимулювання продукування TNF α активованою мікроглією та виділення глутамату астроцитами у *in vitro* моделі запалення нервових волокон, спричиненого gp120 (Бецці (Bezzi) та інші, 2001; Соренсен (Sorensen) та інші, 2002). Нещодавня публікація описує експресію SDF-1 α у астроцитах уражень, спричинених розсіяним склерозом (Амбросіні (Ambrosini) та інші, 2005).

Спричинення експериментального алергічного енцефаломієліту (EAE) у пацюків супроводжувалась підвищеними рівнями різних рецепторів хемокінів, у тому числі CXCR4 (Жанг (Jiang) та інші, 1998).

У WO 00/09152 говориться про те, що антагоністи CXCR4 є придатними для лікування аутоімунного захворювання, лікування розсіяного склерозу, лікування раку та пригнічення ангиогенезу.

WO 99/50461 розкриває способи лікування розладів, які включають проліферацію клітин, що відхиляється від норми або недостатню проліферацію шляхом введення сполук, які стимулюють або пригнічують активність CXCR4. Були заявлені інгібітори функції CXCR4 для лікування раків і було заявлено застосування агоністів згаданого рецептора для лікування розладів, у разі яких проліферація є недостатньою або бажаною. До числа розладів, у разі яких проліферація клітин є недостатньою, належать демієлінізуючі ураження нервової системи, унаслідок яких частина нервової системи знищується або пошкоджується демієлінізуючим захворюванням, у тому числі, напри-

клад, розсіяним склерозом та ураженнями периферичної нервової системи.

Було запропоновано також терапевтичне застосування антагоністів CXCR4/SDF-1 при неврологічних захворюваннях. У EP657468B1 пропонується застосування SDF-1 для лікування захворювань, пов'язаних із недостатньою або такою, що відхиляється від норми, проліферацією гемопоетичних клітин, стимулюванням або пригніченням нервових клітин, профілактикою або лікуванням пошкодження нервових клітин.

У WO 03/062273 описують інгібітор шляхів передачі сигналу SDF-1 для лікування запалення. Розкриті варіанти терапевтичного застосування включають запалення, пов'язане з аутоімунними захворюваннями, станами або розладами, де сприятливу роль зіграло б пригнічення імунної реакції та/або запалення у ЦНС або будь-якому іншому органі, наприклад, у разі хронічної невропатії або синдрому Гійєна-Барре.

Глейхманн (Gleichmann) та інші повідомляють про незначне тимчасове підвищення експресії мРНК SDF-1-бета після ураження периферичних нервів. Вони дійшли висновку, що їхні дані вперше демонструють картину диференційної експресії ізоформ SDF-1 при різних фізіологічних станах, таких, наприклад, як розвиток і пошкодження нервової системи (Глейхманн (Gleichmann) та інші, 2000).

SDF-1 може взаємодіяти з глікозаміногліканами (GAG), високоваріабельними розгалуженими цукровими групами, які додаються посттрансляційно до декількох білків, які у межах сполук цього самого роду називають протеогліканами (PG). Такі білки присутні на клітинній мембрані, у позаклітинному матриксі та у кровотоці, де можуть також бути присутні виділені GAG. Протеоглікани (PG), або виділені GAG, можуть утворювати комплексні сполуки з розчинними молекулами, можливо, для захисту цих молекул від протеолізу у позаклітинному середовищі. Було також висунуто припущення про те, що GAG можуть допомагати правильній презентації клітинних сигнальних молекул їх специфічному рецептору і, можливо, також модулюванню активації клітин-мішеней.

У разі хеомінів, концентрація у іммобілізованих градієнтах на місці запалення і, у подальшому, взаємодія з клітинними рецепторами та стан їх активації, як видається, модулюються різними формами GAG (Хугеверф (Hoogewerf) та інші, 1997). Таким чином, було висунуто припущення, що модуляція таких взаємодій може являти собою терапевтичний підхід у разі запального захворювання (Шварц (Schwarz), Уеллс (Wells), 1999).

Модифікований SDF-1 α , SDF-1 3/6, одержали шляхом комбінованої заміни основного кластеру залишків Lys24, His25 та Lys27 на Ser (Амара (Amara) та інші, 1999). Цей мутант був нездатним до зв'язування сульфату гепарину, однак зберіг здатність до зв'язування та активації CXCR4. У іншому експерименті досліджували ефект одиночних мутацій у тому самому домені та визначали характеристики комплексу SDF-1 α /гепарин (Садір (Sadir) та інші, 2001). Садір (Sadir) та інші припус-

тили також залучення залишків Arg41 та Lys43 до зв'язування глікозаміногліканів.

Суть винаходу

Мета цього винаходу полягає у наданні нових засобів для лікування та/або профілактики неврологічного захворювання.

У рамках цього винаходу було встановлено, що введення SDF-1 α , Met-SDF-1 α або варіанта SDF-1 α сприятливо впливає на *in vivo* тваринну модель периферичних неврологічних захворювань. Було показано також, що SDF-1 α та його варіанти пригнічують TNF- α та IL-6 у тваринній моделі з індукованим ліпополісахаридом (LPS) виділенням TNF- α , яка являє собою модель запалення.

Таким чином, експериментальні дані, наведені у цьому описі, надають нову можливість лікування неврологічних захворювань, зокрема, захворювань, пов'язаних із функціонуванням нервових і нейрогліальних клітин та запаленням нервових волокон.

Таким чином, цей винахід має відношення до застосування SDF-1 або агоніста активності SDF-1 для виготовлення лікарського засобу для лікування та/або профілактики неврологічного захворювання.

За цим винаходом, SDF-1 може також застосовуватись у комбінації з інтерфероном або остеопонтином чи кластерином для лікування та/або профілактики неврологічних захворювань. Цим винаходом передбачається також застосування нуклеїнових кислотних молекул, експресійних векторів, що містять SDF-1 та клітин, що експресують SDF-1 для лікування та/або профілактики неврологічного захворювання.

Цей винахід додатково пропонує фармацевтичні композиції, які містять SDF-1 та інтерферон або остеопонтин чи кластерин, факультативно разом з одним або декількома фармацевтично прийнятними наповнювачами.

Стислий опис фігур

На Фіг. 1 показано вміст TNF- α та IL-6 у пг/мл змішаних кортикальних культур, попередньо інкубованих на 14 день культивування клітин з 0,001 нг/мл, 0,1 нг/мл та 10 нг/мл SDF-1 α (Фіг. 1.A) або варіанта SDF-1 α (Фіг. 1.B) впродовж 3 год при температурі 37°C із подальшим доповненням 5 нг/мл LPS впродовж 48 год. Супернатанти збирали на 16 день, і рівні TNF- α та IL-6 визначали за допомогою специфічних ELISA (твердофазний імуоферментний аналіз). Як позитивні контролю, культури обробляли 25 пМ дексаметазону (Dexa), 10 нг/мл IL-10 або обробці не піддавали. Як негативний контроль, культури обробляли лише LPS.

На Фіг. 2 показано середню загальну кількість клітин $\times 10^6 \pm \text{s.e.}$ (середня квадратична помилка), рекрутованих до очеревинної порожнини через 4 год після внутрішньоочеревинного введення 200 мкл розчину NaCl (0,9%, без LPS; вихідний рівень) або 4 мкл розчину SDF-1 α або варіанта SDF-1 α , розбавленого 200 мкл розчину NaCl (0,9%, без LPS).

На Фіг. 3 показано вміст SDF-1 α у пікограмах на мікрограм загального білка (пг/мг) екстрактів спинного мозку мишей, уражених EAE (хронічна

стадія), порівняно з мишами, яких обробці не піддавали (контроль).

На Фіг. 4 показано реєстрацію електрофізіологічних показників мишей після роздавлювання сидничого нерва, яким вводили розчинник (фізіологічний розчин/0,02% розчин BSA (бичачий сироватковий альбумін)), 3 мкг/кг, 10 мкг/кг, 30 мкг/кг або 100 мкг/кг (підшкірно) SDF-1 α та 30 мкг/кг еталонної (позитивної) контрольної сполуки (IL-6). Вихідний рівень: значення, зареєстровані на протилежному боці тварин, яким вводили розчинник. Реєстрацію здійснювали на 7 день, 15 день і 22 день після пошкодження (dpi).

Фіг. 4.A показує амплітуду у мілівольтах (мВ) складного потенціалу дії м'яза.

Фіг. 4.B показує латентність у мілісекундах (мс) складного потенціалу дії м'яза.

На Фіг. 5 показано реєстрацію електрофізіологічних показників мишей після роздавлювання сидничого нерва, яким вводили розчинник (фізіологічний розчин/0,02% розчин BSA) або 30 мкг/кг (підшкірно) варіанта SDF-1 α . Вихідний рівень: значення, зареєстровані на протилежному боці тварин, яким вводили розчинник. Реєстрацію здійснювали на 7 день і 22 день після пошкодження (dpi).

Фіг. 5.A показує амплітуду у мілівольтах (мВ) складного потенціалу дії м'яза.

Фіг. 5.B показує латентність у мілісекундах (мс) складного потенціалу дії м'яза.

Фіг. 5.C показує тривалість у мілісекундах (мс) складного потенціалу дії м'яза.

На Фіг. 6 показано реєстрацію електрофізіологічних показників мишей після роздавлювання сидничого нерва, яким вводили розчинник (фізіологічний розчин/0,02% розчин BSA) або 100 мкг/кг, 30 мкг/кг, 10 мкг/кг (підшкірно) Met-SDF-1 α . Вихідний рівень: значення, зареєстровані на протилежному боці тварин, яким вводили розчинник. Реєстрацію здійснювали на 7 день і 14 день після пошкодження (dpi).

Фіг. 6.A зображає латентність у мілісекундах (мс) складного потенціалу дії м'яза.

На Фіг. 7 зображені результати введення 100 мкг/кг, 30 мкг/кг, 10 мкг/кг (підшкірно) SDF-1 α тваринній стрептозотоциновій моделі діабетичної невропатії (STZ). Позитивною контрольною молекулою є IL-6 у дозі 10 мкг/кг підшкірно.

Фіг. 7.A показує результати визначення маси тіла, яке здійснювали розпочинаючи з 11 дня до 40 дня.

Фіг. 7.B показує рівні глікемії на 7 день після введення STZ.

Фіг. 7.C показує латентність складного потенціалу дії м'яза, яку визначали на 24 день і 40 день після введення STZ.

Фіг. 7.D показує ефект SDF-1 α на швидкість провідності чутливого нерва.

Фіг. 7.E показує відносну товщину мієліну на 40 день після введення STZ з/без введення SDF-1 α , яка виражається у вигляді відношення діаметр аксону/діаметр волокна.

Фіг. 7.F показує кількість дегенерованих волокон сидничого нерва на 40 день після введення STZ.

Фіг. 7.G показує густину інтраепідермальних нервових волокон на 40 день після введення STZ.

На Фіг. 8 показані результати введення 100 мкг/кг, 30 мкг/кг, 10 мкг/кг (підшкірно) SDF-1 α на показники механічної та термічної алодинії на стрептозотоциновій моделі діабетичної невропатії (STZ).

Фіг. 8.A показує пороговий тиск, який визначали за допомогою випробування з волоконцями фон Фрея на 20 день після введення STZ.

Фіг. 8.B показує результати визначення латентності за допомогою випробування на гарячій пластині при температурі 52°C на 40 день після введення STZ.

На Фіг. 9 показана частота несправжніх виявлень, яка оцінювалась за кривою: сукупність італійців, хворих на первинний прогресуючий розсіяний склероз/кількість позитивних маркерів R при R<100.

На Фіг. 10 показано SNP_A-2185631 у гені SDF-1.

На Фіг. 11 показані прогнозовані амінокислотні послідовності сплайсованих варіантів людського SDF-1.

На Фіг. 12 показано, що SNP_A-2185631 знаходиться у гені SDF-1 і розміщується у останньому інтроні SDF-1 ϵ та SDF-1 ϕ .

Докладний опис винаходу

У рамках цього винаходу було встановлено, що введення SDF-1 сприятливо впливає на *in vivo* тваринну модель периферичних неврологічних захворювань. На мишачій моделі невропатії, спричиненої роздавлюванням сидничого нерва, введення SDF-1 α , Met-SDF-1 α або варіанту SDF-1 α сприятливо впливало на усі фізіологічні показники, які мали відношення до регенерації, цілісності і життєздатності нерва.

Було показано, що SDF-1 α і варіант SDF-1 α пригнічують TNF- α та IL-6 у тваринній моделі зі спричиненням LPS виділенням TNF- α , яка являє собою характерну для даного роду модель запалення нервових волокон.

У цьому винаході продемонстровано захисний ефект SDF-1 α у разі діабетичної невропатії та болю невротичного походження.

На додаток до цього, було встановлено генетичний зв'язок між геном SDF-1 і первинним прогресуючим розсіяним склерозом.

Таким чином, експериментальні дані, наведені у цьому описі, забезпечують нову можливість лікування неврологічних захворювань, зокрема, захворювань, пов'язаних із функціонуванням нервових та нейрогліальних клітин і запаленням нервових волокон.

Таким чином, цей винахід має відношення до застосування SDF-1 або агоніста активності SDF-1 для виготовлення лікарського засобу для лікування та/або профілактики неврологічного захворювання.

Термін "SDF-1", який застосовується у цьому описі, означає непротесований зрілий людський SDF-1 α або його фрагмент, що має активність SDF-1, наприклад, його зв'язування з рецептором CXCR4. Амінокислотна послідовність людського SDF-1 α представлена у лістингу послідовностей,

який додається до цього опису, як ПОСЛІДОВНИСТЬ № 1. Термін "SDF-1", вживаний у цьому описі, додатково означає будь-який SDF-1, який одержали від тварин, наприклад, мишачий, бичачий або пацючий SDF-1, доти, доки він має достатню ідентичність для підтримання активності SDF-1.

Термін "SDF-1", вживаний у цьому описі, додатково означає біологічно активні мутеїни та фрагменти, наприклад, природні ізоформи SDF-1. Повідомлялось про шість альтернативно сплайсованих транскрипційних варіантів гена, який кодує різні ізоформи SDF-1 (ізоформи SDF-1 α , β , γ , δ , ϵ та ϕ). Послідовності людських SDF-1 α , SDF-1 β , SDF-1 γ , SDF-1 δ , SDF-1 ϵ та SDF-1 ϕ представлені у лістингу послідовностей, який додається до цього опису, як ПОСЛІДОВНОСТІ № 1, № 2, № 3, № 14, № 15 та № 16, відповідно.

Термін "SDF-1", вживаний у цьому описі, додатково означає ізоформи, мутеїни, гібридні білки, функціональні похідні, активні фракції, фрагменти або їхні солі. Ці ізоформи, мутеїни, гібридні білки або функціональні похідні, активні фракції або фрагменти зберігають біологічну активність SDF-1. За варіантом, якому віддається перевага, вони мають біологічну активність, поліпшену порівняно з SDF-1 дикого типу.

Термін "SDF-1", зокрема, означає людську зрілу ізоформу SDF-1 α , ідентифіковану ПОСЛІДОВНИСТЮ № 1, людську зрілу ізоформу SDF-1 β , ідентифіковану ПОСЛІДОВНИСТЮ № 2, людську зрілу ізоформу SDF-1 γ , ідентифіковану ПОСЛІДОВНИСТЮ № 3, людську зрілу ізоформу SDF-1 δ , ідентифіковану ПОСЛІДОВНИСТЮ № 14, людську зрілу ізоформу SDF-1 ϵ , ідентифіковану ПОСЛІДОВНИСТЮ № 15 і людську зрілу ізоформу SDF-1 ϕ , ідентифіковану ПОСЛІДОВНИСТЮ № 16; людську зрілу ізоформу SDF-1 α , яка має додатковий N-кінцевий метіонін, ідентифіковану ПОСЛІДОВНИСТЮ № 7; скорочені форми SDF-1 α , наприклад, форму, яка відповідає амінокислотним залишкам 4-68 людської зрілої ізоформи SDF-1 α , ідентифіковану ПОСЛІДОВНИСТЮ № 8, форму, яка відповідає амінокислотним залишкам 3-68 людської зрілої ізоформи SDF-1 α , ідентифіковану ПОСЛІДОВНИСТЮ № 9 і форму, яка відповідає амінокислотним залишкам 3-68 людської зрілої ізоформи SDF-1 α і має додатковий N-кінцевий метіонін, ідентифіковану ПОСЛІДОВНИСТЮ № 10. Термін "SDF-1" означає також гібридні білки, які містять поліпептид SDF-1, як визначено вище, функціонально зв'язаний з гетерологічним доменом, наприклад, однією або декількома амінокислотними послідовностями, які можуть бути вибрані з-посеред наведених далі: екстрацелюлярний домен мембранного білка, константні ділянки імуноглобулінів (Fc-ділянка), мултимеризаційні домени, сигнали екскреції та маркерні послідовності (наприклад, послідовності, які допомагають здійснювати очистку за спорідненістю: мітка НА, гістидинова мітка, GST (глутатіон-S-трансфераза), FLAAG пептиди або MBP (основний мієліновий білок). Перевагу віддають Fc-гібридним білкам SDF-1 α , які визначаються ПОСЛІДОВНИСТЮ № 13)

Термін "варіант SDF-1 α ", вживаний у цьому описі, означає мутант SDF-1, який має знижену GAG-зв'язувальну активність. Словосполучення "знижена GAG-зв'язувальна активність" або "дефектний за GAG-зв'язувальною здатністю" означає, що мутанти CC-хемокіну мають знижену здатність до зв'язування GAG, тобто з GAG (наприклад, сульфатом гепарину) зв'язується менший відсоток кожного з цих мутантів, порівняно з відповідною молекулою дикого типу, що було визначено за допомогою аналізів, опис яких було наведено у розкритті таких мутантів знаного рівня техніки. Зокрема, таким мутантом є мутант, вже розкритий у знаному рівні техніки, із замінами Lys24 His25 та Lys27 на Ser (Амара (Amara) та інші, J. Biol. Chem., 1999 Aug. 20; 274(34):23916-25) або на Ala (ПОСЛІДОВНИСТЬ № 4). Інші дефектні за GAG-зв'язуванням мутанти можна одержати шляхом комбінованої заміни основного кластеру залишків Lys24, His25 та Lys27 і будь-яких інших залишків, залучених до зв'язування глікозаміногліканів, наприклад, Arg41 та Lys43, на Ser та/або Ala. Можливими комбінаціями можуть бути, наприклад, Lys24 Lys27, Lys24 His25, His25 Lys27, Lys24 Arg 41, His25 Arg41, Lys27 Arg41, Lys24 Lys43, His 25 Lys43, Lys27 Lys43 та Arg41 Lys43.

Термін "варіант SDF-1 α ", зокрема, означає мутант SDF-1 α , який має знижену GAG-зв'язувальну активність і ідентифікується ПОСЛІДОВНИСТЮ № 4 (потрійний мутант SDF-1 α , який має Lys24Ala, His25Ala, Lys27Ala); мутант SDF-1 α , який має додатковий початковий залишок метіоніну і потрійну мутацію Lys25Ala, His26Ala, Lys28Ala і ідентифікується ПОСЛІДОВНИСТЮ № 11; та мутант SDF-1 α із зниженою GAG-зв'язувальною активністю, яка має одиночну мутацію Lys27Cys і ідентифікується ПОСЛІДОВНИСТЮ № 12. Варіанти SDF-1 α , визначені у цьому описі, і, зокрема, варіант SDF-1 α , ідентифікований ПОСЛІДОВНИСТЮ № 12, можуть модифікуватись за допомогою PEG (поліетиленгліколю); цей процес відомий як "пегілування". Пегілування може здійснюватись за допомогою будь-якої з реакцій пегілування, відомих у цій галузі (дивись, наприклад, EP 0 154 316).

До обсягу цього винаходу включені також варіанти SDF-1 та SDF-1 α , визначені у цьому описі, які мають делецію C-кінцевої амінокислоти.

Формами SDF-1, які мають делецію C-кінцевої амінокислоти, яким віддають особливу перевагу, є скорочені форми SDF-1 α , наприклад, форма, яка відповідає амінокислотним залишкам 3-67 зрілого людського SDF-1 α і ідентифікується ПОСЛІДОВНИСТЮ № 17, та форма, яка відповідає амінокислотним залишкам 3-67 зрілого людського SDF-1 α , яка має додатковий N-кінцевий залишок метіоніну і ідентифікується ПОСЛІДОВНИСТЮ № 18.

Термін "агоніст активності SDF-1", вживаний у цьому описі, означає молекулу, яка стимулює або імітує активність SDF-1, наприклад, агоністичні антитіла рецептора SDF-1 або агоністи невеликої молекулярної маси, що активують передавання сигналу через рецептор SDF-1, наприклад, рецептор CXCR4.

Термін "агоніст активності SDF-1", вживаний у цьому описі, означає також агенти, які посилюють

SDF-1-опосередковані активності, наприклад, стимуляцію прикріплення клітин до складових позаклітинного матриксу, морфогенез клітин олігодендроцитної лінії диференціювання у мієлінопродукуючі клітини, стимуляцію рекрутингу, проліферації, диференціації або визрівання клітин олігодендроцитної лінії диференціювання (наприклад, клітин-попередників) або стимуляцію захисту клітин олігодендроцитної лінії диференціювання від апоптозу та пошкодження клітин. Подібні активності SDF-1 мають також відношення до шванівських клітин.

За варіантом здійснення цього винаходу, якому віддається перевага, SDF-1 являє собою SDF-1α.

За додатковими варіантом здійснення цього винаходу, якому віддається перевага, SDF-1 являє собою варіант SDF-1α.

Терміни "лікування" та "профілактика", вживані у цьому описі, слід розуміти, як запобігання, пригнічення, послаблення, поліпшення або зміни напрямку розвитку одного або декількох симптомів або причини(чин) неврологічного захворювання, а також симптомів, захворювань або ускладнень, які супроводжують неврологічне захворювання. У разі "лікування" неврологічного захворювання, речовини за цим винаходом вводять після започаткування захворювання, "профілактика" означає введення речовин до того, як у хворого можуть бути помічені ознаки захворювання.

Термін "неврологічні захворювання", вживаний у цьому описі, означає усі відомі неврологічні захворювання або розлади чи пошкодження ЦНС або вегетативної нервової системи, у тому числі ті, які докладно описані у розділі "Передумови створення винаходу".

До числа неврологічних захворювань належать розлади, пов'язані з порушенням функціонування ЦНС або периферичної нервової системи, наприклад, захворювання, пов'язані з передаванням нервового імпульсу, головним болем, травмою черепа, інфекціями ЦНС, розладами нейроофтальмологічних та черепних нервів, функцією та дисфункцією часток головного мозку, руховими розладами, затьмаренням свідомості і коматозним станом, демієлінізуючими захворюваннями, делірієм та деменцією, порушеннями місця сполучення черепа та шиї, припадками, розладами спинного мозку, розладами сну, розладами периферичної нервової системи, хворобами судин головного мозку або м'язовими розладами. Для визначення цих розладів, дивись, наприклад, довідник "The Merck Manual for Diagnosis and Therapy", сімнадцяте видання, публікація Merck Research Laboratories, 1999.

Запалення нервових волокон відбувається при різних неврологічних захворюваннях. Багато подразників ініціюють запалення нервових волокон, яке може спричинюватись ураженням нервових клітин або олігодендроцитів чи бути наслідком травми, пошкодження центральних або периферичних нервів чи вірусної або бактеріальної інфекції. Головними наслідками запалення нервових волокон є i) секреція різних запальних хемокинів

астроцитами, мікрогліальними клітинами; та ii) рекрутинг додаткових лейкоцитів, які будуть додатково стимулювати астроцити або мікроглію. У разі хронічних нейродегенеративних захворювань, таких як розсіяний склероз (MS), хвороба Альцгеймера (AD) або бічний аміотрофічний склероз (ALS), наявність стійкого запалення нервових волокон, як гадають, приймає участь у прогресуванні захворювання. Неврологічні захворювання, пов'язані із запаленням нервових волокон, можуть також називатись неврологічними запальними захворюваннями.

За варіантом здійснення цього винаходу, якому віддається перевага, неврологічне захворювання пов'язується із запаленням, зокрема, запаленням нервових волокон.

За варіантом, якому віддається перевага, неврологічні захворювання за цим винаходом вибрані з групи, до складу якої входять травматичне пошкодження нерва, інсульт, демієлінізуючі захворювання ЦНС та периферичної нервової системи, невротатії та нейродегенеративні захворювання.

Травматичне пошкодження нерва може стосуватись периферичної нервової системи або ЦНС, це може бути травма головного або спинного мозку, у тому числі параплегія, як описано у наведеному вище розділі "Передумови створення винаходу".

За варіантом здійснення цього винаходу, якому віддається перевага, травматичним пошкодженням нерва є травма периферичного нерва або травма спинного мозку.

Інсульт може бути спричинений гіпоксією або ішемією головного мозку. Його також називають хворобою судин головного мозку. Інсульт може включати втрату функцій головного мозку (неврологічні розлади), які спричинюються припиненням кровообігу на ділянках головного мозку. Припинення кровообігу може спричинюватись згустками крові, які утворюються у головному мозку (тромби) або шматочками атеросклеротичної бляшки чи іншим матеріалом, який пересувається до головного мозку з іншого місця (емболи). Кровотеча у межах головного мозку може викликати появу симптомів, які нагадують інсульт. Найпоширенішою причиною інсульту є інсульт, як вторинна проява атеросклерозу (тромбоз головного мозку), і, таким чином, цей винахід також має відношення до лікування атеросклерозу.

Периферична невротатія може мати відношення до синдрому втрати чутливості, слабості і атрофії м'язів, ослаблених глибоких сухожильних рефлексів і вазомоторних симптомів, самостійно або у будь-якій комбінації. Невротатія може уражати одиночний нерв (мононевротатія), два або декілька нервів на окремих ділянках (множинна мононевротатія) або багато нервів одночасно (поліневротатія). Уражатись може, головним чином, аксон (наприклад, у разі цукрового діабету, хвороби Ліма, уремії або токсичними агентами) або мієлінова оболонка чи шванівська клітина (наприклад, у разі гострої або хронічної запальної поліневротатії, лейкодистрофії або синдрому Гійєна-Барре). Додаткові невротатії, які можуть лікуватись за цим винаходом, можуть, наприклад,

спричинюватись токсичністю свинцю, застосуванням дапсону, укусом кліща, порфірією або синдромом Гійєна-Барре, і вони можуть уражати, головним чином, рухові нервові волокна. Інші невропатії, наприклад, спричинені раковими гангліонітами задніх корінців спинного мозку, проказою, СНІД, цукровим діабетом або хронічною інтоксикацією піридоксином, можуть уражати, головним чином, ганглії задніх корінців спинного мозку або сенсорні нервові волокна з наслідковими сенсорними симптомами. Залучатись можуть також черепні нерви, наприклад, у разі синдрому Гійєна-Барре, хвороби Ліма, цукрового діабету і дифтерії.

Хвороба Альцгеймера являє собою розлад, який включає погіршення розумової діяльності унаслідок зміни тканин головного мозку. Згадані зміни включають зморщування тканин головного мозку, первинну дегенеративну деменцію і дифузну атрофію головного мозку. Хворобу Альцгеймера називають також старечим слабоумством альцгеймерівського типу (SDAT).

Хвороба Паркінсона (PD) являє собою розлад головного мозку, який характеризується тремтінням та труднощами, які виникають під час ходіння, здійснення рухів та їх координації. Згадана хвороба пов'язується з пошкодженням частини головного мозку, яка контролює рух м'язів і її називають також паркінсоновим тремором або тремтливим паралічем.

Хорея Гентингтона являє собою спадкове, автосомно-домінантне неврологічне захворювання. Генетичне відхилення від норми полягає у надлишковій кількості тандемно повторюваних нуклеотидних послідовностей CAG. До інших захворювань з CAG-повторами належать, наприклад, м'язові атрофії хребта (SMA), наприклад, хвороба Кеннеді, і більшість автосомно-домінантних мозочкових атаксій (ADCA), які, за генетичною номенклатурою, є відомими як спінально-мозочкові атаксії (SCA).

Бічний аміотрофічний склероз, ALS, являє собою розлад, який спричинює прогресуючу втрату регуляції нервовою системою довільно скоротних м'язів, у тому числі руйнування нервових клітин у головному та спинному мозку. Бічний аміотрофічний склероз, який називають також хворобою Лу Геріга, являє собою розлад, який включає втрату спроможності застосування та контролювання м'язів.

Розсіяний склероз (MS) являє собою запальне демієлінізуюче захворювання центральної нервової системи (ЦНС), яке набуває рецидивно-ремітуючого або прогресуючого перебігу. Розсіяний склероз не є єдиним демієлінізуючим захворюванням. Аналогом цього захворювання у периферичній нервовій системі (PNS) є хронічна запальна демієлінізуюча полірадикулоневропатія (CIDP). На додаток до цього, існують гострі монофазні розлади, наприклад, запальна демієлінізуюча полірадикулоневропатія, яку називають синдромом Гійєна-Барре (GBS), у периферичній нервовій системі, та гострий розсіяний енцефаломієліт (ADEM) у центральній нервовій системі. До числа додаткових неврологічних розладів нале-

жать невропатії з аномальною мієлінізацією, наприклад, розлади, згадані у наведеному вище розділі "Передумови створення винаходу", а також синдром каналу зап'ястя. Травматичне пошкодження нервів може супроводжуватись ортопедичними ускладненнями хребетного стовпа, які також входять до числа захворювань за цим винаходом.

До обсягу цього винаходу входять також менш відомі неврологічні захворювання, наприклад, нейрофіброматоз або множинна системна атрофія (MSA). Додаткові розлади, які можуть лікуватись за цим винаходом, були докладно описані у наведеному вище розділі "Передумови створення винаходу".

За додатковим варіантом здійснення, якому віддається перевага, неврологічним захворюванням є периферична невропатія, за варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, діабетична невропатія. За цим винаходом, перевагу віддають також невропатіям, пов'язаним з хіміотерапією або спричиненим нею.

Термін "діабетична невропатія" означає будь-яку форму діабетичної невропатії або один чи декілька симптомів або розладів, які супроводжують або є спричиненими діабетичною невропатією чи ускладненнями діабету, які уражають нерви, як докладно описано у наведеному вище розділі "Передумови створення винаходу". Діабетична невропатія може бути поліневропатією. У разі діабетичної поліневропатії, одночасно уражається багато нервів. Діабетична невропатія може також бути мононевропатією. Наприклад, у разі вогнищевої мононевропатії, хвороба уражає один нерв, наприклад, окоруховий або відвідний черепний нерв. Це може також бути множинна мононевропатія, коли два або декілька нервів є ураженими на окремих ділянках.

За додатковим варіантом здійснення, якому віддається перевага, неврологічним розладом є демієлінізуюче захворювання. До числа демієлінізуючих захворювань, за варіантом, якому віддається перевага, належать демієлінізуючі стани ЦНС, наприклад, гострий розсіяний енцефаломієліт (ADEM) та розсіяний склероз (MS), а також демієлінізуючі захворювання периферичної нервової системи (PNS). До останніх згаданих належать такі захворювання, як хронічна запальна демієлінізуюча полірадикулоневропатія (CIDP) та гості монофазні розлади, наприклад, запальна демієлінізуюча полірадикулоневропатія, яку називають синдромом Гійєна-Барре (GBS).

За додатковим варіантом здійснення, якому віддається перевага, демієлінізуючим захворюванням є розсіяний склероз.

За варіантом здійснення цього винаходу, якому віддають особливу перевагу, демієлінізуючим захворюванням є первинний прогресуючий розсіяний склероз.

За іншим варіантом здійснення цього винаходу, якому віддають особливу перевагу, демієлінізуючим захворюванням є вторинний прогресуючий розсіяний склероз. За ще іншим додатковим варіантом здійснення, якому віддається перевага, демієлінізуюче захворювання вибране з-посеред

хронічного запального розсіяного склерозу, демієлінізуючої поліневропатії (CIPD) та синдрому Гієна-Барре (GBS).

Додатковий варіант здійснення цього винаходу, якому віддається перевага, має відношення до лікування та/або профілактики нейродегенеративного захворювання. Згадане нейродегенеративне захворювання вибрано з групи, яку складають хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона, хорея Гентингтона та ALS.

За варіантом здійснення, якому віддається перевага, SDF-1 вибраний з-посеред пептиду, поліпептиду або білка, який було вибрано з групи, яка включає:

а) поліпептид, який містить амінокислоти ПОСЛІДОВНОСТІ № 1;

б) поліпептид, який містить амінокислоти ПОСЛІДОВНОСТІ № 4;

в) поліпептид, який містить амінокислоти ПОСЛІДОВНОСТІ № 7;

г) поліпептид (а)-(в), який додатково містить сигнальну послідовність, за варіантом, якому віддається перевага, амінокислоти ПОСЛІДОВНОСТІ № 5;

д) мутеїн за будь-яким із пунктів від (а) до (г), де амінокислотна послідовність має щонайменше 40% або 50% чи 60% або 70% чи 80% або 90% ідентичність із щонайменше однією з послідовностей від (а) до (г);

е) мутеїн за будь-яким із пунктів від (а) до (г), який кодується послідовністю ДНК, яка гібридується з комплексом нативної послідовності ДНК, яка кодує будь-який продукт пунктів від (а) до (г) за умов підвищеної жорсткості;

ж) мутеїн за будь-яким із пунктів від (а) до (г), де будь-які зміни амінокислотної послідовності є консервативними амінокислотними замінами амінокислотних послідовностей від (а) до (г);

з) сіль або ізоформу, гібридний білок, функціональну похідну або активну фракцію за будь-яким із пунктів від (а) до (г).

Активні фракції або фрагменти можуть містити будь-яку частину або домен будь-якої з ізоформ SDF-1, наприклад, N-кінцеву частину C-кінцевої частини або будь-яку з ізоформ SDF-1.

Фахівцю у цій галузі буде зрозуміло, що навіть менших частин SDF-1 може бути достатньо для здійснення їхніх функцій, наприклад, активного пептиду, який містить залишки незамінних амінокислот, необхідні для функції SDF-1, наприклад, його зв'язування з рецептором CXCR4. Зв'язування з рецептором може, наприклад, визначатись шляхом піддання іммобілізованого рецептора дії його міченого ліганду та неміченого експериментального білка, де зменшення ступеня зв'язування міченого ліганду, порівняно з контролем, вказує на рецепторзв'язувальну активність експериментального білка. За іншим аналізом, спектроскопією поверхневого плазмонного резонансу, рецептор або білок, який підлягає аналізу, іммобілізують на плоскому сенсорному чіпі у протоковій камері, після чого над першим білком безперервним потоком пропускають розчин, який містить гаданий взаємодіючий партнер; світло спрямовують на чіп під певним кутом, і визначають кут резонансу відбитого

світла; встановлення білок-білкової взаємодії викликає зміну згаданого кута (наприклад, BIAcore®, Biacore International AB). Огляд інших методів, придатних для аналізу білок-білкових взаємодій (наприклад, афінна хроматографія, афінний блотинг та коімунопреципітація) або визначення зв'язувальної спорідненості (наприклад, білок-специфічна афінна хроматографія, осадження, гель-фільтрація, флуоресцентні методи, твердофазне збирання зразків урівноважених розчинів і поверхнево-плазмонний резонанс) наведено у роботі Фізіцкі Е.М. та Філдс С. (Фізіцкі (Phizicky) та Філдс (Fields), 1995; Садір (Sadir) та інші, 2001).

Фахівцю у цій галузі буде також зрозуміло, що мутеїни, солі, ізоформи, гібридні білки, функціональні похідні або активні фракції SDF-1 будуть зберігати подібну, або навіть кращу біологічну активність SDF-1. Біологічна активність SDF-1 та мутеїнів, ізоформ, гібридних білків або функціональних похідних, активних фракцій чи фрагментів або їхніх солей може визначатись за допомогою біоаналізу на клітинній системі.

Активні фракції, яким віддається перевага, мають активність, яка є однаковою або кращою за активність непроцесованого SDF-1 або які мають додаткові переваги, наприклад, кращу стабільність або нижчу токсичність чи імуногенність, або вони є легшими для продукування у великих кількостях або легше піддаються очищенню. Фахівцю у цій галузі буде зрозуміло, що мутеїни, активні фрагменти і функціональні похідні можуть одержуватись шляхом клонування відповідної кДНК у відповідних плазмідах і їх випробування із застосуванням клітинного аналізу, як згадувалось вище.

Білки за цим винаходом можуть бути глікозилованими або неглікозилованими, їх можна одержати з природних джерел, наприклад, біологічних рідин організму, або, за варіантом, якому віддається перевага, одержати із застосуванням рекомбінантних методів. Рекомбінантна експресія може здійснюватись у прокаріотних експресійних системах, наприклад, *E. coli*, або еукаріотних, наприклад, клітинах комах, а за варіантом, якому віддається перевага, у експресійних системах ссавців, наприклад, клітинах CHO (культура клітин яєчника китайського хом'ячка) або клітинах HEK (культура клітин нирки людського ембріона). Окрім того, білки за цим винаходом можуть модифікуватись, продовжуватись або скорочуватись шляхом видалення або додавання на N-кінці метіоніну (Met) або амінооксипентану (AOP) доти, доки зберігаються нейрозахисні ефекти.

Термін "мутеїни", вживаний у цьому описі, означає аналоги SDF-1, у яких один або декілька амінокислотних залишків природного SDF-1 замінюють на інші амінокислотні залишки або їх піддають делеції чи один або декілька амінокислотних залишків додають до природної послідовності SDF-1 без значної зміни активності одержаних продуктів, порівняно з SDF-1 дикого типу. Ці мутеїни одержують відомими методами синтезу та/або способами сайт-спрямованого мутагенезу чи будь-яким іншим відомим, придатним у цьому разі способом.

До числа мутеїнів SDF-1, які можуть застосовуватись за цим винаходом, або нуклеїнових кислот, які їх кодують, належить кінцевий набір по суті відповідних послідовностей, як замісних пептидів або полінуклеотидів, які можуть бути звичайним шляхом одержані пересічним фахівцем у цій галузі без зайвого експериментування, виходячи з прикладів та методик, наведених у цьому описі.

До числа мутеїнів за цим винаходом належать білки, закодовані нуклеїновою кислотою, наприклад, ДНК або РНК, яка гібридується з ДНК або РНК, яка кодує SDF-1 за цим винаходом, за умов помірної або підвищеної жорсткості. ДНК, яка кодує SDF-1 α , розкривається як ПОСЛІДОВНІСТЬ № 6. Термін "жорсткі умови" означає умови гібридизації і подальшого промивання, які пересічні фахівці у цій галузі традиційно називають "жорсткими". Дивись Осбел (Ausubel) та інші, *Current Protocols in Molecular Biology*, вище, Interscience, N.Y., §§ 6.3 та 6.4 (1987, 1992), і Сембрук (Sambrook) та інші (Сембрук Дж.К. (Sambrook J.C.), Фріш Е.Ф. (Fritsch E.F.), Маніатіс Т. (Maniatis T.), (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

Без обмеження, приклади жорстких умов включають умови промивання при температурі на 12-20°C нижче обчисленої T_m досліджуваного гібриду, наприклад, у 2×SSC (стандартний цитратний фізіологічний розчин) та 0,5% SDS впродовж 5 хв, 2×SSC та 0,1% SDS впродовж 15 хв, 0,1×SSC та 0,5% SDS при температурі 37°C впродовж 30-60 хв, після чого у 0,1×SSC та 0,5% SDS при температурі 68°C впродовж 30-60 хв. Пересічним фахівцем у цій галузі зрозуміло, що жорсткі умови залежать також від довжини послідовності ДНК, олігонуклеотидних зондів (наприклад, 10-40 основ) або змішаних олігонуклеотидних зондів. У разі застосування змішаних зондів, перевагу віддають застосуванню тетраметиламонійхлориду (TMAC) замість SSC. Дивись Осбел (Ausubel), вище.

За варіантом здійснення, якому віддається перевага, будь-який з таких мутеїнів має щонайменше 40% ідентичність або гомологію з ПОСЛІДОВНОСТЯМИ № 1-4 лістингу послідовностей, який додається. За варіантом, якому віддають більшу перевагу він має щонайменше 50%, щонайменше 60%, щонайменше 70%, щонайменше 80% або за варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, щонайменше 90% ідентичність або гомологію з ними.

Ідентичність відображає взаємозв'язок між двома або декількома поліпептидними послідовностями або двома чи декількома полінуклеотидними послідовностями, який визначають шляхом порівняння послідовностей. Взагалі, ідентичність означає точну взаємну відповідність нуклеотидів або амінокислот двох полінуклеотидних або двох поліпептидних послідовностей, відповідно, по довжині послідовностей, які порівнюються.

У разі послідовностей, які не мають точної відповідності, може визначитись "% ідентичності". Взагалі, дві послідовності, призначені для порівняння, впорядковано розміщують для одержання

максимальної кореляції між послідовностями. Ця процедура може включати введення "проривів" до будь-якої однієї або обох послідовностей, для підвищення ступеня впорядкованого розміщення. Відсоток ідентичності може визначатись по всій довжині кожної з послідовностей, які порівнюються (так званий загальний порівняльний аналіз первинної структури), що є особливо придатним для послідовностей однакової або дуже подібної довжини, чи на коротших відрізках визначеної довжини (так званий локальний порівняльний аналіз первинної структури), що є більш придатним для послідовностей неоднакової довжини.

Методи порівняння ідентичності та гомології двох або декількох послідовностей добре відомі у цій галузі. Так, наприклад, програми, доступні у пакеті програм Wisconsin Sequence Analysis Package, версія 9.1 (Деверо (Devereux) та інші, 1984), наприклад, програми BESTFIT та GAP, можуть застосовуватись для визначення відсотка ідентичності між двома полінуклеотидами і відсотка гомології між двома поліпептидними послідовностями. BESTFIT застосовує алгоритм "локальної гомології" Сміта і Уотермена (Сміт (Smith) та Уотермен (Waterman), 1981) і знаходить найкращу одиночну ділянку подібності між двома послідовностями. У цій галузі відомі також інші програми для визначення ідентичності та/або подібності між послідовностями, наприклад, сімейство програм BLAST (Альтшуль (Altschul) та інші, 1990; Альтшуль (Altschul) та інші, 1997), доступне через домашню сторінку NCBI (Національний центр біотехнологічної інформації) за адресою www.ncbi.nlm.nih.gov) та FASTA (Пірсон (Pearson), 1990; Пірсон (Pearson) та Ліпман (Lipman), 1988).

Замінами, яким віддається перевага за цим винаходом для одержання мутеїнів, є заміни, відомі як "консервативні" заміни. Консервативні амінокислотні заміни поліпептидів SDF-1 можуть включати синонімічні амінокислоти у межах групи, які мають фізико-хімічні властивості, достатньо подібні для того, щоб заміна між членами групи зберегла біологічну функцію молекули (Грантем (Grantham), 1974). Зрозуміло, що у вищевизначених послідовностях інсерції та делеції амінокислот можуть також здійснюватись без зміни їхньої функції, зокрема, якщо згадані інсерції або делеції залучають лише декілька амінокислот, наприклад, менше тридцяти, а за варіантом, якому віддається перевага, менше десяти, і не видаляють або зміщують амінокислоти, які є критичними для функціональної конформації, наприклад, залишків цистеїну. Білки та мутеїни, одержані унаслідок таких делецій та/або інсерцій, входять до сфери дії цього винаходу.

За варіантом, якому віддається перевага, синонімічними амінокислотними групами є групи, визначені у Таблиці I. За варіантом, якому віддають більшу перевагу, синонімічними амінокислотними групами є групи, визначені у Таблиці II; і за варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, синонімічними амінокислотними групами є групи, визначені у Таблиці III.

Таблиця I

Групи синонімічних амінокислот, яким віддається перевага

Амінокислота	Синонімічна група
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His
Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
Pro	Gly, Ala, Thr, Pro
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly
Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile
Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys
His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His
Gln	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln
Asn	Gln, Asp, Ser, Asn
Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys
Asp	Glu, Asn, Asp
Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp

Таблиця II

Групи синонімічних амінокислот, яким віддають більшу перевагу

Амінокислота	Синонімічна група
Ser	Ser
Arg	His, Lys, Arg
Leu	Leu, Ile, Phe, Met
Pro	Ala, Pro
Thr	Thr
Ala	Pro, Ala
Val	Val, Met, Ile
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu
Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
Tyr	Phe, Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His, Gln, Arg
Gln	Glu, Gln, His
Asn	Asp, Asn
Lys	Lys, Arg
Asp	Asp, Asn
Glu	Glu, Gln
Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu
Trp	Trp

Таблиця III

Групи синонімічних амінокислот, яким віддають найбільшу перевагу

Амінокислота	Синонімічна група
Ser	Ser
Arg	Arg
Leu	Leu, Ile, Met
Pro	Pro
Thr	Thr
Ala	Ala
Val	Val
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Leu
Phe	Phe
Tyr	Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His
Gln	Gln
Asn	Asn
Lys	Lys
Asp	Asp
Glu	Glu
Met	Met, Ile, Leu
Trp	Met

Приклади здійснення амінокислотних замінів у білках, які можуть застосовуватись для одержання мутеїнів SDF-1, поліпептидів або білків, для застосування у цьому винаході, включають стадії будь-яких відомих способів, наприклад, описаних у патентах США № 4,959,314, № 4,588,585 і № 4,737,462 на ім'я Марк (Mark) та інші; № 5,116,943 на ім'я Коте (Koths) та інші; № 4,965,195 на ім'я Намен (Namen) та інші; № 4,879,111 на ім'я Чонг (Chong) та інші; та № 5,017,691 на ім'я Лі (Lee) та інші; та білки із заміною лізину, описані у патенті США № 4,904,584 на ім'я Шоу (Shaw) та інші.

Термін "гібридний білок" означає поліпептид, який містить SDF-1 або його мутеїн чи фрагмент, злитий з іншим білком, який, наприклад, має подовжений час перебування у біологічних рідинах організму. SDF-1 може, таким чином, бути злитий з іншим білком, поліпептидом тощо, наприклад, імуноглобуліном або його фрагментом.

Словосполучення "функціональні похідні", вживане у цьому описі, означає похідні SDF-1, їхні мутеїни та гібридні білки, які можна одержати з функціональних груп, які існують у вигляді бічних ланцюгів на залишках або N- чи C-кінцевих групах, способами, відомими у цій галузі, і які включаються до цього винаходу доти, доки вони залишаються фармацевтично прийнятними, тобто вони не знищують активності білка, яка є по суті подібною до активності SDF-1, і не наділяють токсичними властивостями композиції, які їх містять.

До числа цих похідних можуть, наприклад, бути включені бічні ланцюги поліетиленгліколю, які можуть маскувати ділянки детермінанти і подовжувати тривалість перебування SDF-1 у біологічних рідинах організму. До інших похідних належать складні аліфатичні ефіри карбоксильних груп, амідні карбоксильних груп, які одержують шляхом проведення реакції з аміаком або з первинними чи вторинними амінами, N-ацильні похідні вільних аміногруп амінокислотних залишків, одержані з ацильними складовими (наприклад, алканолільні або карбоциклічні ароїльні групи) або O-ацильні похідні вільних гідроксильних груп (наприклад, похідні залишків серилу або треонілу), які одержують з ацильними складовими.

Під "активними фракціями" SDF-1, мутеїнів та гібридних білків у цьому винаході розуміють будь-який фрагмент або попередники поліпептидного ланцюга білкової молекули самостійно або разом з асоційованими молекулами або залишками, пов'язаними з нею, наприклад, залишками цукру або фосфату, чи агрегати білкової молекули або залишків цукру між собою, за умови, що активність згаданої фракції є по суті подібною до активності SDF-1.

Термін "солі", вживаний у цьому описі, означає як солі карбоксильних груп, так і одержані доданням кислоти солі аміногруп молекули SDF-1 або їхні аналоги. Солі карбоксильної групи можна одержати засобами, відомими у цій галузі і вони включають неорганічні солі, наприклад, солі натрію,

кальцію, амонію, заліза або цинку тощо, та солі, одержані з органічними основами, наприклад, солі, одержані з амінами, наприклад, триетаноламіном, аргініном або лізином, піперидином, прокаїном тощо. До солей, одержаних додаванням кислоти, належать, наприклад, солі, одержані з мінеральними кислотами, наприклад, хлористоводневою кислотою або сірчаною кислотою, і солі, одержані з органічними кислотами, наприклад, оцтовою кислотою або щавлевою кислотою. Будь-яка з таких солей, звичайно, повинна зберігати біологічну активність SDF-1 за цим винаходом, тобто нейрозахисний ефект при неврологічному захворюванні.

За варіантом здійснення цього винаходу, якому віддається перевага, SDF-1 зливають із молекулою-носієм, пептидом або білком, який стимулює перехід через гематоенцефалічний бар'єр ("BBB"). Це сприяє відповідному спрямовуванню згаданої молекули до місця дії у тих випадках, коли до захворювання залучена ЦНС. Способи доставки лікарського засобу через BBB передбачають руйнування BBB осмотичними засобами або біохімічним шляхом за допомогою вазоактивних речовин, наприклад, брадикініну. Інші способи проходження через BBB можуть передбачати застосування ендогенних транспортних систем, у тому числі переносників, опосередкованих носіями, наприклад, глюкозними та амінокислотними носіями, рецепторопосередкованого трансцитозу для інсуліну та трансферину і активних відтокових переносників, наприклад, р-глікопротеїну; пенетратину, 16-членного пептиду (pAntp), який одержали з третього спірального домену Antennapedia homeoprotein, та його похідних. Способи доставки лікарських засобів через BBB додатково включають інтрацеребральну імплантацію.

Функціональні похідні SDF-1 можуть кон'югуватись із полімерами для поліпшення властивостей білка, наприклад, стабільності, періоду напіввиведення, біодоступності, переносності людським організмом або імуногенності. Для досягнення цієї мети, SDF-1 може зв'язуватись, наприклад, із поліетиленгліколем (PEG). Пегілування може здійснюватись відомими способами, опис яких наведено у WO 92/13095. Наприклад, SDF-1 α може пегілуватись на залишках, залучених до зв'язування глікозаміногліканів, наприклад, Lys24, His25, Lys27, Arg41 або Lys43.

Таким чином, за варіантом здійснення цього винаходу, якому віддається перевага, SDF-1 є пегільованим.

За додатковим варіантом здійснення цього винаходу, якому віддається перевага, гібридний білок включає злиття з імуноглобуліном (Ig). Згадане злиття може бути безпосереднім або здійснюватись за допомогою короткого лінкерного пептиду, довжина якого може становити усього від 1 амінокислотного залишку до 3 амінокислотних залишків або більше, наприклад, 13 амінокислотних залишків. Згаданий лінкер може бути трипептидом із послідовністю E-F-M (Glu-Phe-Met), наприклад, лінкерною послідовністю з 13 амінокислот, яка включає Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met, введеною, наприклад, між послідовністю SDF-1 і послідовністю імуноглобуліну. Одер-

жаний гібридний білок має поліпшені властивості, наприклад, подовжений час перебування у біологічних рідинах організму (період напіввиведення) або підвищену специфічну активність, підвищений рівень експресії. Злиття з Ig може також полегшувати очистку згаданого гібридного білка.

За ще іншим варіантом здійснення, якому віддається перевага, SDF-1 зливають із константною ділянкою молекули імуноглобуліну. За варіантом, якому віддається перевага, його зливають із ділянками важкого ланцюга, наприклад, доменами CH₂ та CH₃ людського IgG₁. Інші ізоформи молекул імуноглобуліну є також придатними для одержання гібридних білків за цим винаходом, наприклад, ізоформи IgG₂ або IgG₄, або імуноглобуліни інших класів, наприклад, IgM. Гібридні білки можуть бути мономерними або мультимерними, гетеро- або гомомультимерними. Імуноглобулінова частина гібридного білка може додатково модифікуватись таким чином, щоб не активувати зв'язування комплекменту або шляху активації комплекменту чи зв'язування з Fc-рецепторами.

Додаткові гібридні білки SDF-1 можна одержати шляхом злиття доменів, виділених з інших білків, що забезпечує одержання димерів, тримерів тощо. Прикладами білкових послідовностей, які забезпечують можливість мультимеризації поліпептидів за цим винаходом, є домени, виділені з таких білків, наприклад, як hCG (WO 97/30161), колаген X (WO 04/33486), C4BP (WO 04/20639), Erb білки (WO 98/02540) або спіралізовані спіральні пептиди (WO 01/00814).

Цей винахід додатково має відношення до застосування комбінації SDF-1 та імуносупресорного агента для виготовлення лікарського засобу для лікування та/або профілактики неврологічних розладів, для одночасного, послідовного або окремого застосування. Імуносупресорними агентами можуть бути стероїди, метотрексат, циклофосфамід, антилейкоцитарні антитіла (наприклад, CAMPATH-1) тощо.

Цей винахід додатково має відношення до застосування комбінації SDF-1 та інтерферону та/або остеопонтину та/або кластерину для виготовлення лікарського засобу для лікування та/або профілактики неврологічних захворювань, для одночасного, послідовного або окремого застосування.

Термін "інтерферон", вживаний у цьому описі заявки на патент, означає будь-яку молекулу, визначену як таку у літературі, що представляє, наприклад, інтерферони будь-яких видів, згадані у вищенаведеному розділі "Передумови створення винаходу". Інтерферон, за варіантом, якому віддається перевага, може бути людським, але може також одержуватись від інших видів доти, доки біологічна активність залишається подібною людським інтерферонам і згадана молекула не є імуногенною у людини.

Зокрема, вищенаведене визначення включає будь-які види IFN- α , IFN- β та IFN- γ . IFN- β являє собою інтерферон, якому віддається перевага за цим винаходом.

Термін "бета-інтерферон" (IFN- β), який вживається у цьому винаході, означає людський фіб-

робластний інтерферон, який одержують шляхом виділення з біологічних рідин або методами рекомбінантних ДНК з прокаріотних або еукаріотних клітин-хазяїв, а також його солі, функціональні похідні, варіанти, аналоги і фрагменти.

Особливе значення має білок, який одержали або об'єднали з комплексотвірним агентом для забезпечення пролонгованої дії. Наприклад, за цим винаходом можуть застосовуватись пегільовані варіанти, як згадувалось вище, або білки, які були піддані генно-інженерним маніпуляціям для забезпечення тривалої активності у організмі.

Термін "похідні" означає лише ті похідні, у яких не відбулось зміни однієї амінокислоти на іншу із числа двадцяти розповсюджених природних амінокислот.

Інтерферони можуть також кон'югуватись із полімерами для поліпшення стійкості білків. У WO 99/55377, наприклад, наведено опис кон'югату β -інтерферону і поліолу поліетиленгліколю (PEG).

За іншим варіантом здійснення цього винаходу, якому віддається перевага, інтерфероном є β -інтерферон (IFN- β), а за варіантом, якому віддається більшу перевагу, IFN- β 1a.

SDF-1, за варіантом, якому віддається перевага, застосовують одночасно, послідовно або окремо від інтерферону.

За варіантом здійснення цього винаходу, якому віддається перевага, SDF-1 застосовують у кількості приблизно від 0,001 мг/кг до 1 мг/кг маси тіла або приблизно від 0,01 мг/кг до 10 мг/кг маси тіла чи приблизно 9 мг/кг, 8 мг/кг, 7 мг/кг, 6 мг/кг, 5 мг/кг, 4 мг/кг, 3 мг/кг, 2 мг/кг або 1 мг/кг маси тіла чи приблизно від 0,1 мг/кг до 1 мг/кг маси тіла.

Цей винахід додатково має відношення до застосування нуклеїновокислотної молекули для виготовлення лікарського засобу для лікування та/або профілактики неврологічного захворювання, де згадана нуклеїновокислотна молекула містить нуклеїновокислотну ПОСЛІДОВНІСТЬ № 6 або нуклеїновокислотну послідовність, яка кодує поліпептид, який містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, до складу якої входять:

а) поліпептид, який містить амінокислоти ПОСЛІДОВНОСТІ № 1;

б) поліпептид, який містить амінокислоти ПОСЛІДОВНОСТІ № 4;

с) поліпептид, який містить амінокислоти ПОСЛІДОВНОСТІ № 7;

д) поліпептид (а)-(с), який додатково містить сигнальну послідовність, за варіантом, якому віддається перевага, амінокислоти ПОСЛІДОВНОСТІ № 5;

е) мутеїн за будь-яким із пунктів від (а) до (d), де амінокислотна послідовність має щонайменше 40%, або 50%, або 60%, або 70%, або 80%, або 90% ідентичність із щонайменше однією з послідовностей від (а) до (с);

ф) мутеїн за будь-яким із пунктів від (а) до (d), який кодується послідовністю ДНК, яка гібридується з комплексом нативної послідовності ДНК, яка кодує будь-який продукт пунктів від (а) до (с) за умов підвищеної жорсткості;

г) мутеїн за будь-яким із пунктів від (а) до (d), де будь-які зміни амінокислотної послідовності є

консервативними амінокислотними замінами амінокислотних послідовностей від (а) до (с);

h) сіль або ізоформа, гібридний білок, функціональна похідна або активна фракція за будь-яким із пунктів від (а) до (d).

Нуклеїнова кислота може, наприклад, вводитись як "оголена" нуклеїновокислотна молекула, наприклад, внутрішньом'язовим шляхом.

Вона може додатково містити векторні послідовності, наприклад, послідовність вірусного геному, придатну для експресії гена, який кодується нуклеїновокислотою молекулою у людському організмі, за варіантом, якому віддається перевага, у відповідних клітинах або тканинах.

Таким чином, за варіантом здійснення, якому віддається перевага, нуклеїновокислотна молекула додатково містить послідовність експресійного вектора. Послідовності експресійних векторів є добре відомими у цій галузі, вони містять додаткові елементи, які призначені для експресії гена, який становить інтерес. Вони можуть містити регуляторну послідовність, наприклад, промоторні і енхансерні послідовності, послідовності селекційних маркерів, сайти ініціації розмноження тощо. Таким чином, для лікування та/або профілактики захворювання застосовують генотерапевтичний підхід. Вигодою у цьому разі є те, що експресія SDF-1 буде відбуватись *in situ*.

За варіантом здійснення цього винаходу, якому віддається перевага, експресійним вектором є вектор на основі лентивірусного геному. Було показано, що вектори на основі лентивірусного геному є дуже ефективними відносно перенесення генів, зокрема, у межах ЦНС. За цим винаходом можуть застосовуватись також інші добре вивчені вектори на основі вірусних геномів, наприклад, вектори на основі аденовірусного геному.

Вектор спрямованої дії може застосовуватись для стимулювання проходження SDF-1 через гематоенцефалічний бар'єр. Такі вектори можуть спрямовуватись, наприклад, на рецептор трансферину або інші ендотеліальні транспортні механізми.

За варіантом здійснення цього винаходу, якому віддається перевага, експресійний вектор може вводитись внутрішньом'язовим шляхом.

Цим винаходом передбачається також застосування вектора для спричинення та/або стимулювання ендогенного продукування SDF-1 у клітині, яка, за нормальних обставин, залишається "мовчазною" щодо експресії SDF-1, або яка експресує кількості SDF-1, які не є достатніми. Згаданий вектор може містити регуляторні послідовності, які функціонують у клітинах, бажаних для експресії SDF-1. Такі регуляторні послідовності можуть бути, наприклад, промоторами або енхансерами. Регуляторна послідовність може, таким чином, вводитись до відповідного локусу геному шляхом гомологічної рекомбінації, завдяки чому забезпечується функціональний зв'язок регуляторної послідовності з геном, експресію якого необхідно спричинити або стимулювати. Цю методику, як правило, називають "активацією ендогенних генів" (EGA), і її опис наведено, наприклад, у WO 91/09955.

Цей винахід додатково має відношення до застосування клітини, яка зазнала генетичного модифікування, для продукування SDF-1 при виготовленні лікарського засобу для лікування та/або профілактики неврологічних захворювань.

Цей винахід додатково має відношення до клітини, яка зазнала генетичного модифікування, для продукування SDF-1 для виготовлення лікарського засобу для лікування та/або профілактики неврологічних захворювань. Таким чином, клітинно-терапевтичний підхід може застосовуватись для доставки лікарського засобу до відповідних частин людського тіла.

Цей винахід додатково має відношення до фармацевтичних композицій, зокрема, придатних для профілактики та/або лікування неврологічних захворювань, які містять терапевтично ефективну кількість SDF-1 і терапевтично ефективну кількість інтерферону та/або остеопонтину та/або клатерину і факультативно додаткову терапевтично ефективну кількість імунодепресанту.

Визначенням "фармацевтично прийнятний" передбачається будь-який носій, який не шкодить ефективності біологічної активності активного інгредієнту і який не є токсичним для хазяїна, якому його вводять, або такий, що може підвищити активність. Наприклад, для парентерального введення активному(-им) білку(-ам) може надаватись дозована лікарська форма для введення у таких носіях, як, наприклад, фізіологічний розчин, розчин декстрази, сироватковий альбумін і розчин Рінгера-Локка.

Активні інгредієнти фармацевтичної композиції за цим винаходом можуть вводитись індивіду різноманітними шляхами. Шляхи введення включають внутрішньошкірний, черезшкірний (наприклад, у лікарських формах пролонгованої дії), внутрішньом'язовий, внутрішньоочеревинний, внутрішньовенний, підшкірний, пероральний, епідуральний, місцевий, підоболонковий, ректальний та інтраназальний шляхи. Може застосовуватись будь-який інший терапевтично ефективний шлях введення, наприклад, абсорбція через епітеліальні або ендотеліальні тканини або генотерапевтичний шлях, коли хворому вводять (наприклад, за допомогою вектора) молекулу ДНК, яка кодує активний агент, завдяки чому активний агент експресується і секритується *in vivo*.

На додаток до цього, білок(-ки) за цим винаходом може(-жуть) вводитись разом з іншими компонентами біологічно активних агентів, наприклад, фармацевтично прийнятних поверхнево-активних речовин, наповнювачів, носіїв, розріджувачів і розчинників.

Для парентерального (наприклад, внутрішньовенного, підшкірного, внутрішньом'язового) введення, активному(-им) білку(-ам) може надаватись форма розчину, суспензії, емульсії або ліофілізованого порошку у поєднанні з фармацевтично прийнятним парентеральним розчинником (наприклад, водою, фізіологічним розчином, розчином декстрази) і домішками, які підтримують ізотонічність (наприклад, маніт) або хімічну стійкість (наприклад, консерванти і буфери). Лікарську форму

стерилізують із застосуванням традиційно застосовуваних методів.

Біодоступність активного(-них) білка(-ів) за цим винаходом також може поліпшуватись із застосуванням процедур кон'югування з подовженням періоду напіввиведення молекули з людського тіла, наприклад, шляхом зв'язування молекули з поліетиленгліколем (PEG), як описано у заявці WO 92/13095.

Терапевтично ефективні кількості активного(-их) білка(-ів) будуть залежати від багатьох змінних, у тому числі типу білка, спорідненості білка, будь-якої кінцевої цитотоксичної активності, яка демонструється антагоністами, шляху введення, клінічного стану хворого (у тому числі бажаності підтримання нетоксичного рівня активності ендогенного SDF-1).

"Терапевтично ефективною кількістю" є кількість, у разі введення якої SDF-1 сприятливо впливає на неврологічне захворювання. Дози, які вводяться (як одно-, так і багаторазові) пацієнту, будуть різнитись у залежності від цілого ряду факторів, у тому числі фармакокінетичних властивостей SDF-1, шляху введення, стану хворого та його характеристик (стать, вік, маса тіла, стан здоров'я, розміри), рівня тяжкості симптомів, одночасно здійснюваних лікарських заходів, частоти лікування і бажаного ефекту.

Як згадувалось вище, за варіантом здійснення, якому віддається перевага, SDF-1 може застосовуватись у кількості приблизно від 0,001 мг/кг до 1 мг/кг маси тіла або приблизно від 0,01 мг/кг до 10 мг/кг маси тіла чи приблизно 9 мг/кг, 8 мг/кг, 7 мг/кг, 6 мг/кг, 5 мг/кг, 4 мг/кг, 3 мг/кг, 2 мг/кг або 1 мг/кг маси тіла чи приблизно від 0,1 мг/кг до 1 мг/кг маси тіла.

Шляхом введення, якому віддається перевага за цим винаходом, є підшкірний шлях введення. Додатковим шляхом введення, якому віддається перевага за цим винаходом, є внутрішньом'язовий шлях введення.

За додатковими варіантами здійснення, яким віддається перевага, SDF-1 вводять щоденно або через день.

Добові дози, як правило, вводять невеликими дозами, які повторюються через невеликі інтервали часу або у вигляді лікарської форми пролонгованої дії, яка є ефективною для одержання бажаних результатів. Друге або подальші введення можуть здійснюватись у дозі, яка є такою самою, меншою або більшою за початкову або попередню дозу, яка була введена індивіду.

За цим винаходом, SDF-1 може вводитись із профілактичною або терапевтичною метою пацієнту перед, одночасно або після проведення лікування за іншими схемами (наприклад, схема багаторазового приймання лікарського засобу) або із застосуванням інших лікарських речовин у терапевтично ефективній кількості, зокрема, з інтерфероном. Активні агенти, які вводяться одночасно з іншими терапевтичними агентами, можуть вводитись у тих самих або інших композиціях.

Цей винахід додатково має відношення до способу лікування неврологічного захворювання, який включає введення хворому, який цього пот-

ребує, ефективної кількості SDF-1 або агоніста активності SDF-1, факультативно разом із фармацевтично прийнятним носієм.

Цей винахід включає також спосіб лікування неврологічного захворювання, який включає введення хворому, який цього потребує, ефективної кількості SDF-1 або агоніста активності SDF-1, та інтерферону, факультативно разом із фармацевтично прийнятним носієм.

Цей винахід включає також спосіб лікування неврологічного захворювання, який включає введення хворому, який цього потребує, ефективної кількості SDF-1 або агоніста активності SDF-1, та остеопонтину, факультативно разом із фармацевтично прийнятним носієм.

Цей винахід включає також спосіб лікування неврологічного захворювання, який включає введення хворому, який цього потребує, ефективної кількості SDF-1 або агоніста активності SDF-1, та кластерину, факультативно разом із фармацевтично прийнятним носієм.

Усі посилання, наведені у цьому описі, у тому числі журнальні статті або реферати, опубліковані або неопубліковані заявки на патенти США або на закордонні патенти, опубліковані патенти США або закордонні патенти чи будь-які інші посилання, включені у повному обсязі до цього опису як посилання, у тому числі усі дані, таблиці, фігури і текстовий матеріал, наведені у згаданих посиланнях. На додаток до цього, вміст посилань, що наводиться у згаданих посиланнях, також у повному обсязі включено до цього опису шляхом посилання.

Посилання на стадії відомих способів, стадії традиційних способів, відомі способи або традиційні способи у жодному разі не є визнанням того, що будь-який аспект, опис або варіант здійснення цього винаходу розкривається, описується або пропонується відомим рівнем техніки.

Наведений вище опис конкретних варіантів здійснення розкриває загальну природу цього винаходу з достатньою повнотою для того, щоб інші могли, застосовуючи знання у межах цієї галузі (у тому числі вміст посилань, які наводяться у цьому описі), легко модифікувати та/або пристосувати для різних варіантів застосування такі конкретні варіанти здійснення без зайвого експериментування, без відходження від загальної концепції цього винаходу. Таким чином, вважається, що такі варіанти пристосування і модифікування знаходяться у межах діапазону еквівалентів розкритих варіантів здійснення, виходячи з наведених у цьому описі вказівок та загальних принципів. Слід розуміти також, що фразеологія або термінологія, вжита у цьому описі, призначена для опису, а не для обмеження, завдяки чому термінологія або фразеологія цього опису повинна тлумачитись досвідченим фахівцем з урахуванням настанов та загальних принципів, наведених у цьому описі, у поєднанні із знаннями пересічного фахівця у цій галузі.

Після завершення опису винаходу, його буде легше зрозуміти у разі посилання на наведені нижче приклади, які наводяться з ілюстративною

метою і не призначені для обмеження цього винаходу.

Приклади

Людські рекомбінантні хемокіни SDF-1 α та варіант SDF-1 α одержали у лабораторії. Кодувальні послідовності (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 1 для SDF-1 α і ПОСЛІДОВНІСТЬ № 4 для варіанта SDF-1 α) клонували до сайту NdeI/BamHI вектора pET20b+ і експресували у клітинах E.coli.

ПРИКЛАД 1: Активність SDF-1 та варіанта SDF-1 α у змішаних кортикальних культурах, які були оброблені LPS

Вступ

Незважаючи на те, що ЦНС вважається імунологічно привілейованою ділянкою, вона може демонструвати значні запальні реакції, які можуть відігравати роль у ряді неврологічних захворювань. Мікроглія, як видається, відіграє особливо важливу роль у ініціюванні та підтриманні запалення ЦНС. Ці клітини у нормальній ЦНС знаходяться у неактивній формі, однак набувають макрофагоподібних властивостей (у тому числі активний фагоцитоз, активація білків, необхідних для презентації антигену і продукування передзапальних цитокінів) після стимулювання інфекціями або Т-клітинами.

Це запальне оточення *in vitro* та *in vivo* може імітуватись ліпополісахаридом (LPS), складовою зовнішніх мембран грамнегативних бактерій. LPS являє собою приклад внутрішнього розпізнавання з найкраще вивченими характеристиками, наслідком якого є інтенсивна запальна реакція з боку фагоцитів через рецептор Toll4. LPS широко застосовується у галузі активації мікроглії у чистих, комбінованих або змішаних культурах. Низькі рівні LPS спричиняють виділення цитокінів без спричинення загибелі клітин; більш високі дози можуть спричинювати дегенерацію олігодендроцитів або нервових клітин *in vitro* (Ленард (Lehnardt) та інші, 2002; Садір (Sadir) та інші, 2001) та *in vivo* (Ленард (Lehnardt) та інші, 2003; Садір (Sadir) та інші, 2001).

Матеріали і методи

Одержання первинних змішаних кортикальних культур

Культитивування ембріональних клітин здійснювали, як описано (Любецькі (Lubetzki) та інші, 1993) із застосуванням мозкової тканини від ембріонів, виділених з мишей лінії NMRI через 16 днів після парування. Півкулі великого мозку відокремлювали від головного мозку ембріонів, трипсинізували, і суспензію поодиноких клітин висівали (5×10^4 клітин) у 50 мкл мієлінізаційного середовища на лунку на сенсibiliзовані полі-L-лізином 96-лункові планшети BioCoat® (356516, компанія Becton Dickinson). Згадане мієлінізаційне середовище являє собою живильне середовище Боттенштейна-Сато (Боттенштейн (Bottenstein) та Сато (Sato), 1979; Садір (Sadir) та інші, 2001), доповнене 1% розчином FCS (фетальна теляча сироватка), 1% розчином пеніциліну-стрептоміцину (компанія Seromed) та рекомбінантним тромбоцитарним фактором росту AA (PDGF-AA, компанія R&D Systems) (10 нг/мл).

Обробка первинних змішаних кортикальних культур LPS: Методика проведення аналізу

Для ініціювання виділення цитокінів із первинних змішаних кортикальних культур, стимульованих LPS, згадані культури вирощували при температурі 37°C з 10% CO₂ впродовж 14 днів із подальшим стимулюванням впродовж 48 год зростаючими концентраціями LPS (0 нг/мл, 0,5 нг/мл, 1 нг/мл, 2,5 нг/мл, 5 нг/мл).

Після 48 год стимулювання LPS збирали 80 мкл супернатанту і заморожували при температурі -80°C до проведення аналізу:

- виділення цитокінів (TNF- α та IL-6) за допомогою набору CBA mouse inflammation kit (компанія BD Biosciences 552364) SDF-1;

- SDF-1 α із застосуванням сендвіч-ELISA (твердофазний імуоферментний аналіз), який було розроблено у лабораторії і докладний опис якого наведено нижче;

- життєздатності клітин із застосуванням аналізу MTS (компанія Promega G5421; нерадіоактивний аналіз проліферації клітин, із застосуванням якого визначають активність мітохондрій за утворенням нерозчинної солі формазану, що, як було показано, корелює з густиною клітин);

ELISA SDF-1 α

Сендвіч-ELISA для кількісного визначення рівнів SDF-1 α у змішаних кортикальних культурах розробили у лабораторії. Для сенсibiliзації застосовували моноклональний антимишачий SDF-1 (1:500, компанія R&D Systems Inc, Minneapolis, США); як друге антитіло застосовували біотинілований поліклональний антимишачий IgG (100 мкл на лунку) (1:400, компанія R&D Systems Inc, Minneapolis, США), кон'юговану з екстравидином пероксидазу з хрому (100 мкл на лунку) (1:5000, компанія Sigma, St. Louis, штат Міссурі, США). Для одержання стандартної кривої застосовували рекомбінантний мишачий SDF-1 (від 2000 нг/мл до 10 нг/мл, компанія R&D Systems Inc, Minneapolis, США). Для візуалізації застосовували субстратами реактив (100 мкл на лунку), який являє собою суміш стабілізованого пероксиду водню і тетраметилбензидину (компанія R&D Systems Inc, Minneapolis, США). Оптичну густину визначали за допомогою флуориметричного планідет-рідера (Labsystems Multiskan EX) при 450 нм.

Вплив SDF-1 α і варіанта SDF-1 α на експресію цитокінів у LPS-стимульованих культурах

Для випробування впливу SDF-1 α та варіанта SDF-1 α (який визначається ПОСЛІДОВНІСТЮ № 4) на LPS-стимульовані культури, клітини вирощували впродовж двох тижнів. На 14 день клітини піддавали попередньому інкубуванню із зростаючими концентраціями (0,001 нг/мл, 0,1 нг/мл та 10 нг/мл) відповідних білків у 25 мкл середовища впродовж 3 год при температурі 37°C з 10% CO₂. Після цього до клітин додавали LPS із концентрацією 5 нг/мл у 25 мкл середовища для одержання кінцевого об'єму 100 мкл і інкубували впродовж 48 год. Супернатанти збирали на 16 день, і рівні TNF- α та IL-6 (головні цитокіни, які виділяються активованою мікроглією) визначали із застосуванням специфічних ELISA, закуплених від компанії R&D

Systems (DuoSet mouse TNF- α ELISA DY410, mouse IL-6 ELISA DY406).

Застосовували дві контрольні молекули, дексаметазон і мишачий IL-10, які, як було показано, пригнічують виділення цитокінів з активованої мікроглії.

Аналіз даних

Загальний аналіз даних здійснювали із застосуванням однофакторного дисперсійного аналізу. Додатково застосовували критерій Даннета і дані порівнювали з "необробленими клітинами". Було встановлено рівень значущості a: p<0,001; b: або **: p<0,01; c: або *: p<0,05; d: p<0,1. Результати були виражені як середнє \pm середня квадратична помилка середнього (s.e.m.).

Результати

Методика проведення аналізу

Секрецію TNF- α , IL-6 спричинювали за допомогою LPS у дозах 2,5 нг/мл та 5 нг/мл; обидві дози у комплексних культурах не були токсичними. На додаток до цього, різні концентрації LPS (0 нг/мл, 0,5 нг/мл, 1 нг/мл, 2,5 нг/мл, 5 нг/мл) не впливали на рівні ендогенного SDF-1 α (результати не показані).

SDF-1 α та варіант SDF-1 α

Результати показали, що IL-10 у дозі 10 нг/мл та дексаметазон (25 пМ) пригнічують TNF- α та IL-6, порівняно з необробленими клітинами. Як SDF-1 α , так і варіант SDF-1 α значно зменшували рівні секреції TNF- α та IL-6 у змішаних кортикальних культурах після стимулювання LPS, порівняно з необробленими клітинами, і з найкращою концентрацією 10 нг/мл (Fig. 1A та Fig. 1B).

Висновки

Змішані кортикальні культури являють собою складну систему, яка містить нейроепітеліальні клітини декількох типів, у тому числі астроцити, мікроглію, нейрони та олігодендроцити. Мутант SDF-1 α , який не зв'язує GAG, варіант SDF-1 α зменшували рівні TNF- α та IL-6 чином, подібним до SDF-1 α , що вказує на те, що мутація GAG не впливає на зв'язування SDF-1 α із своїм рецептором CXCR4.

Пригнічення цитокінів, яке спостерігається у разі застосування SDF-1 α та варіанта SDF-1 α у змішаних кортикальних культурах, необроблених LPS, може обумовлюватись безпосередньою дією SDF-1 на мікроглію або опосередкованою дією на астроцити або нейрони, які експресують рецептор CXCR4.

Розсіяний склероз, відповідно до клінічного перебігу, можна розподіляти на декілька категорій з виділенням хворих на розсіяний склероз з різними картинами активності хвороби. Хворі лише з рідкими рецидивами з подальшим повним одужанням від хвороби вважаються такими, що мають доброякісний розсіяний склероз. Рецидивно-ремітуючий розсіяний склероз (RRMS), найпоширеніша форма розсіяного склерозу, спостерігається у 85-90% хворих на розсіяний склероз і характеризується періодичними рецидивами з подальшими стадіями одужання із залишковими розладами. Напади, ймовірно, спричинюються міграцією мієлінреактивних Т-клітин до ЦНС, із спричиненням гострого запалення. З часом трива-

лість періодів одужання від рецидивів скорочується, і зростає вихідний рівень інвалідності унаслідок неврологічних розладів. Зрештою, приблизно у 40% хворих на RRMS напади більше не повторюються, але у них розвивається прогресуючий нейродегенеративний вторинний розлад, пов'язаний із хронічним запаленням ЦНС, відомий як вторинний прогресуючий розсіяний склероз (SPMS) (Конфавро (Confavreux) та інші, 2000). Еволюція до цієї вторинної прогресуючої форми захворювання пов'язується із значно меншою кількістю активних уражень і зменшенням обсягу паренхіматозної тканини головного мозку. У той час як попередній RRMS є чутливим до імуносупресії, реакція SPMS на імунотерапію знижується і, у пізніших формах, може навіть зникнути. Таким чином, можна припустити, що RRMS та SPMS являють собою сукупність, а не два захворювання, де гострі запальні явища на ранній стадії ведуть до вторинного спричинення нейродегенеративного процесу.

Первинна прогресуюча форма розсіяного склерозу (PPMS) із самого початку характеризується відсутністю гострих нападів. Натомість, вона демонструє поступове клінічне погіршення. У клінічному відношенні, ця форма захворювання пов'язується з відсутністю реакції на імунотерапію будь-якої форми. Патобіологія первинного прогресуючого розсіяного склерозу є слабо вивченою, однак посмертні дослідження дозволяють висунути припущення про переважання у цих хворих нейродегенерації над запаленням. Цікаво те, що пошкодження сірої речовини є показником еволюції первинного прогресуючого розсіяного склерозу, оскільки являє собою найбільший параклінічний прогностичний фактор подальшого погіршення інвалідності (Роваріс (Rovaris), 2006). Активна мікроглія у сірій речовині може додавати свій внесок до прискореної загибелі нервових клітин і розвитку атрофії головного мозку. Таким чином, SDF-1α і варіант SDF-1 можуть мати потенціал щодо лікування первинного прогресуючого розсіяного склерозу завдяки їхньому потенціалу щодо регуляції активації мікроглії і виживаності нервових клітин. Деякі патофізіологічні механізми, наслідком яких є загибель нервових клітин, можуть взаємно перекриватись у разі первинної і вторинної форми розсіяного склерозу.

ПРИКЛАД 2: Вплив варіанта SDF-1α на рекрутинг лейкоцитів у *in vivo* моделі рекрутингу клітин очереви

Головна роль хемокінів полягає у контролюванні міграції специфічних популяцій лейкоцитів під час запальних реакцій та імунологічного нагляду. Хемокіни виявляють свої біологічні ефекти шляхом зв'язування із сімома трансмембранними рецепторами, сполученими з G-білками. Вони можуть також зв'язувати як розчинні глікозаміноглікани (GAG), так і GAG на поверхні клітин, які посилюють місцеві концентрації хемокінів, стимулюють їх олігомеризацію та полегшують їх презентацію рецепторам. Нещодавно було продемонстровано, що взаємодія хемокінів з GAG є необхідною для їх хемотактичного функціонування *in vivo*.

Матеріали і методи

Мишам-самцям лінії Balb/C (компанія Janvier, Франція) віком 8-12 тижнів внутрішньоочеревинним шляхом (*i.p.*) вводили 200 мкл розчину NaCl (0,9%, без LPS) або 4 мкг хемокіну (SDF-1α дикого типу або варіант SDF-1α (ПОСЛІДОВНІСТЬ № 4), розведений у 200 мкл розчину NaCl (0,9%, без LPS). Після 4 подальших ін'єкцій SDF-1α дикого типу або мутанта SDF-1α, мишей умертвляли шляхом удушення CO₂, очеревинну порожнину промивали 3×5 мл PBS (забуферений фосфатом фізіологічний розчин) при температурі танення льоду, і для кожної окремої миші збирали загальний об'єм промивної рідини. Загальну кількість зібраних клітин підраховували за допомогою гематоцитометра (компанія Neubauer, Німеччина).

Результати

SDF-1α, який вводили внутрішньоочеревинним шляхом, рекрутує лейкоцити. Варіант SDF-1α лейкоцитів не рекрутує, що вказує на те, що *in vivo* GAG-зв'язувальна активність варіантом SDF-1α втрачається унаслідок мутації (дивись Фіг. 2).

Висновки

Варіант SDF-1α (мутант SDF-1, дефектний щодо зв'язування GAG) не демонструє активності рекрутування лейкоцитів *in vivo*.

ПРИКЛАД 3: Кількісне визначення SDF-1α у спинному мозку з експериментальним автоімунним енцефаломієлітом (хронічним)

Вступ

Кількісне визначення експресії SDF-1α здійснювали на спинному мозку мишей, уражених EAE (експериментальний автоімунний енцефаломієліт) у хронічній фазі, індукованим MOG пептидом. Згадана модель експериментального автоімунного енцефаломієліту (EAE) являє собою мишачу модель хронічної демієлінізації і є розробленою тваринною моделлю розсіяного склерозу (MS). Спосіб спричинення EAE у мишей, який було застосовано, являє собою адаптацію методики, опублікованої Сарбахер та іншими (Сарбахер (Sahrbacher) та інші, 1998).

Матеріали і методи

Відбирання зразків спинного мозку

Спинний мозок видаляють у мишей, уражених EAE, через 4 тижні після початку захворювання, тобто присутності паралічу хвоста, як клінічної ознаки захворювання. Перфузію мишей здійснювали холодним PBS, і спинний мозок вміщували до потрібного детергентного буфера (50 мМ трис-буфер, pH 8,0, 150 мМ розчин NaCl, 0,02% розчин NaN₃, 0,1% розчин SDS (додецилсульфат натрію), 1% розчин нонідет P-40, 0,5% розчин дезоксихолату натрію), який містив суміш інгібіторів протеаз (компанія Roche Molecular Biochemicals, 1836170, 1 таблетка на 10 мл буфера). Застосовували 100 мкл буфера на мг одержаної тканини. Зразки тканини зберігали у пластикових еппендорфівських пробірках при температурі -20°C перед гомогенізацією і подальшим аналізом.

Аналіз вмісту SDF-1α у спинному мозку

Спинний мозок відтаювали і гомогенізували у потрібному детергентному буфері за допомогою політрону. Кількісні рівні білка у зразках визначали за допомогою аналітичного набору BCA для визначення вмісту білка (компанія Pierce Biotechnol-

ogy, Rockford IL61105, США) перед визначенням вмісту SDF-1 α із застосуванням ELISA, опис якого було подано у наведеному вище розділі "Матеріали і методи" Прикладу 1.

Результати

На Фіг. 3 показана позитивна регуляція SDF-1 α у тканинах спинного мозку тварин з EAE у хронічній фазі.

Висновки

Позитивна регуляція білка SDF-1 α у екстрактах спинного мозку з EAE у хронічних MOG EAE фазах, дозволяє припустити роль SDF-1 α у запаленні нервових волокон, окрім рекрутингу запальних клітин.

ПРИКЛАД 4: Захисний ефект SDF-1 α у разі невропатії, індукованої роздавлюванням сідничного нерва

Вступ

Це дослідження здійснили з метою визначення регенерації та повторної мієлінізації нервів у мишей, які одержували SDF-1 α у різних дозах. Результатом позитивного впливу SDF-1 α на виживаність і регенерацію нервових клітин та аксонів (сенсорних і рухових нейронів) або мієлінізацію чи макрофагальне запалення, може бути відновлення рухової функції. Регенерація може визначатись за відновленням сенсорно-рухових функцій, яке може визначатись шляхом реєстрації електрофізіологічних показників.

Матеріали і методи

Тварини

Застосували тридцять мишей-самиць лінії C57b1/6 RJ віком 8 тижнів (компанія Elevage Janvier, Le Genest-St-Isle, Франція). Тварини були розподілені на 6 груп (n=6):

а) роздавлювання нерва/носії (фізіологічний розчин/0,02% розчин BSA (бичачий сироватковий альбумін));

б) роздавлювання нерва/SDF-1 α (3 мкг/кг);

с) роздавлювання нерва/SDF-1 α (10 мкг/кг);

д) роздавлювання нерва/SDF-1 α (30 мкг/кг);

е) роздавлювання нерва/SDF-1 α (100 мкг/кг);

ф) роздавлювання нерва/1b-6 (30 мкг/кг).

Тварин утримували групою (6 тварин на клітку) у приміщенні з регульованою температурою (21-22°C) і оберненим циклом чергування світла і темряви (12 год/12 год) з кормом і водою, доступними ad libitum. Усі експерименти здійснювали за методичними рекомендаціями установи.

Ураження сідничного нерва

Тварин анестезували вдиханням 3% Isofluran® (компанія Baxter). Правий сідничний нерв хірургічним шляхом оголювали у середній частині стегна і роздавлювали на відстані 5 мм у проксимальному напрямку відносно розгалуження сідничного нерва на три частини. Нерв роздавлювали двічі впродовж 30 с за допомогою кровоспинного затискача (ширина 1,5 мм; компанія Koenig; Strasbourg; Франція) з 90-градусним обертанням на кожному місці роздавлювання.

Планування експериментів і фармакологічне лікування

Електроміографічне (EMG) дослідження здійснювали один раз перед хірургічним втручанням і кожного тижня впродовж 3 тижнів після операції.

День хірургічного втручання з роздавлювання нерва вважали 0 dpl (dpl=день після ушкодження). Впродовж 4 днів після роздавлювання жодних досліджень не проводили.

3 дня пошкодження нерва до кінця дослідження SDF-1 α , IL-6 або розчинник вводили щоденно підшкірним (s.c.) шляхом 5 разів на тиждень.

Реєстрація електрофізіологічних показників

Реєстрацію електрофізіологічних показників здійснювали за допомогою електроміографа (EMG) Neuromatic 2000M (компанія Dantes, Les Ulis, Франція). Мишей анестезували вдиханням 3% Isofluran® (компанія Baxter). Нормальну температуру тіла підтримували за допомогою операційного стола з підігрівом (компанія Minerve, Esternay, Франція).

Складний потенціал дії м'язів (СМАР) визначали на gastrocnemius (литковому) м'язі після одноразового подразнення сідничного нерва впродовж 0,2 мс імпульсом із надвисокою силою току (12,8 мА). Амплітуду (мВ) та латентність (мс) потенціалу дії визначали на прооперованій лапці. Показники реєстрували також на протилежній (з нероздавленим нервом) лапці тварин, яким вводили розчинник (вихідний рівень). Амплітуда вказує кількість активних рухових одиниць, у той час як латентність на дистальній ділянці опосередковано відображає провідність і швидкість передавання збудження з нерва на м'яз, величина якої частково залежить від ступеня мієлінізації.

Аналіз даних

Загальний аналіз даних здійснювали із застосуванням однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA). Після цього застосовували критерій Даннета і дані порівнювали з контрольними тваринами, яким вводили розчинник. Було встановлено рівень значущості а: $p < 0,001$; b або **: $p < 0,01$; c або *: $p < 0,05$; d: $p < 0,1$. Результати були виражені як середнє \pm середня квадратична помилка середнього (s.e.m.).

Електрофізіологічні показники

Амплітуда складного потенціалу дії м'язів (Фіг. 4.A):

Значущої зміни амплітуди СМАР на протилежних лапках (з нероздавленими нервами) тварин, яким вводили розчинник (вихідний рівень), впродовж дослідження не спостерігалось. У протилежність до цього, роздавлювання сідничного нерва спричинювало різке зменшення амплітуди СМАР із приблизно 80% зменшенням у групі, якій вводили розчинник, на dpl7 та dpl15, у разі порівняння з відповідними вихідними рівнями. У разі введення мишам SDF-1 α у дозі 30 мкг/кг або IL-6 у дозі 30 мкг/кг, вони демонстрували зростання (приблизно у 1,5 рази) амплітуди СМАР, порівняно з рівнями у необроблених мишей, і цей ефект був значущим на 15 dpl та 22 dpl.

Латентність складного потенціалу дії м'язів (Фіг. 4.B):

Погіршення латентності СМАР на протилежних (нероздавлених) лапках тварин, яким вводили розчинник, впродовж проведення дослідження не спостерігалось. Навпаки, м'язи на роздавленому боці демонстрували більшу латентність СМАР порівняно з вихідним рівнем. У мишей, яким вво-

дили SDF-1 α , значення латентності CMAP було значно зменшеним порівняно зі значенням латентності CMAP у мишей, яким вводили розчинник. На 7 день цей ефект міг спостерігатись після введення 30 мкг/кг та 100 мкг/кг SDF-1 α , але не 30 мкг/кг IL-6. На 15 dpl і 22 dpl значний ефект все ще спостерігався при дозі 30 мкг/кг та 100 мкг/кг (але не при дозі 3 мкг/кг або 10 мкг/кг) SDF-1 α . SDF-1 α (30 мкг/кг) є більш активним, ніж IL-6 (30 мкг/кг).

Висновки

Модель із роздавленим нервом є вкрай вражаючою моделлю травматичного пошкодження нерва та периферичної невропатії. Негайно після роздавлення нерва більшість волокон, які мають великий діаметр, гинуть унаслідок механічного пошкодження, наслідком чого є велике зменшення амплітуди CMAP. Латентність CMAP негайно не уражується, але демонструє збільшення на 15 день унаслідок додаткової дегенерації волокон невеликого діаметра, яка спричинюється вторинною, опосередкованою імунною системою дегенерацією (макрофаги, гранулоцити). Тривалість CMAP зростає на 7 dpl і досягає максимального рівня на 15 dpl.

SDF-1 α відновлює функцію після роздавлення периферичного нерва (латентність CMAP). SDF-1 α також демонстрував захисний ефект на моделі роздавленого нерва у мишей для усіх параметрів, що визначались. Підсумовуючи, ефективність SDF-1 α була порівнянною з ефективністю еталонної молекули, яка застосовувалась у цьому дослідженні, IL-6.

ПРИКЛАД 5: Захисний ефект варіанта SDF-1 α у разі невропатії, спричиненої роздавленням сідничного нерва

Модель із роздавленим сідничним нервом, опис якої подано у наведеному вище Прикладі 4, застосовували для випробування варіанта SDF-1 α , який визначається ПОСЛІДОВНІСТЮ № 4; миші були розподілені на 2 описані нижче групи (n=6):

а) прооперовані (роздавлений нерв)/розчинник (фізіологічний розчин/0,02% розчин BSA (бичачий сироватковий альбумін));

б) роздавлений нерв/варіант SDF-1 α у дозі 30 мкг/кг (підшкірно). Параметри, зареєстровані на протилежній лапці тварин, яким вводили розчинник, приймалися як вихідні значення.

Варіант SDF-1 α , застосований у цьому прикладі, який кодується ПОСЛІДОВНІСТЮ № 4, експресувався з додатковим N-кінцевим залишком метіоніну. Реєструвалась також тривалість CMAP (час, необхідний для деполяризації та реполяризації).

Результати

Електрофізіологічні показники

Амплітуда складного потенціалу дії м'язів (Фіг. 5.A):

Значне зростання амплітуди CMAP було продемонстровано на 22 dpl, коли мишам вводили варіант SDF-1 α .

Латентність складного потенціалу дії м'язів (Фіг. 5.B):

У мишей, яким вводили варіант SDF-1 α , значення латентності CMAP було значно зменшеним, у порівнянні зі значенням латентності CMAP у ми-

шей, яким вводили розчинник, зокрема, на 7 dpl. Позитивний ефект все ще спостерігали на 22 dpl.

Тривалість складного потенціалу дії м'язів (Фіг. 5.C):

У мишей, яким вводили варіант SDF-1 α , значення тривалості CMAP було зменшеним, у порівнянні зі значенням тривалості CMAP у мишей, яким вводили розчинник, на 7 dpl та 22 dpl.

Висновки

Було показано, що варіант SDF-1 α відновлює функцію після роздавлення периферичного нерва (латентність CMAP). SDF-1 α також демонстрував захисний ефект на моделі роздавленого нерва у мишей для усіх параметрів, що визначались.

ПРИКЛАД 6: Захисний ефект Met-SDF-1 α у разі невропатії, спричиненої роздавленням сідничного нерва

Модель із роздавленим сідничним нервом, опис якої подано у наведеному вище Прикладі 4, застосовували для випробування варіанта Met-SDF-1 α , який визначається ПОСЛІДОВНІСТЮ № 7; миші були розподілені на 2 представлені нижче групи (n=6):

а) прооперовані (роздавлений нерв)/розчинник (фізіологічний розчин/0,02% розчин BSA (бичачий сироватковий альбумін));

б) роздавлений нерв/варіант Met-SDF-1 α у дозі 100 мкг/кг, 30 мкг/кг і 10 мкг/кг (підшкірно).

Параметри, зареєстровані на протилежній лапці тварин, яким вводили розчинник, приймалися як вихідні значення.

Реєструвалась також тривалість CMAP (час, необхідний для деполяризації та реполяризації).

Результати

Електрофізіологічні показники

Латентність складного потенціалу дії м'язів (Фіг. 6):

У мишей, яким вводили Met-SDF-1 α , значення латентності CMAP було значно зменшеним на 7 день і 14 день після роздавлення, у порівнянні зі значенням латентності CMAP у мишей, яким вводили розчинник.

Висновки

Було показано, що Met-SDF-1 α відновлює функцію після роздавлення периферичного нерва (латентність CMAP) такою самою мірою, що і SDF-1 α .

ПРИКЛАД 7: Захисний ефект SDF-1 α у разі діабетичної невропатії

Вступ

Діабетична невропатія є найпоширенішим хронічним ускладненням діабету. У основі лежать численні механізми, які, як видається, включають декілька взаємозв'язаних відхилень від норми обміну речовин, що є наслідком гіперглікемії та недостатності інсуліну і С-пептиду.

Найпоширенішим раннім відхиленням від норми, що свідчить про діабетичну невропатію, є асимптоматична дисфункція нервів, яка полягає у зниженні швидкості провідності нерва (Дік (Дуск) та Дік (Дуск), 1999). За цими змінами, як правило, настає втрата відчуття вібрації у стопах і втрата ахілова рефлексу. Електрофізіологічні показники часто надзвичайно точно відображають патологію, яка лежить у основі, і зміни швидкості провідності

нервів корелюють із мієлінізацією нервових волокон (дивись оглядову статтю Сіма (Sima), 1994).

Пацюк із діабетом, спричиненим стрептозотоцином (STZ), являє собою найширше досліджувану тваринну модель діабетичної невропатії. Цей розлад спричинює різке зниження нервового кровотоку (40%) і зниження швидкості провідності нервів (20%) (Камерон (Cameron) та інші, 1991), з подальшою атрофією аксонів нервових волокон (Якобсен (Jakobsen), 1976). У разі тривалого діабету спостерігається демієлінізація та дегенерація мієлінізованих волокон, а також аксоногліальне роз'єднання (Сіма (Sima) та інші, 1988).

Головна мета цього дослідження полягала у вивченні потенційного захисного ефекту SDF-1 α відносно нервових клітин та глії у разі розвитку діабетичної невропатії у пацюків, яким вводили STZ.

Матеріали і методи

Тварини

Пацюки-самці лінії Sprague Dawley віком вісім тижнів (компанія Janvier, Le Genest Saint Isle, Франція) були довільно розподілені на 6 експериментальних груп (n=10), як показано нижче.

Таблиця IV

Група (n=10)	Обробка	Шляхи введення	Період обробки (дні після введення STZ)
Контроль/Розчинник	Розчинник щоденно	підшкірно	від 11 до 40
STZ/Розчинник	Розчинник щоденно	підшкірно	від 11 до 40
STZ/SDF-1 α (10 мкг/кг)	SDF-1 α щоденно	підшкірно	від 11 до 40
STZ/SDF-1 α (30 мкг/кг)	SDF-1 α щоденно	підшкірно	від 11 до 40
STZ/SDF-1 α (100 мкг/кг)	SDF-1 α щоденно	підшкірно	від 11 до 40
STZ/IL-6 (10 мкг/кг)	IL-6 щоденно	підшкірно	від 11 до 40

Тварин утримували групою (3 тварини на клітку) у приміщенні з регульованою температурою (21-22°C) і оберненим циклом чергування світла і темряви (12 год/12 год) з кормом і водою, доступними ad libitum. Усі експерименти здійснювали за методичними рекомендаціями установи.

Спричинення діабету і фармакологічне лікування

Діабет індукували шляхом внутрішньовенного введення забуференого розчину стрептозотоцину (компанія Sigma, L'Isle d'Abeau Chesnes, Франція) у дозі 55 мг/кг. Розчин STZ одержували у 0,1 моль/л розчині цитратного буфера, pH 4,5. Контрольна група одержувала еквівалентний об'єм цитратного буфера. День введення STZ був прийнятий як D0.

На D10 після введення STZ у кожної окремої тварини визначали ступінь глікемії. Тварин із значенням нижче 260 мг/дл виключали з дослідження.

Введення SDF-1 α , IL-6 або відповідних їм розчинників здійснювали щоденно з D11 до D40.

Розчин SDF-1 α та IL-6 одержали у фізіологічному розчині (0,9% NaCl), що містив 0,02% розчин BSA.

Планування експериментів

- День -7: вихідний рівень (EMG);
- День 0: введення стрептозотоцину;
- День 7: контролювання рівня глікемії;
- День 11: початок лікування;
- День 20: тест фон Фрея;
- День 25: контролювання електроміографічних функцій;
- День 40: контролювання електроміографічних функцій та випробування на гарячій пластині при температурі 52°C;
- День 41: відбирались зразки сідничих нервів та шкірні біоптати для проведення гістоморфометричних аналізів.

Електроміографія

Реєстрацію електрофізіологічних показників здійснювали за допомогою електроміографа (компанія Keypoint, Medtronic, Boulogne-Billancourt, Франція). Пацюків анестезували шляхом внутрішньоочеревинного введення (IP) 60 мг/кг кетаміну хлорідрата (Imalgene 500®, компанія Rhone Mérieux, Lyon, Франція) та 4 мг/кг ксилазину (Rompum 2%, компанія Bayer Pharma, Kiel, Німеччина). Нормальну температуру тіла підтримували на рівні 30°C за допомогою нагрівальної лампи і контролювали за допомогою контактного термометра (Quick, компанія Bioblock Scientific, Illkirch, Франція), розміщеного на поверхні хвоста.

Складний потенціал дії м'язів (СМАР) реєстрували у литковому м'язі після стимуляції сідничого нерва. Еталонний голчастий електрод і активний голчастий електрод вводили до задньої лапки. Заземлювальний голчастий електрод вводили до нижньої частини спини пацюка. Сідничий нерв подразнювали одноразовим імпульсом тривалістю 0,2 мс із надвисокою силою току. Реєстрували швидкість рухової хвилі.

Реєстрували також швидкість провідності чутливого нерва (SNCV). Хвостові шкірні електроди розміщували таким чином: еталонний голковий електрод вводили до основи хвоста, а анодний голковий електрод розміщували на відстані 30 мм від еталонного голкового електрода у напрямку до кінця хвоста. Заземлювальний голковий електрод вводили між анодним та еталонним голковими електродами. Хвостовий нерв подразнювали серією з 20 імпульсів (тривалістю 0,2 мс) із силою току 12,8 мА. Швидкість виражали у м/с.

Морфометричний аналіз

Морфометричний аналіз проводили перед закінченням дослідження. Тварин анестезували шляхом внутрішньоочеревинного введення 60 мг/кг Imalgene 500®. 5 мм сегмент сідничого нерва вірізали для проведення гістологічних досліджень. Тканину фіксували впродовж ночі 4% роз-

чином глутаральдегіду (компанія Sigma, L'Isle d'Abeau-Chesnes, Франція) у фосфатному буферному розчині (pH 7,4) і витримували у 30% розчині цукрози при температурі +4°C до застосування. Зразок нерва фіксували у 2% розчині тетроксиду осмію (компанія Sigma) у фосфатному буферному розчині впродовж 2 год, зневоднювали у серійному розведенні спирту і заливали гістологічним середовищем Epon. Після цього залили гістологічним середовищем тканини витримували при температурі +70°C впродовж 3 днів полімеризації. Поперечні зрізи товщиною 1,5 мкм одержали за допомогою мікротома. Зрізи забарвлювали 1% розчином толудинового синього (компанія Sigma) впродовж 2 хв, зневоднювали і заливали гістологічним середовищем Eukitt.

Аналізи здійснювали на усій поверхні зрізу нерва за допомогою програми напівавтоматизованого цифрового аналізу зображень (компанія Bioscom, Франція). Після видалення усіх чужорідних об'єктів, програма повідомляла повну кількість мієлінізованих волокон. Після цього оператор вручну підраховував кількість дегенерованих волокон. Мієлінізовані волокна без аксонів, надлишкова кількість мієліну і волокна з оболонками, які мали надто велику товщину відносно діаметра своїх аксонів, вважались волокнами, що зазнають процесів дегенерації. Кількість недегенерованих волокон одержували шляхом віднімання кількості дегенерованих волокон.

Морфологічний аналіз проводили лише на волокнах, які вважались недегенерованими. Для кожного волокна, розміри аксону і мієліну повідомлялись у вигляді площі поверхні (мкм²). Ці два параметри застосовувались для обчислення відносної еквівалентної товщини мієліну (діаметр аксону/діаметр волокна) кожного волокна (тобто $[A/(A+M)]^{0.5}$, A = площа аксону, M = площа мієліну), яка вказувала відносну товщину мієлінової оболонки.

На додаток до цього, на площі шкіри задньої лапки діаметром 5-10 мм здійснювали пункційну біопсію. Зразки шкіри негайно фіксували впродовж ночі у параформальдегіді при температурі 4°C, інкубували (впродовж ночі) у 30% розчині цукрози у 0,1 М PBS для кріозахисту, заливали гістологічним середовищем OCT і заморожували при температурі -80°C до одержання зрізів за допомогою заморожувального мікротома.

Після цього у вертикальному напрямку відносно поверхні шкіри за допомогою кріостата нарізали зрізи товщиною 50 мкм. Вільноплавні зрізи інкубували впродовж 7 днів у ванні з кролячим антибілковим генним продуктом 9,5 (1:10000; компанія Ultraclean, Isle of Man, Великобританія) при температурі 4°C. Після цього зрізи піддавали обробці для встановлення імунореактивності за методом одержання авідин-біотин-пероксидазного комплексу. Стисло, зрізи інкубували впродовж 1 год із біотинілованим антикозячим антитілом (1:200), потім впродовж 30 хв у авідин-біотинілованому комплексі при кімнатній температурі. Активність пероксидази візуалізували за допомогою системи DAB. Після цього зрізи піддавали контрастному забарвленню за допомогою еозину або гематоксиліну.

Зрізи зневоднювали, просвітляли за допомогою біологічного просвітлювального агента і заливали гістологічним середовищем Eukitt. Фотографії полів зору мікроскопа робили з 20× збільшенням за допомогою цифрової камери Nikon з фокусною відстанню 12,9 мм. Експериментатор на екрані комп'ютера підраховував кількість інтраепідермальних нервів на кожному з 3 полів зору мікроскопа площею 0,22 мкм² (544 мкм×408 мкм).

Аналіз даних

Загальний аналіз даних здійснювали із застосуванням однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) або дисперсійного аналізу повторних вимірів. У разі, коли дисперсійний аналіз показував значну різницю, застосовували гарантовану найменшу значущу різницю Фішера як критерій подальшого випробування для порівняння експериментальних груп із групою пацієнтів-діабетиків, яким вводили розчинник. Було встановлено рівень значущості $p < 0,05$. Результати представлені як середнє \pm середня квадратична помилка середнього (s.e.m.).

Результати

Маса тіла

На відміну від пацієнтів-недіабетиків, які демонстрували прогресуючий ріст, пацієнти-діабетики демонстрували значну затримку росту (Фіг. 7A).

Введення SDF-1 α або IL-6 пов'язувалося із невеликим, але значущим зростанням маси тіла пацієнтів-діабетиків, яким вводили розчинник.

Глікемія

На 7 день після введення STZ, рівень глікемії в усіх пацієнтів, які одержали STZ, у 5 разів перевищував рівень, який спостерігався у контрольних пацієнтів (Фіг. 7B).

Електрофізіологічні показники

1. Латентність складного потенціалу дії м'язів

Латентність СМАР у пацієнтів-діабетиків на D25 значно зросла, порівняно з відповідним показником у пацієнтів-недіабетиків (Фіг. 7C). Введення SDF-1 α або IL-6 індукувало значне скорочення латентності СМАР у пацієнтів-діабетиків, порівняно з відповідним показником у пацієнтів-діабетиків, яким вводили розчинник.

Подібна крива результатів спостерігалась на D40 після введення STZ.

2. Швидкість провідності чутливих нервів

На D25 пацієнти-діабетики, яким вводили розчинник, демонстрували значно знижену SNCV, порівняно з пацієнтами-недіабетиками (Фіг. 7D). Введення SDF-1 α або IL-6 значно поліпшувало характеристики SNCV пацієнтів-діабетиків. Найкращий ефект спостерігався у разі введення доз у 10 мкг/кг та 30 мкг/кг і він був порівняним із ефектом, пов'язаним із введенням IL-6.

Подібна крива результатів спостерігалась на D40 після введення STZ.

Морфометричний аналіз

1. Відношення діаметра аксону/діаметра волокна (відносна товщина мієліну)

Відношення діаметра аксону/діаметра волокна у пацієнтів-діабетиків, яким вводили розчинник, значно зростало, порівняно з відповідним показником у пацієнтів-недіабетиків (Фіг. 7E), що дозволяло припускати потоншення мієлінової оболонки у па-

цюків-діабетиків. Введення пацюкам-діабетикам SDF-1 α значно зменшувало відношення діаметра аксону/діаметра волокна, порівняно з групою, якій вводили STZ/розчинник, зокрема, у дозах 10 мкг/кг або 30 мкг/кг. Зменшення відношення діаметра аксону/діаметра волокна у разі введення дози у 100 мкг/кг не досягало рівня значущості.

Введення IL-6 також індукувало значне зменшення відношення діаметра аксону/діаметра волокна.

2. Кількість дегенерованих волокон

Пацюки-діабетики, яким вводили розчинник, демонстрували значно більшу частку дегенерованих волокон, аніж пацюки-недіабетики (Фіг. 7F). 1, навпаки, частка недегенерованих волокон у пацюків-діабетиків була значно зменшеною, порівняно з відповідним показником у пацюків-недіабетиків (Фіг. 7F). Результатом введення пацюкам-діабетикам SDF-1 α було зменшення кількості дегенерованих волокон. Найкращий ефект спостерігався у разі найменшої застосованої дози (10 мкг/кг), і він досягав рівня значущості.

Значно зменшена кількість дегенерованих волокон спостерігалась також у пацюків-діабетиків, яким вводили IL-6.

Як показано на Фіг. 7G, у пацюків-діабетиків, які одержували розчинник, спостерігалась значно зменшена густина інтраепідермальних нервових волокон, порівняно з пацюками-недіабетиками. Введення пацюкам-діабетикам SDF-1 α пов'язувалось зі значно більшою густиною дермальних нервових волокон, аніж введення розчинника. Ефект, що спостерігався, був порівняним з ефектом, спричиненим введенням IL-6.

Висновки

У цьому дослідженні ми хотіли визначити захисний ефект, який чинив SDF-1 α на нервові клітини та глію у процесі розвитку невротії, пов'язаної з діабетом. Дослідження проводились на пацюках, які страждали на невротію, спричинену діабетом, викликаним STZ. Подібно появі клінічних ознак діабетичної невротії, порушення провідності чутливих нервів, яке виявлялось вже на 7 день після введення STZ, є першою ознакою, яка вказує на початок невротії у цієї моделі, що узгоджується з ознаками демієлінізації та/або дегенерації аксонів, яка спостерігається у пізніших часових точках (Андріамбелосон (Andriambeloston) та інші, 2006). Результати попереднього дослідження показали, що лікування пацюків, яким вводили STZ, низькими дозами IL-6, гальмувало розвиток невротії у цієї моделі без перешкоджання розвитку глікемії (Андріамбелосон (Andriambeloston) та інші, 2006).

При проведенні цього дослідження нами було встановлено, що постійне введення SDF-1 α (10 мкг/кг, 30 мкг/кг і 100 мкг/кг) поліпшує сенсорно-рухові показники пацюків-діабетиків (оцінка SNCV та латентності СМАР у балах) у межах приблизно двотижневого періоду лікування. Найкращий ефект одержали у разі введення лікувальних доз 10 мкг/кг або 30 мкг/кг, які забезпечували ефективність, порівняну з 10 мкг/кг IL-6. На додаток до цього, встановили, що введення SDF-1 α у таких дозах явно запобігало втраті мієліїту, пов'язаної з цією

моделлю. Оскільки якість мієлінової оболонки є важливою складовою оптимальної провідності нервового волокна, збереження розміру мієлінової оболонки може, *de facto*, частково пояснювати поліпшення функціонування нервів у пацюків-діабетиків, яким вводили SDF-1 α . На додаток до цього, спостерігалось також, що SDF-1 α зменшує кількість волокон сідничного нерва, які зазнають дегенерації аксонів.

Подібно до появи клінічних ознак діабетичної невротії, що демонструє кореляцію між присутністю і тяжкістю невротії та дегенерацією інтраепідермальних нервових волокон за результатами дослідження шкірних біопатів (Геррман (Herrmann) та Інші, 1999; Сміт (Smith) та інші, 2001), STZ-індукована діабетична невротія у пацюків також демонструє, що клінічні ознаки невротії у цієї тваринної моделі значною мірою корелювали із зменшенням густини інтраепідермальних нервових волокон. У відповідності до вищенаведених даних, це дослідження показало, що пацюки-діабетики, яким вводили розчинник, демонстрували значне зменшення густини інтраепідермальних нервових волокон. Це явище чітко запобігалось введенням SDF-1 α або IL-6, що, таким чином, відіграє роль додаткового підтвердження нейрозахисного ефекту лікування SDF-1 α пошкодження нервів, спричиненого діабетом.

Вищенаведені дані, у цілому, вказують на нейрозахисний ефект, який чинить введення SDF-1 α у пацючій моделі діабетичної невротії. SDF-1 α є кандидатом, що викликає інтерес при розробці способу лікування клінічної діабетичної невротії.

ПРИКЛАД 8: Захисний ефект SDF-1 α у разі болю невротичного походження

Вступ

Найпоширенішим обтяжуючим фактором болю невротичного походження є діабет, зокрема, у разі слабкої регуляції рівня глюкози у крові. Приблизно 2-24% хворих на діабет страждають від болю невротичного походження. Діабетичний біль невротичного походження може проявлятися або спонтанно, як наслідок дії слабких, за нормальних умов, болючих подразників (тобто гіпералгезія), або подразників, які, за нормальних обставин, не спричиняються як болючі (тобто алодинія). На стрептозоточинній моделі було продемонстровано ряд відхилень від норми у сприйнятті болю (Хунсом (Hounsom) та Томлінсон (TomUnson), 1997) на ранній стадії діабету. Наприклад, викликане формаліном здригання загострюється у пацюків, яким вводили STZ, порівняно з контрольними тваринами. На додаток до цього, повідомлялось про розвиток тактильної алодинії у цієї тваринної моделі діабету (Калькутт (Calcutt) та інші, 1995, 1996). На пізнішій стадії, у разі стійкої гіперглікемії (Б'янчі (Bianchi) та інші, 2004), повідомляли про підвищення порогового рівня при проведенні випробування на гарячій пластині, як відхилення поведінки від норми у пацюків-діабетиків.

Матеріали і методи Тварини

Пацюків-самців лінії Sprague Dawley віком вісім тижнів (компанія Janvier, Le Genest Saint Isle, Франція) довільно розподіляли на 6 експериментальних груп (n=10), як показано нижче.

Таблиця V

Група (n=10)	Лікування	Шляхи введення	Тривалість лікування (дні після введення STZ)
Контроль/Розчинник	Щоденно розчинник	підшкірно	від 11 до 40
STZ/Розчинник	Щоденно розчинник	підшкірно	від 11 до 40
STZ/SDF-1α (10 мкг/кг)	Щоденно SDF-1α	підшкірно	від 11 до 40
STZ/SDF-1α (30 мкг/кг)	Щоденно SDF-1α	підшкірно	від 11 до 40
STZ/SDF-1α (100 мкг/кг)	Щоденно SDF-1α	підшкірно	від 11 до 40
STZ/IL-6 (10 мкг/кг)	Щоденно IL-6	підшкірно	від 11 до 40

Тварин утримували групою (3 тварини на клітку) у приміщенні з регульованою температурою (21-22°C) і оберненим циклом чергування світла і темряви (12 год/12 год) з кормом і водою, доступними *ad libitum*. Усі експерименти здійснювали за методичними рекомендаціями установи.

Індукція діабету і фармакологічне лікування

Діабет спричинювали шляхом внутрішньовеного введення забуференого розчину стрептозотину (компанія Sigma, L'Isle d'Abeau Chesnes, Франція) у дозі 55 мг/кг. Розчин STZ одержували у 0,1 моль/л розчині цитратного буфера, рН 4,5. Контрольна група одержувала еквівалентний об'єм цитратного буфера. День введення STZ був прийнятий як D0.

На D10 після введення STZ у кожної окремої тварини визначали ступінь глікемії. Тварин із значенням нижче 260 мг/дл виключали з дослідження.

Введення SDF-1α, IL-6 або відповідних їм розчинників здійснювали щоденно з D11 до D40.

Розчин SDF-1α та IL-6 одержали у фізіологічному розчині (0,9% NaCl), що містив 0,02% розчин BSA.

Планування експериментів

- День 0: введення стрептозотину;
- День 7: контролювання рівня глікемії;
- День 11: початок лікування;
- День 20: тест фон Фрея;
- День 40: контролювання електроміографічних показників та випробування на гарячій пластині при температурі 52°C.

Випробування волоконцями фон Фрея

Пацюка вміщували на підлогу з металевої сітки. Ноцицептивну пробу проводили шляхом введення волоконця фон Фрея (компанія Bioseb, Франція) через сітчасту підлогу і прикладання його до підошовної поверхні задньої лапки. Випробування полягає у декількох прикладаннях різних волоконць фон Фрея (із частотою 1-1,5 с). Для прикладання застосовували волоконця фон Фрея від 10 г до 180 г. Тиск, що викликав швидке відведення задньої лапки, приймали як порогове значення. Гранична величина була встановлена на рівні 180 г.

Випробування на гарячій пластині при температурі 52°C

Тварину, що знаходилась у скляному циліндрі, вміщували на гарячу пластину, що мала температуру 52°C. Реєстрували латентний період першої реакції (лизання, різкий порух лапок, незначні підскоки або стрибки для уникнення тепла) з граничним часом на рівні 30 с

Результати

Волоконце фон Фрея

На 20 день після введення STZ пацюки-діабетики, яким вводили розчинник, демонстрували значно нижче порогове значення під час випробування волоконцями фон Фрея, аніж пацюки-недіабетики (Фіг. 8A).

Введення SDF-1α або IL-6 спричинювало значне підвищення порогового значення у пацюків-діабетиків, порівняно з оцінкою пацюків-діабетиків, яким вводили розчинник. Порогові значення у пацюків, яким вводили SDF-1α або IL-6, статистично не відрізнялись від відповідних показників пацюків-недіабетиків.

Випробування на гарячій пластині при температурі 52°C

На D40 після введення STZ, пацюки-діабетики, якими вводили розчинник, демонстрували значно більше порогове значення латентності під час випробування на гарячій пластині, аніж пацюки-недіабетики (Фіг. 8B). Введення пацюкам-діабетикам SDF-1α або IL-6 суттєво зменшувало значення порогової латентності у пацюків-діабетиків до рівня, статистично порівнянного з рівнем пацюків-недіабетиків.

Висновки

На D20 і D40 оцінювали поведінкову реакцію пацюків на застосування волоконця фон Фрея (механічне подразнення) і випробування на гарячій пластині (52°C), відповідно. Під час проведення цих двох випробувань, пацюки-діабетики, яким вводили SDF-1α, явно демонстрували поведінкову різницю, порівняно з пацюками, яким вводили розчинник, і їх оцінка досягла ступеня порівнянності з відповідними показниками пацюків-недіабетиків.

Ці результати, як видається, співпадають з електрофізіологічними та гістологічними даними і дозволяють висунути припущення про те, що SDF-1α може чинити захисну дію також у разі болю невротичного походження.

ПРИКЛАД 9: Генетичний зв'язок між геном SDF-1 та первинним прогресуючим розсіяним склерозом

Матеріали та методи

Сукупності хворих і контролів

У дослідженні приймала участь одна сукупність неспоріднених хворих із первинним прогресуючим розсіяним склерозом (MSPP). Усі суб'єкти, що приймали участь у дослідженні, були білими з Італії. Хворих та контрольних пацієнтів із Сардинії виключали.

У дослідженні приймали участь 197 хворих із прогресуючим перебігом захворювання. У 141 хворого спостерігалось прогресування неврологіч-

них симптомів із початку захворювання без рецидивів (первинний прогресуючий розсіяний склероз); 39 хворих мали прогресуючий перебіг захворювання з накладанням рецидивів (прогресуючий ремітуючий розсіяний склероз); 17 хворих мали прогресуючий перебіг захворювання, що розпочалося багато років тому після окремого нападу (однотиповий прогресуючий розсіяний склероз). Контрольна сукупність включала 234 неспоріднених здорових контрольних пацієнтів із таким самим етнічним фоном, що і експериментальна сукупність.

Експериментальна група мала статеве відношення 1,05 (101 жінка і 96 чоловіків) і середній вік на початку дослідження дорівнював 39,2 [19-65] років. Контрольна група включала 234 індивіди зі статевим відношенням 1,03 (119 жінок і 115 чоловіків) і середній вік дорівнював 40,4 [19-70] років.

ГЕНОТИПУВАННЯ

Методи аналізу геному у цілому: метод компанії Affymetrix

250 нг (5 мкл) ДНК з кожного зразка паралельно розщеплювали 10 одиницями рестриктаз Nsp I та Sty I (компанія New England Biolabs, Beverly, штат Массачусетс) впродовж 2 год при температурі 37°C. Після цього ферментспецифічні адаптерні олігонуклеотиди літували з розщепленими кінцями за допомогою T4 ДНК-лігази впродовж 3 год при температурі 16°C. Після розведення водою, 5 мкл розведеної лігувальної суміші піддавали ПЛР. ПЛР проводили за допомогою титанової Taq ДНК-полімерази (компанія BD Biosciences, San Jose, штат Каліфорнія) у присутності 25 мкМ розчину ПЛР праймеру 002 (компанія Affymetrix), 350 мкМ розчину кожного з дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфатів, 1 М розчину бетаїну (компанія USB, Cleveland, штат Огайо) та 1× титанового Taq ПЛР-буфера (компанія BD Biosciences). Параметри циклічної обробки були такими: початкова денатурація при температурі 94°C впродовж 3 хв, ампліфікація при температурі 94°C впродовж 30 с, при температурі 60°C впродовж 30 с і подовження при температурі 68°C впродовж 15 с із сукупним тридцятиразовим повторенням і кінцевим циклом подовження при температурі 68°C впродовж 7 хв. Продукти ПЛР трьох реакцій об'єднували і очищали на 96-лункових УФ ПЛР очисних планшетах MinElute (компанія Qiagen, Valencia, штат Каліфорнія) за інструкціями виробника. Зразки збирали до мікроцентрифужних пробірок і центрифугували при 16,000×g впродовж 10 хв.

Очищений продукт видаляли з пробірки з особливою обережністю для того, щоб не зруйнувати гелеподібний осад фосфату магнію білого кольору. Після цього продукти ПЛР перевіряли на мігра-

ційну здатність при середньому розмірі у межах 200-800 п.н. шляхом піддання електрофорезу у 2% TAE (трис-ацетат-етиленамінтрифтороцтова кислота) гелі. Потім 60 мкг очищених продуктів ПЛР фрагментували за допомогою 0,25 одиниць ДНКазі I при температурі 37°C впродовж 35 хв. Повну фрагментацію продуктів до середнього розміру менше за 180 п.н. перевіряли шляхом піддання електрофорезу у 2% TAE гелі. Після фрагментації ДНК піддавали кінцевому міченню за допомогою 105 одиниць кінцевої дезоксинуклеотиділтрансферази при температурі 37°C впродовж 2 год. Після цього мічену ДНК гібридизували з відповідною менделівською сукупністю при температурі 49°C впродовж 18 год при 60 об/хв. Гібридизовану сукупність промивали, забарвлювали і сканували за інструкціями виробника (компанія Affymetrix).

Генотипові сигнали визначали з використанням DM алгоритму при значенні $p < 0,33$ з подальшим груповим аналізом з використанням BRLMM алгоритму за інструкціями компанії Affymetrix.

Фільтрація SNP

SNP фільтрували за наведеними нижче критеріями:

- коефіцієнт відсутніх генотипів повинен становити $< 5\%$;
- мінімальна частота зустрічальності алелей (MAF) у контрольних пацієнтів повинна становити $> 1\%$;
- ймовірність незнаходження у стані рівноваги Харді-Вайнберга у контрольних пацієнтів повинна становити $< 2\%$;
- SNP у експериментальних групах повинен бути поліморфним. Для аналізу зберігали лише SNP з аутосомних хромосом.

СТАТИСТИЧНИЙ АНАЛІЗ

Методика:

FDR (частота несправжніх виявлень) визначали на 10000 пермутацій за допомогою наведених нижче одномірних критеріїв (із застосуванням точних критеріїв зі статистикою Пірсона) для кожної сукупності:

- Аельний критерій;
- Генотиповий критерій;
- Мінімальний аельний і генотиповий критерій (скорочений як "min");
- Максимальний аельний і генотиповий критерій (скорочений як "max").

РЕЗУЛЬТАТИ

Фільтрування SNP і частина обстеженого геному

Застосування визначених вище фільтрів зменшило кількість залишкових SNP, як показано у Таблиці VI:

Таблиця VI

Аналіз у заданому напрямку	Загальна кількість SNP	Кількість SNP після фільтрування	Залишок, %
Експериментальна група з MSPP/ контрольна група з MS	497,641	323,664	65%

Частота несправжніх виявлень (FDR)

Результати визначення FDR наведені на Фіг. 9.

У разі 10% порогового значення FDR, SNP і гени вибирались, як показано у Таблиці VII.

Таблиця VII

Аналіз у заданому напрямку	Кількість SNP	Кількість BIN	Кількість генів	Кількість пропусків
Контрольна група з MSPP	78	72	62	10

Один SNP (SNP_A-2185631) вибрали у гені SDF-1 (CXCL2) (дивись Фіг. 10).

Дивлячись на таблицю спряженості ознак, ми бачимо, що зв'язок є наслідком диференційного розподілу алелю С у експериментальних та контрольних групах.

Таблиця VIII

Генотипи	MSPP/контрольні пацієнти	
	Експериментальні групи	Контрольні групи
CC	2,2%	0,0%
CG	22,8%	7,4%
GG	75,0%	92,6%

Докладний біоаналіз ділянки довкола цього SNP показує, що він знаходиться у інтроні нещодавно відкритих нових ізоформ SDF-1, як описано далі:

За програмою Ensembl, яка ідентифікувала лише дві ізоформи SDF-1 альфа та SDF-1 бета, SNP_A-2185631 знаходиться у гені SDF-1 (відомому також як CXCL12) на відстані 25 т.п.н. у 5'-3' напрямку. Близьче до SNP_A-2185631 немає жодного гена.

SDF-1 знаходиться на хромосомі 10 (44,192,517-44,200,551, NCBI build 35) і стягує 8 т.п.н.

Анотацію геномної послідовності зробили для того, щоб знати, чи не може SNP_A-2185631 бути спорідненим із геном SDF-1 або будь-яким іншим сусіднім геном.

У базі послідовностей були відкриті сплайсовані варіанти, не описані у програмі Ensembl: SDF-1 гамма, SDF-1 дельта, SDF-1 епсилон і SDF-1 фі. Усі сплайсовані варіанти мають однакові перші 3 екзони. Останній екзон SDF-1 епсилон та SDF-1 фі знаходиться на відстані 72 т.п.н. у 5'-3' напрямку (дивись Фіг. 11). Ці нові послідовності були представлені до NCBI у червні 2006 року компанією "Lilly Research Laboratories, Cardiovascular Division, Cancer Division and Integrative Biology, Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN 46285, США". кДНК (DQ345520 та DQ345519), яка кодує ці дві ізоформи, містить канонічні точки сплайсингу, сигнал поліаденілування і полі(А) хвіст (відсутній на геномній послідовності).

Оскільки усі сплайсовані варіанти мають однакові перші три екзони, 6 ізоформ мають однакову N-клену частину (88 амінокислот).

Таким чином, докладний біоаналіз ділянки довкола SNP_A-2185631 показав, що:

- ген SDF-1 є довшим, ніж очікувалось: 87 т.п.н. замість 8 т.п.н.;

- SNP, який становить інтерес (SNP_A-2185631) знаходиться у гені SDF-1, який знаходиться у останньому інтроні SDF-1 епсилон та SDF-1 фі (дивись Фіг. 12).

Таким чином, доходять висновку, що ген SDF-1 пов'язується з первинним прогресуючим розсіяним склерозом.

ПОСИЛАННЯ

1. Andriambeloson E., Baillet C., Vitte P.A., Garrota G., Dreano M., Callizot N. (2006) Interleukin-6 attenuates the development of experimental diabetes-related neuropathy. *Neuropathology*. 26, 32-42.

2. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. and Lipman D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.

3. Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., and Lipman D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.

4. Amara A., Lorthioir O., Valenzuela A., Magerus A., Thelen M., Monies M., Virelizier J.L., Delepiere M., Baleux F., Lortat-Jacob H., and Arenzana-Seisdedos F. (1999). Stromal cell-derived factor-1 alpha associates with heparan sulfates through the first beta-strand of the chemokine. *J. Biol. Chem.* 274, 23916-23925.

5. Ambrosini E., Remoli M.E., Giacomini E., Rosicarelli B., Serafini B., Lande R., Aloisi F., and Coccia E.M. (2005). Astrocytes produce dendritic cell-attracting chemokines in vitro and in multiple sclerosis lesions. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 64, 706-715.

6. Bajetto A., Bonavia R., Barbero S., Florio T., and Schettini G. (2001). Chemokines and their receptors in the central nervous system. *Front Neuroendocrinol.* 22, 147-184.

7. Bezzi P., Domercq M., Brambilla L., Galli R., Schols D., De Clercq E., Vescovi A., Bagetta G., Kollias G., Meldolesi J., and Volterra A. (2001). CXCR4-activated astrocyte glutamate release via TNFalpha: amplification by microglia triggers neurotoxicity. *Nat Neurosci* 4, 702-710.

8. Bianchi R., Buyukakffli B., Brines M., Savino C., Cavaletti G., Oggioni N., Lauria G., Borgna M., Lombardi R., Cimen B., Comelekoglu U., Kanik A., Tataroglu C., Cerami A., Ghezzi P. (2004) Erythropoietin both protects from and reverses experimental diabetic neuropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 101,823-828.

9. Bottenstein J.E. and Sato G.H. (1979). Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 76, 514-517.

10. Calcutt N.A., Jorge M.C., Yaksh T.L., Chaplan S.R. (1996) Tactile allodynia and formalin hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin, aldose reductase inhibition and lidocaine. *Pain* 68, 293-299.

11. Calcutt N.A., Li L, Yaksh T.L., Malmberg A.B. (1995) Different effects of two aldose reductase inhibitors on nociception and prostaglandin. *Eur. J. Pharmacol.* 285, 189-197.

12. Cameron N.E., Cotter M.A., Low P.A. (1991) Nerve blood flow in early experimental diabetes in

rats: relation to conduction deficits. *Am. J. Physiol.* 261, E1-8.

13. Consilvio C., Vincent A.M., and Feldman E.L. (2004). Neuroinflammation, COX-2, and ALS-a dual role? *Exp. Neurol.* 187, 1-10.

14. Devereux J., Haerberli P., and Smithies O. (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res.* 12, 387-395.

15. Dyck P.J.B., Dyck P.J. (1999) Diabetic polyneuropathy. In *Diabetic Neuropathy*, Dyck P.J., Thomas P.K. (eds). Saunders W.B.: Philadelphia, PA, 255-278.

16. Eikelenboom P., Bate C., Van Gool W.A., Hoozemans J.J., Rozemuller J.M., Veerhuis R., and Williams A. (2002). Neuroinflammation in Alzheimer's disease and prion disease. *Glia* 40, 232-239.

17. Gao H.M., Liu B., Zhang W., and Hong J.S. (2003). Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. *Trends Pharmacol Sci* 24, 395-401.

18. Gleichmann M., Gillen C., Czardybon M., Bosse F., Greiner-Petter R., Auer J., and Muller H.W. (2000). Cloning and characterization of SDF-1gamma, a novel SDF-1 chemokine transcript with developmentally regulated expression in the nervous system. *Eur J. Neurosci* 12, 1857-1866.

19. Grantham R. (1974). Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science* 185, 862-864.

20. Hesselgesser J., Taub D., Baskar P., Greenberg M., Hoxie J., Kolson D.L., and Horuk R. (1998). Neuronal apoptosis induced by HIV-1 gp120 and the chemokine SDF-1 alpha is mediated by the chemokine receptor CXCR4. *Curr Biol* 8, 595-598.

21. Hoogewerf A.J., Kuschert G.S., Proudfoot A.E., Borlat F., Clark-Lewis I., Power C.A., and Wells T.N. (1997). Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines. *Biochemistry* 36, 13570-13578.

22. Hunter C.L., Bachman D., and Granholm A.C. (2004). Minocycline prevents cholinergic loss in a mouse model of Down's syndrome. *Ann. Neurol.* 56, 675-688.

23. Infante J., Llorca J., Berciano J., and Combarros O. (2005). Interleukin-8, intercellular adhesion molecule-1 and tumour necrosis factor-alpha gene polymorphisms and the risk for multiple system atrophy. *J. Neurol. Sci* 228, 11-13.

24. Jakobsen J. (1976) Axonal dwindling in early experimental diabetes. II. A study of isolated nerve fibres. *Diabetologia* 12, 547-553.

25. Jiang Y., Salafranca M.N., Adhikari S., Xia Y., Feng L., Sonntag M.K., deFiebre C.M., Pennell N.A., Streit W.J., and Harrison J.K. (1998). Chemokine receptor expression in cultured glia and rat experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 86, 1-12.

26. Lazarini F., Tham T.N., Casanova P., Arenzana-Seisdedos F., and Dubois-Dalq M. (2003). Role of the alpha-chemokine stromal cell-derived factor (SDF-1) in the developing and mature central nervous system. *Glia* 42, 139-148.

27. Lehnardt S., Lachance C., Patrizi S., Lefebvre S., Follett P.L., Jensen F.E., Rosenberg P.A., Volpe J.J., and Vartanian T. (2002). The toll-like receptor

TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. *J. Neurosci* 22, 2478-2486.

28. Lehnardt S., Massillon L., Follett P., Jensen F.E., Ratan R., Rosenberg P.A., Volpe J.J., and Vartanian T. (2003). Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8514-8519.

29. Ma Q., Jones D., Borghesani P.R., Segal R.A., Nagasawa T., Kishimoto T., Bronson R.T., and Springer T.A. (1998). Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in C. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 95, 9448-9453.

30. Noseworthy J.H. (1999). Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis. *Nature* 399, A40-A47.

31. Panenka W., Jijon H., Herx L.M., Armstrong J.N., Feighan D., Wei T., Yong V.W., Ransohoff R.M., and MacVicar B.A. (2001). P2X7-like receptor activation in astrocytes increases chemokine monocyte chemoattractant protein-1 expression via mitogen-activated protein kinase. *J. Neurosci* 21, 7135-7142.

32. Pearson W.R. (1990). Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. *Methods Enzymol.* 183, 63-98.

33. Pearson W.R. and Lipman D.J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2444-2448.

34. Perry V.H. (2004). The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. *Brain Behav. Immun.* 18, 407-413.

35. Phizicky E.M. and Fields S. (1995). Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol. Rev* 59, 94-123.

36. Robinson S., Tani M., Strieter R.M., Ransohoff R.M., and Mfller R.H. (1998). The chemokine growth-regulated oncogene-alpha promotes spinal cord oligodendrocyte precursor proliferation. *J. Neurosci* 18, 10457-10463.

37. Rovaris M., Judica E., Gallo A., Benedettini B., Sormani M.P., Caputo D., Ghezzi A., Montanari E., Bertolotto A., Mancardi G., Bergamaschi R., Mrtinelli V., Cori G., Filippi M. (2006) Grey matter damage predicts the evolution of primary progressive multiple sclerosis at 5 years. *Brain*, August 18, 1-7.

38. Sadir R., Baleux R., Grosdidier A., Imbert A., and Lortat-Jacob H. (2001). Characterization of the stromal cell-derived factor-1alpha-heparin complex. *J. Biol. Chem.* 276, 8288-8296.

39. Sahrbacher U.C., Lechner F., Eugster H.P., Frei K., Lassmann H., and Fontana A. (1998). Mice with an inactivation of the inducible nitric oxide synthase gene are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* 28, 1332-1338.

40. Schwarz M.K. and Wells T.N. (1999). Interfering with chemokine networks - the hope for new therapeutics. *Curr Opin Chem Biol* 3, 407-417.

41. Sima A.A., Nathaniel V., Bril V., McEwen T.A., Greene D.A. (1988) Histopathological heterogeneity of neuropathy in insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes, and demonstration of

axo-glia dysjunction in human diabetic neuropathy. *J. Clin. Invest* 81, 349-364.

42. Sima A.A. (1994) Pathological definition and evaluation of diabetic neuropathy and clinical correlations. *Can. J. Neurol. Sci.* 21, S13-17.

43. Smith T.F. and Waterman M.S. (1981). Identification of common molecular subsequences. *J. Mol. Biol.* 147, 195-197.

44. Sorensen T.L., Trebst C., KivisakkP., Klaege K.L., Majmudar A., Ravid R., Lassmann H., Olsen D.B., Strieter R.M., Ransohoff R.M., and Sellebjerg F. (2002). Multiple sclerosis: a study of CXCL10 and CXCR3 co-localization in the inflamed central nervous system. *J. Neuroimmunol.* 127, 59-68.

45. Stoll G., Jander S., and Myers R.R. (2002). Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *J. Peripher. Nerv. Syst.* 7, 13-27.

46. Stumm R.K., Rummel J., Junker V., Culmsee C., Pfeiffer M., Kriegstein J., Holt V., and Schulz S. (2002). A dual role for the SDF-1/CXCR4 chemokine receptor system in adult brain: isoform-selective regu-

lation of SDF-1 expression modulates CXCR4-dependent neuronal plasticity and cerebral leukocyte recruitment after focal ischemia. *J. Neurosci* 22, 5865-5878.

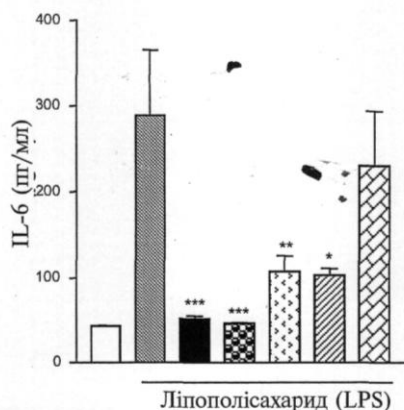
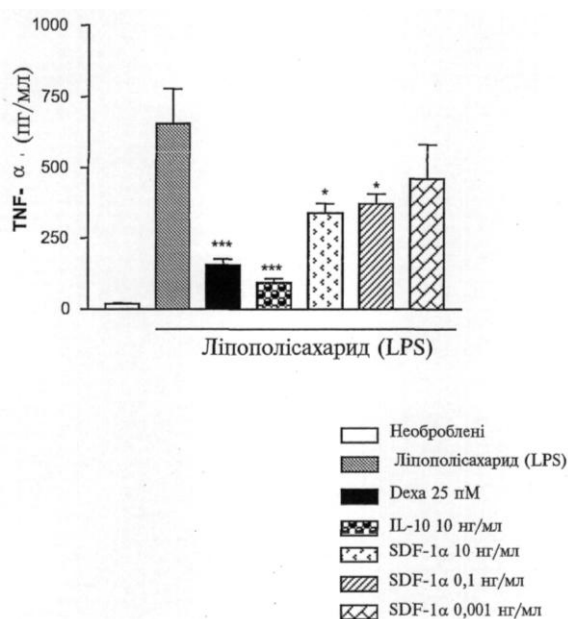
47. Tuppo E.E. and Arias H.R. (2005). The role of inflammation in Alzheimer's disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 37, 289-305.

48. Yu L. et al. (2006). Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1.

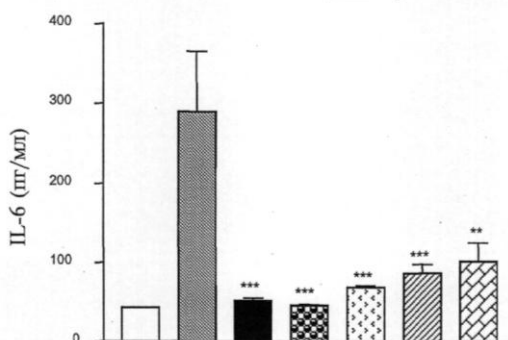
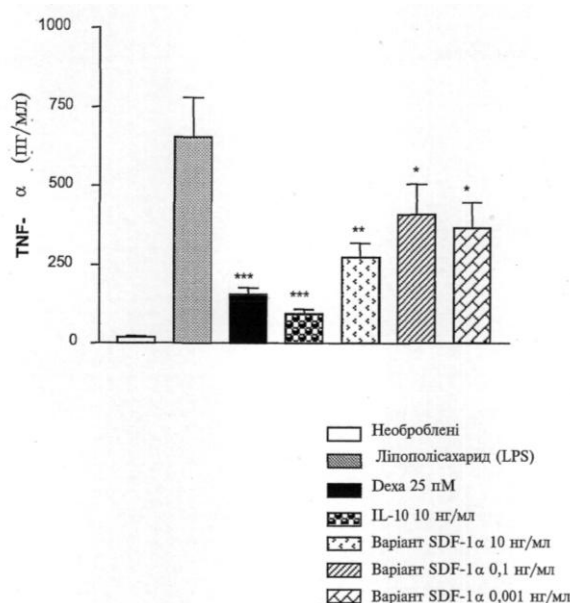
49. Zhu Y., Yu T., Zhang X.C., Nagasawa T., Wu J.Y., and Rao Y. (2002). Role of the chemokine SDF-1 as the meningeal attractant for embryonic cerebellar neurons. *Nat. Neurosci.* 5, 719-720.

50. Zou Y.R., Kottmann A.H., Kuroda M., Taniuchi I., and Littman D.R. (1998). Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 393, 595-599.

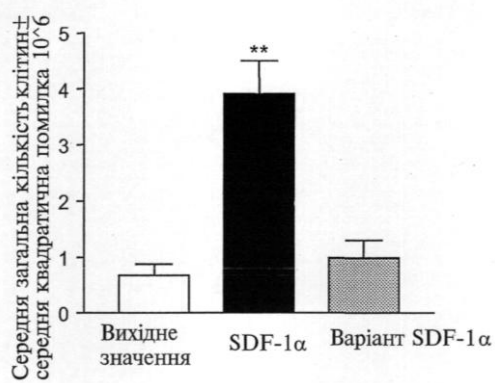
51. Zujovic V., Benavides J., Vige X., Carter C., and Taupin V. (2000). Fractalkine modulates TNF- α secretion and neurotoxicity induced by microglial activation. *Glia* 29, 305-315.



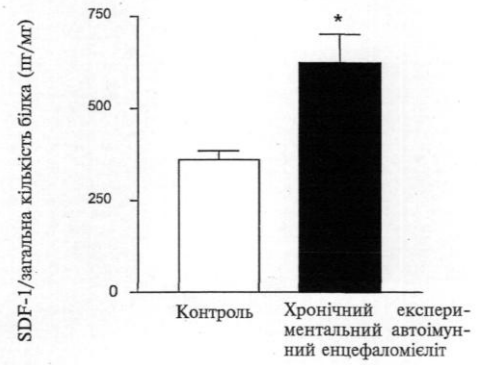
ФІГ. 1А



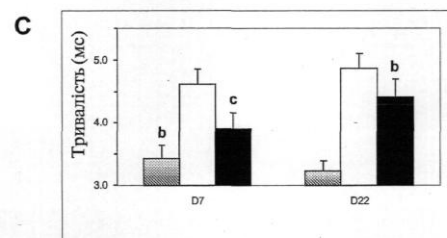
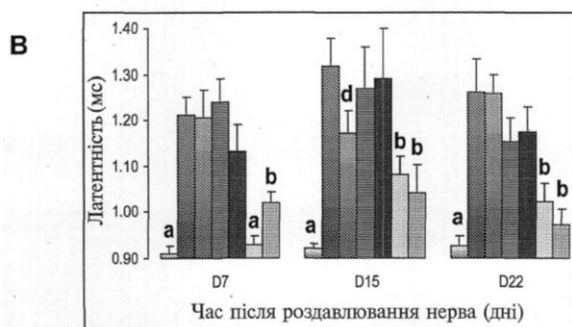
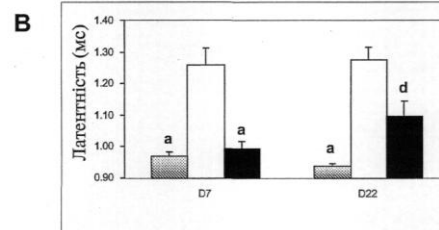
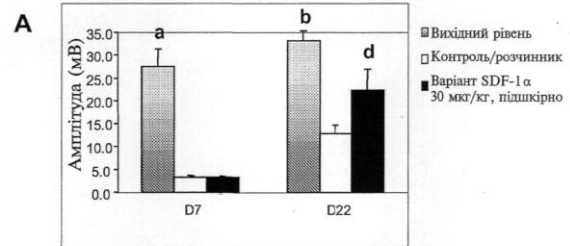
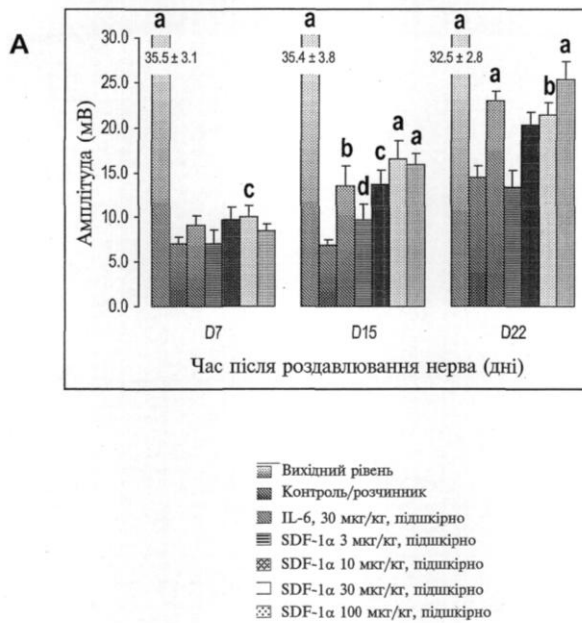
ФІГ. 1В



ФІГ. 2

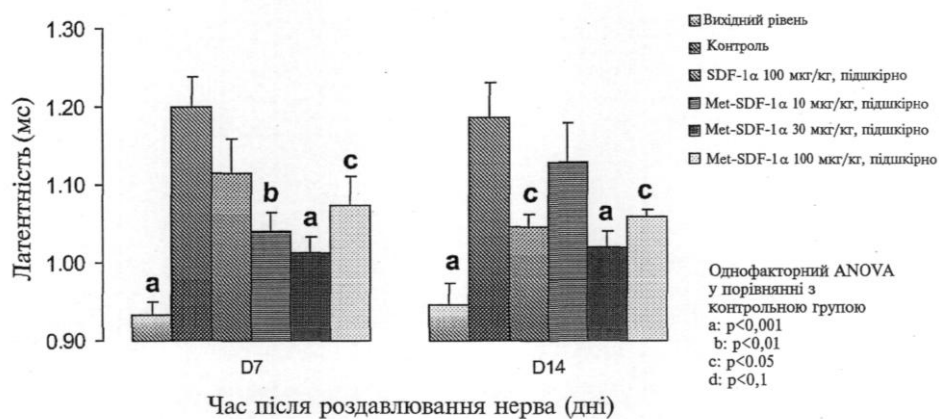


ФІГ. 3



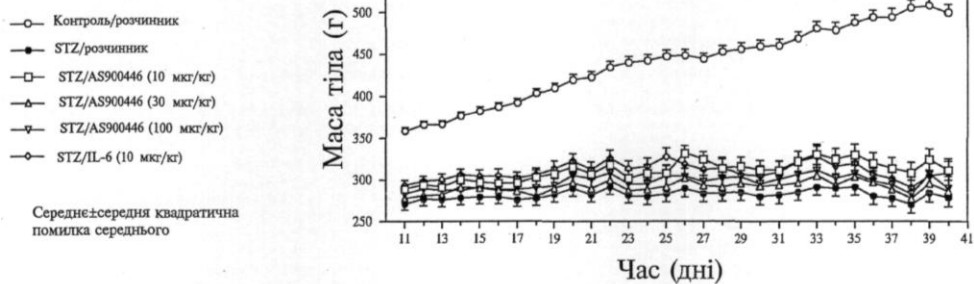
ФІГ. 4

ФІГ. 5

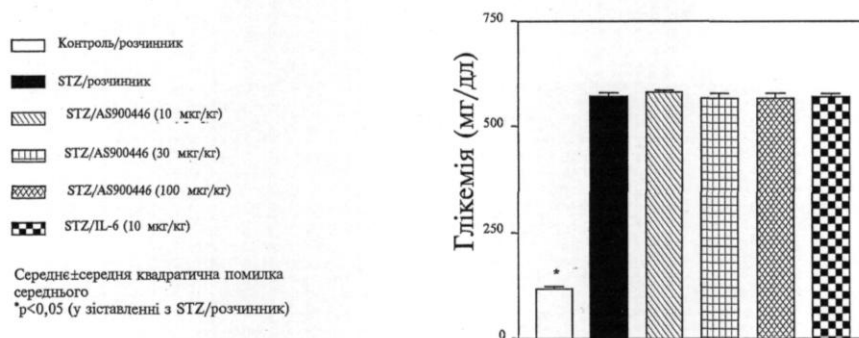


ФІГ. 6

А. Маса тіла



В. Глікемія

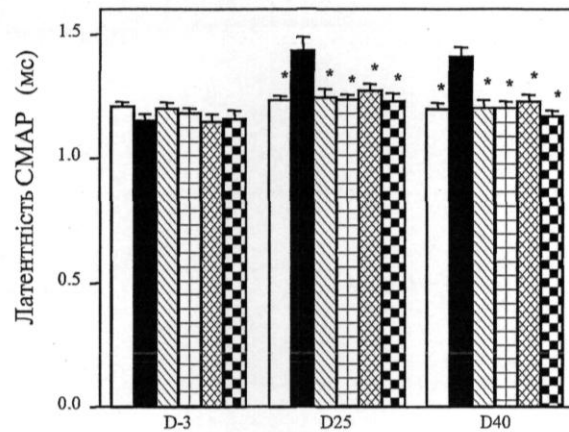


ФІГ. 7

С. Латентність СМАР

□ Контроль/розчинник
 ■ STZ/розчинник
 ▨ STZ/AS900446 (10 мкг/кг)
 ▩ STZ/AS900446 (30 мкг/кг)
 ▤ STZ/AS900446 (100 мкг/кг)
 ▥ STZ/IL-6 (10 мкг/кг)

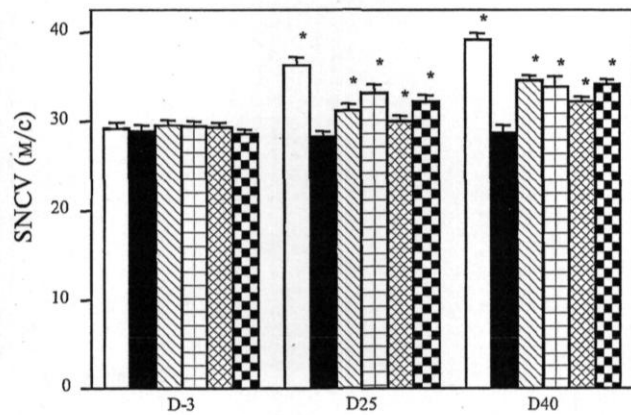
Середне±середня квадратична помилка
 середнього
 * $p < 0,05$ (у зіставленні з STZ/розчинник)



D. SNCV

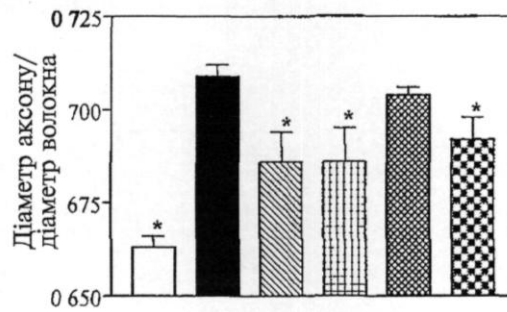
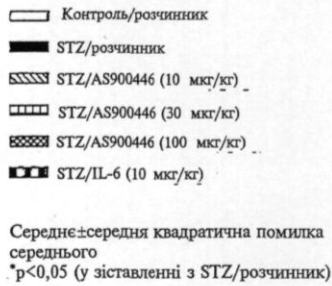
□ Контроль/розчинник
 ■ STZ/розчинник
 ▨ STZ/AS900446 (10 мкг/кг)
 ▩ STZ/AS900446 (30 мкг/кг)
 ▤ STZ/AS900446 (100 мкг/кг)
 ▥ STZ/IL-6 (10 мкг/кг)

Середне±середня квадратична помилка
 середнього
 * $p < 0,05$ (у зіставленні з STZ/розчинник)

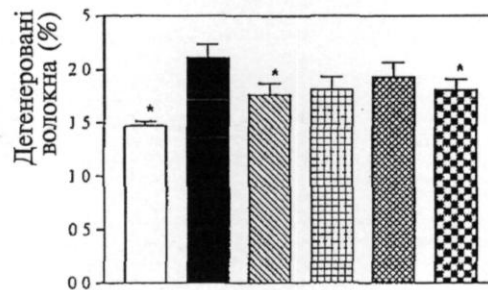
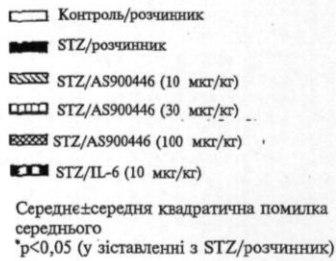


ФІГ. 7 продовження

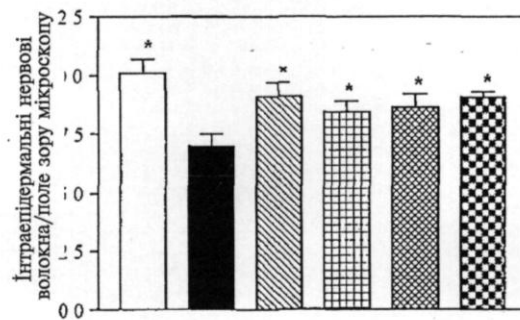
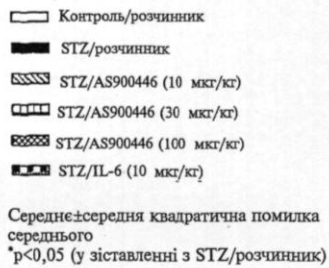
Е. Діаметр аксону/діаметр волокну



Ф. Частина дегенерованих волокон



Г. Густина інтраепідермальних нервових волокон

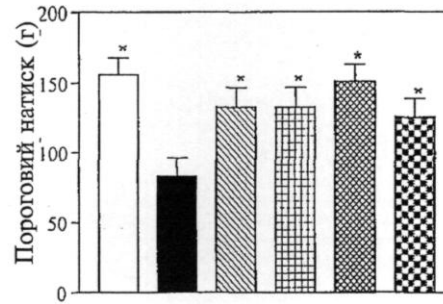


ФІГ. 7 продовження

А. Випробування волоконцями фон Фрея

- Контроль/розчинник
- STZ/розчинник
- ▨ STZ/AS900446 (10 мкг/кг)
- ▤ STZ/AS900446 (30 мкг/кг)
- ▥ STZ/AS900446 (100 мкг/кг)
- ▧ STZ/IL-6 (10 мкг/кг)

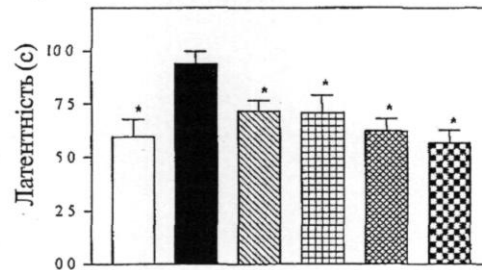
Середнє±середня квадратична помилка
середнього
* $p < 0,05$ (у зіставленні з STZ/розчинник)



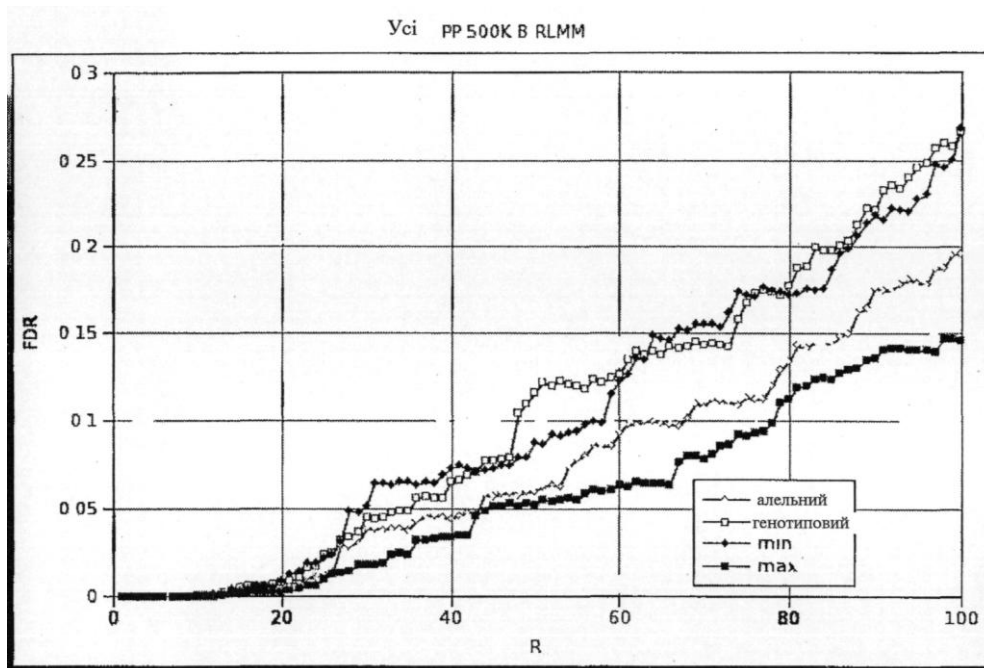
В. Випробування на гарячій пластині при температурі 52 °C

- Контроль/розчинник
- STZ/розчинник
- ▨ STZ/AS900446 (10 мкг/кг)
- ▤ STZ/AS900446 (30 мкг/кг)
- ▥ STZ/AS900446 (100 мкг/кг)
- ▧ STZ/IL-6 (10 мкг/кг)

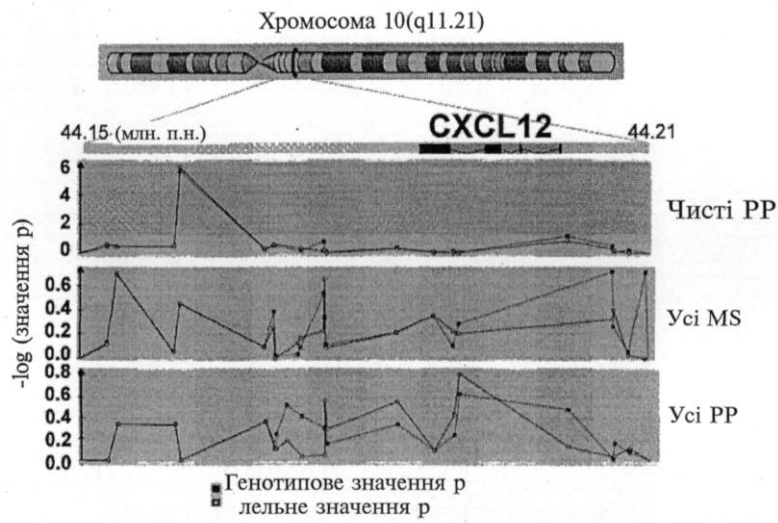
Середнє±середня квадратична помилка
середнього
* $p < 0,05$ (у зіставленні з STZ/розчинник)



ФІГ. 8

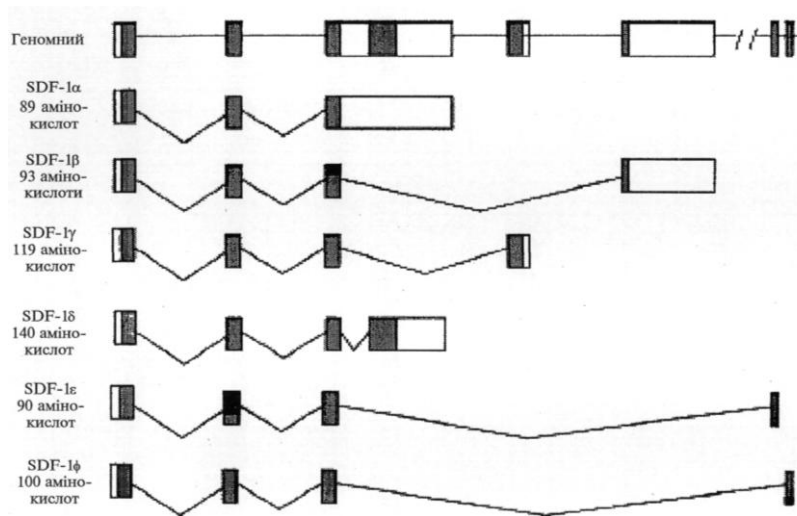


ФІГ. 9

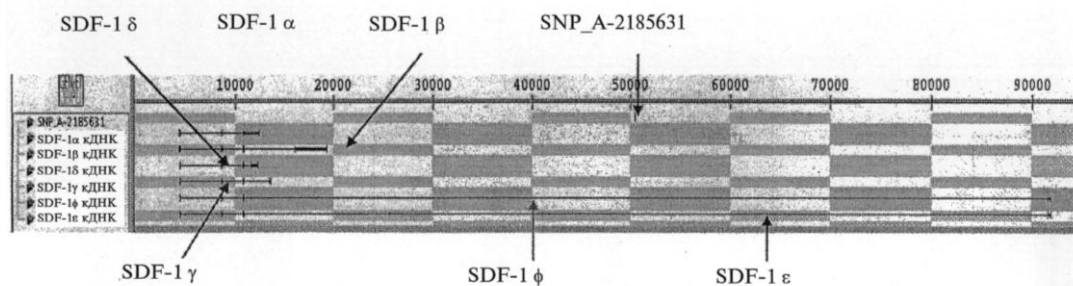


Усі MS: жодного зв'язку
 Усі PP: PP+деякі SP і т.ін.: жодного зв'язку
 Чисті PP: сильний зв'язок (лише 1 SNP, 25 т.п.н. 3' SDF-1)

ФІГ. 10



ФІГ. 11



ФІГ. 12

ЛІСТИНГ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Applied Research Systems ARS Holding N.V.

<120> ЗАСТОСУВАННЯ SDF-1 ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ТА/АБО ПРОФІЛАКТИКИ НЕВРОЛОГІЧНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

<130> 1108 WO

<150> EP05110206.9

<151> 2005-10-31

<150> US 60/734,142

<151> 2005-11-07

<160> 18

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 68

<212> PRT

<213> Людський

<400> 1

Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser
1 5 10 15

His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro
20 25 30

Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln
35 40 45

Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys
50 55 60

Ala Leu Asn Lys
65

<210> 2

<211> 72

<212> PRT

<213> Людський

<400> 2

Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser
1 5 10 15

His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro
20 25 30

Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln
35 40 45

Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys
50 55 60

Ala Leu Asn Lys Arg Phe Lys Met
65 70

<210> 3

<211> 98

<212> PRT

<213> Людський

<400> 3

Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser
 1 5 10 15
 His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro
 20 25 30
 Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln
 35 40 45
 Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys
 50 55 60
 Ala Leu Asn Lys Gly Arg Arg Glu Glu Lys Val Gly Lys Lys Glu Lys
 65 70 75 80
 Ile Gly Lys Lys Lys Arg Gln Lys Lys Arg Lys Ala Ala Gln Lys Arg
 85 90 95
 Lys Asn

<210> 4

<211> 68

<212> PRT

<213> Людський

<400> 4

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

<210> 5

<211> 21

<212> PRT

<213> Людський

<400> 5

Met Asn Ala Lys Val Val Val Val Leu Val Leu Val Leu Thr Ala Leu
 1 5 10 15
 Cys Leu Ser Asp Gly
 20

<210> 6

<211> 267

<212> ДНК

<213> Людський

<400> 6

atgaacgcc aagtcgtggt cgtgctggtc ctcgtgctga ccgcgctctg cctcagcgac 60
 gggaagcccg tcagcctgag ctacagatgc ccatgccgat tcttcgaaag ccatgttgcc 120

agagccaacg tcaagcatct caaaattctc aacactccaa actgtgccct tcagattgta 180
 gcccggtga agaacaacaa cagacaagtg tgcattgacc cgaagctaaa gtggattcag 240
 gagtacctgg agaaagcttt aaacaag 267

<210> 7
 <211> 69
 <212> PRT
 <213> Людський

<400> 7

Met Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu
 1 5 10 15

Ser His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr
 20 25 30

Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg
 35 40 45

Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu
 50 55 60

Lys Ala Leu Asn Lys
 65

<210> 8
 <211> 65
 <212> PRT
 <213> Людський

<400> 8

Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser His Val Ala
 1 5 10 15

Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys Ala
 20 25 30

Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile
 35 40 45

Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys Ala Leu Asn
 50 55 60

Lys
 65

<210> 9
 <211> 66
 <212> PRT
 <213> Людський
 <400> 9

Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser His Val
 1 5 10 15

Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys
 20 25 30

Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln Val Cys
 35 40 45

Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys Ala Leu
 50 55 60

Asn Lys
65

<210> 10
<211> 67
<212> PRT
<213> Людський

<400> 10

Met Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser His
1 5 10 15

Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro Asn
20 25 30

Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln Val
35 40 45

Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys Ala
50 55 60

Leu Asn Lys
65

<210> 11
<211> 69
<212> PRT
<213> Людський

<400> 11

Met Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu
1 5 10 15

Ser His Val Ala Arg Ala Asn Val Ala Ala Leu Ala Ile Leu Asn Thr
20 25 30

Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg
35 40 45

Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu
50 55 60

Lys Ala Leu Asn Lys
65

<210> 12
<211> 68
<212> PRT
<213> Людський

<400> 12

Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser
1 5 10 15

His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Cys Ile Leu Asn Thr Pro
20 25 30

Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln
35 40 45

Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys
50 55 60

Ala Leu Asn Lys
65

<210> 13
 <211> 300
 <212> PRT
 <213> Людський

<400> 13

Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser
 1 5 10 15
 His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro
 20 25 30
 Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln
 35 40 45
 Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys
 50 55 60
 Ala Leu Asn Lys Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 65 70 75 80
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe
 85 90 95
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 100 105 110
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 115 120 125
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 130 135 140
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 145 150 155 160
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 165 170 175
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 180 185 190
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 195 200 205
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 210 215 220
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 225 230 235 240
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 245 250 255
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 260 265 270
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 275 280 285
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 290 295 300

<210> 14
 <211> 119
 <212> PRT

<213> Людський

<400> 14

Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser
1 5 10 15
His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro
20 25 30
Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln
35 40 45
Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys
50 55 60
Ala Leu Asn Asn Leu Ile Ser Ala Ala Pro Ala Gly Lys Arg Val Ile
65 70 75 80
Ala Gly Ala Arg Ala Leu His Pro Ser Pro Pro Arg Ala Cys Pro Thr
85 90 95
Ala Arg Ala Leu Cys Glu Ile Arg Leu Trp Pro Pro Pro Glu Trp Ser
100 105 110
Trp Pro Ser Pro Gly Asp Val
115

<210> 15

<211> 69

<212> PRT

<213> Людський

<400> 15

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

<210> 16

<211> 79

<212> PRT

<213> Людський

<400> 16

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

Ala Leu Asn Lys Ile Trp Leu Tyr Gly Asn Ala Glu Thr Ser Arg
65 70 75

<210> 17
<211> 65
<212> PRT
<213> Людський

<400> 17

Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser His Val
1 5 10 15

Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys
20 25 30

Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln Val Cys
35 40 45

Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys Ala Leu
50 55 60

Asn
65

<210> 18
<211> 66
<212> PRT
<213> Людський

<400> 18

Met Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys Arg Phe Phe Glu Ser His
1 5 10 15

Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys Ile Leu Asn Thr Pro Asn
20 25 30

Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys Asn Asn Asn Arg Gln Val
35 40 45

Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln Glu Tyr Leu Glu Lys Ala
50 55 60

Leu Asn
65