

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-520041
(P2004-520041A)

(43) 公表日 平成16年7月8日(2004.7.8)

| | | |
|----------------------------|---------------|-------------|
| (51) Int. Cl. ⁷ | F I | テーマコード (参考) |
| C 1 2 Q 1/37 | C 1 2 Q 1/37 | Z N A |
| GO 1 N 33/15 | GO 1 N 33/15 | Z |
| GO 1 N 33/50 | GO 1 N 33/50 | Z |
| // C 1 2 N 15/09 | C 1 2 N 15/00 | A |

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 100 頁)

(21) 出願番号 特願2002-558535 (P2002-558535)
 (86) (22) 出願日 平成14年1月18日 (2002.1.18)
 (85) 翻訳文提出日 平成15年7月15日 (2003.7.15)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2002/000228
 (87) 国際公開番号 W02002/057483
 (87) 国際公開日 平成14年7月25日 (2002.7.25)
 (31) 優先権主張番号 0101312.7
 (32) 優先日 平成13年1月18日 (2001.1.18)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

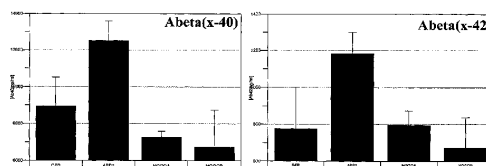
(71) 出願人 397009934
 グラクソ グループ リミテッド
 GLAXO GROUP LIMITED
 イギリス ミドルセックス ユービー6
 Oエヌエヌ グリーンフォード パークレ
 ー アベニュー グラクソ ウェルカム
 ハウス (番地なし)
 Glaxo Wellcome Hous
 e, Berkeley Avenue G
 reenford, Middlesex
 UB6 ONN, Great Brita
 in

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規アッセイ

(57) 【要約】

Nogo機能モジュレーターを同定する方法であって、(i) 以下の(a)~(c) : (a)BACEポリペプチド ; (b)Nogoポリペプチド ; (c)試験薬 [ここで前記BACEポリペプチド(a)はBACE、またはNogoと結合することができるその変異体もしくはそれらのいずれかの断片であり、かつポリペプチド(b)はNogo、またはBACEと結合することができるその変異体もしくはそれらのいずれかの断片である] を、試験薬(c)が不在であればBACEポリペプチド(a)とNogoポリペプチド(b)とが結合しうる条件下で、提供すること ; (ii) Nogoが媒介する活性をモニターすること ; および(ii) それにより試験薬がNogo活性のモジュレーターであるかどうかを決定すること、を含む前記方法。本発明の方法により同定されたモジュレーター、および急性神経傷害などのNogo活性のモジュレーションに反応する障害を治療するための医薬品の製造におけるかかるモジュレーターの使用。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

Nogo機能モジュレーターを同定する方法であって、下記(i)~(iii)：

(i) 以下の(a)~(c)：

(a)BACEポリペプチド；

(b)Nogoポリペプチド；

(c)試験薬

[ここで前記BACEポリペプチド(a)はBACE、またはNogoと結合することができるその変異体もしくはそれらのいずれかの断片であり、かつポリペプチド(b)はNogo、またはBACEと結合することができるその変異体もしくはそれらのいずれかの断片である]

を、試験薬(c)の不在下ではBACEポリペプチド(a)とNogoポリペプチド(b)とが結合できる条件下で、提供すること；

(ii) Nogoが媒介する活性をモニターすること；および

(iii) それにより試験薬がNogo活性のモジュレーターであるかどうかを決定すること、を含む前記方法。

【請求項 2】

ステップ(ii)が(a)と(b)との間の相互作用をモニターすることを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

モジュレーターが(a)と(b)との結合を阻害するものである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

モジュレーターが(a)と(b)との結合を増強するものである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

ステップ(ii)がプロテアーゼ活性をモニターすることを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記プロテアーゼ活性がアミロイド前駆体タンパク質の -セクターゼ切断である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

モジュレーターが前記プロテアーゼ活性を阻害するものである、請求項 5 または 6 に記載の方法。

【請求項 8】

BACEポリペプチド(a)がBACEまたは前記のその断片である、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

Nogoポリペプチド(b)がNogoBまたは前記のその断片である、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

BACE活性のモジュレーターを同定する方法であって、下記(i)および(ii)：

(i) BACEポリペプチドまたはBACE機能を維持しているその変異体もしくはそれらのいずれかの断片を試験薬と接触させること、および

(ii) BACE活性をモニターし、それにより試験薬がBACE活性のモジュレーターであるかどうかを決定すること、

を含む前記方法。

【請求項 11】

BACE活性が、Nogoもしくはその変異体またはそれらのいずれかの断片と前記ポリペプチドとが相互作用できることを含む、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法により同定可能であるNogo活性のモジュレーター。

【請求項 13】

50

請求項 10 または 11 に記載の方法により同定可能である BACE 活性のモジュレーター。

【請求項 14】

急性神経傷害を治療するための医薬品の製造における請求項 12 または 13 に記載のモジュレーターの使用。

【請求項 15】

急性神経傷害を治療するための医薬品の製造における、BACE ポリペプチド、または BACE ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの使用であって、但し BACE ポリペプチドが BACE、または Nogo と結合することができるその変異体もしくはそれらのいずれかの断片である、前記使用。

【請求項 16】

急性神経傷害を治療する方法であって、BACE ポリペプチド、BACE ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたは請求項 12 もしくは 13 に記載のモジュレーターの有効量を、かかる治療を必要とするヒトもしくは動物に投与することを含み、但し BACE ポリペプチドが BACE、または Nogo と結合することができるその変異体もしくはそれらのいずれかの断片である、前記方法。

【請求項 17】

急性神経傷害を治療する方法であって、下記 (i) および (ii) :

(i) BACE 活性のモジュレーターを同定すること ; および

(ii) 前記モジュレーターの治療上の有効量をそれを必要とする患者に投与すること、を含む前記方法。

【請求項 18】

急性神経傷害が脊髄損傷、脳卒中、頭部外傷および末梢神経損傷から選択される、請求項 14 もしくは 15 に記載の使用または請求項 16 もしくは 17 に記載の方法。

【請求項 19】

中枢神経系の新形成を治療するための医薬品の製造における、請求項 12 または 13 に記載のモジュレーターの使用。

【請求項 20】

新生物疾患、過増殖障害もしくは増殖不全障害を治療するための医薬品の製造における BACE ポリペプチド、または BACE ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの使用であって、但し BACE ポリペプチドが BACE、または Nogo と結合することができるその変異体もしくはそれらのいずれかの断片である、前記使用。

【請求項 21】

新生物疾患、過増殖障害または増殖不全障害を治療する方法であって、BACE ポリペプチド、BACE ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたは請求項 12 もしくは 13 に記載のモジュレーターの有効量を、かかる治療を必要とするヒトもしくは動物に投与することを含み、但し BACE ポリペプチドが BACE、または Nogo と結合することができるその変異体もしくはそれらのいずれかの断片である、前記方法。

【請求項 22】

新生物疾患、過増殖障害または増殖不全障害を治療する方法であって、下記 (i) および (ii) :

(i) BACE 活性のモジュレーターを同定すること ; および

(ii) 前記モジュレーターの治療上の有効量をそれを必要とする患者に投与すること、を含む前記方法。

【請求項 23】

新生物疾患、過増殖障害もしくは増殖不全障害が中枢神経系の障害である、請求項 19 もしくは 20 に記載の使用または請求項 21 もしくは 22 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

10

20

30

40

50

本発明は、Nogoおよび/またはBACE活性のモジュレーターを同定する方法、ならびにNogo活性のモジュレーションに反応する急性神経傷害などの状態の治療におけるそれらの使用に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

NogoA遺伝子から誘導される転写物の選択的スプライシングにより、少なくとも3つのNogoイソ型が生成される。3つのイソ型全てのC末端側の3分の1は、レチキュロン (reticulon) タンパク質ファミリーと高い相同性 (アミノ酸レベルでほぼ70%) を共有する。最大のイソ型であるNogoAは、培養における軸索再生を阻害することが示されている。Nogoタンパク質の正常な役割は、無損傷の中樞神経系における軸索出芽 (axon sprouting) を阻止することにあると考えられる。NogoAは中樞神経系ミエリンに局在し、稀突起膠細胞にて高度に発現され、またNogoBとNogoCは一部のニューロンおよび複数の非ニューロン組織にて発現される。全てのNogoイソ型は、驚くべきことに、C末端ER保持モチーフを有するが、少なくとも一部のNogoAタンパク質は細胞表面に達すると考えられる。3つのNogoイソ型は全て、2つの潜在的な膜貫通ドメインを有する。CおよびN末端は両方とも細胞質に曝され、TMドメインにより区切られた66アミノ酸ループが細胞外に位置すると思われる。

10

【0003】

最近、BACEと呼ばれるアスパルチルプロテアーゼ (Asp2またはメマプシン2としても知られる) が、アミロイド前駆体タンパク質 (APP) プロセッシングに関係する γ -セクレターゼ活性を担うことが示されている。BACEは、プロテアーゼドメインを含有する大きな内腔ドメイン (luminal domain) をもつI型膜貫通タンパク質である。

20

【発明の開示】

【0004】

発明の概要

本発明者らは、NogoとBACEとの間の新規相互作用を同定した。NogoとBACEとの間の相互作用は、Nogo機能の欠陥、さらに特定すれば、脊髄損傷、脳卒中、頭部外傷および末梢神経損傷などの急性神経傷害、新生物疾患、過増殖障害ならびに増殖不全障害に関連する障害における新しい治療介入点を提供するものである。さらに、今回、BACEを急性神経傷害、新生物疾患、過増殖障害および障害不全障害の治療において有用でありうる薬剤を同定する標的として提示した。

30

【0005】

従って、本発明はNogo機能モジュレーターを同定する方法であって、下記(i)~(iii) :

(i) 以下の(a)~(c) :

(a) BACEポリペプチド ;

(b) Nogoポリペプチド ;

(c) 試験薬

[ここで前記BACEポリペプチド(a)はBACE、またはNogoと結合することができるその変異体もしくはそれらのいずれかの断片であり、かつNogoポリペプチド(b)はNogo、またはBACEと結合することができるその変異体もしくはそれらのいずれかの断片である]

40

を、試験薬(c)の不在下ではBACEポリペプチド(a)とNogoポリペプチド(b)とが結合できる条件下で、提供すること ;

(ii) Nogoが媒介する活性をモニターすること ; および

(iii) それにより試験薬がNogo活性のモジュレーターであるかどうかを決定すること、を含んでなる前記方法を提供する。

【0006】

さらなる態様においては、本発明は、BACE活性のモジュレーターを同定する方法であって、下記(i)および(ii) :

(i) BACEまたはBACE機能を維持しているその変異体もしくはそれらのいずれかの断片を

50

、試験薬と接触させること；および

(ii) BACE活性をモニターし、それにより、試験薬がBACE活性のモジュレーターであるかどうかを決定すること、
を含んでなる前記方法を提供する。

【0007】

本発明はまた、以下のものを提供する：

- ・本発明による方法により同定可能なモジュレーター；
- ・急性神経傷害、新生物疾患、過増殖障害または増殖不全障害を治療または予防する医薬品の製造における、本発明による方法により同定可能なモジュレーターの使用；
- ・急性神経傷害、新形成、過増殖障害または増殖不全障害を治療する医薬品の製造における、BACEポリペプチドまたはBACEポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの使用であって、前記BACEポリペプチドがBACEまたはNogoと結合することができるその変異体もしくはそれらのいずれかの断片である、前記使用；
- ・急性神経傷害、新形成、過増殖障害または増殖不全障害を治療する方法であって、BACEポリペプチド、BACEポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたは本発明の方法により同定したBACE機能のモジュレーターの有効量を、かかる治療を必要とするヒトもしくは動物に投与することを含んでなり、ここで前記BACEポリペプチドはBACEまたはNogoと結合することができるその変異体もしくはそれらのいずれかの断片である、前記方法；ならびに
- ・急性神経傷害、新形成、過増殖障害または増殖不全障害を治療する方法であって、下記

(i)および(ii)：

(i) BACE活性のモジュレーターを同定すること；および

(ii) 前記モジュレーターの治療上有効量をその必要のある患者に投与すること、
を含んでなる前記方法。

【0008】

図面の簡単な説明

図1A

Nogo-Aモノクローナル抗体(6D5)を用いて染色したTas10(マウス番号4)の切片。全てのサイズのプラークを取り囲む染色環の存在に注目すること。

【0009】

図1B

左パネルは抗Nogo-Aポリクローナル抗体を用いて染色した切片を、異なる2つの倍率で示す。右の2つのパネルは、前記Nogo-Aポリクローナルと抗Abetaモノクローナル1E8を用いる二重染色を示す。

【0010】

図1C

これらのTas10トランスジェニックマウスにおいて、Asp2/BACE特異的モノクローナル抗体(9B21)を用いた同様の環状染色。

【0011】

図1D

モノクローナル9B21を用いたTas10トランスジェニックマウス脳切片のAsp2/BACE染色は、アミロイドプラークコア中へ伸びた神経突起に拡がる明瞭な細胞染色を示している。

【0012】

図1E

Nogo-A(左パネル)とAsp2/BACE(右パネル)に対して染色したマウス番号3(18月齢Tas10トランスジェニック)からの連続切片。より低いアミロイド量を示す動物におけるNogo-Aの過剰発現レベルがより低いこと(先の切片について動物4と比較して)に注目すること。両タンパク質は、両切片に存在する全プラークにおいて類似の重複する分布を示す。

【0013】

図2

10

20

30

40

50

胚性海馬ニューロンは細胞質全体でNogo-Aを発現するとともに、若干の表面局在が見られる。Nogo-A免疫反応性の集中が、神経突起に沿って軸索瘤またはシナプス構造に見られる。

【 0 0 1 4 】

図3A

一過性トランスフェクションは、SHSY5Y-APPswe細胞にて高レベルのAsp2/BACEおよびNogo-Aタンパク質を産生させる。左パネルは、Asp2/BACEを用いてトランスフェクトし、抗mycタグクローン9E10を用いて染色した細胞を示す。右パネルは、Nogo-Aを用いてトランスフェクトし、特定のモノクローナル抗体（クローン6D5）を用いて染色した細胞を示す。

【 0 0 1 5 】

図3B

Asp2/BACE-mycおよびNogo-AのSHSY5Y細胞中への同時トランスフェクション。パネルは次の染色を示す。上左 Hoescht核染色；上右 Asp2/BACE-myc；下左 Nogo-Aポリクローナル67；下右 Asp2/BACEとNogo-A染色のマージ。二重トランスフェクトした細胞におけるAsp2/BACEのプールとNogo-Aとの共分布に注目すること。

【 0 0 1 6 】

図3C

Asp2/BACE-mycおよびNogo-BのSHSY5Y細胞中への同時トランスフェクション。パネルは次の染色を示す。上左 Hoescht核染色；上右 Asp2/BACE-myc；下左 Nogo-Bポリクローナル66；下右 Asp2/BACEとNogo-B染色のマージ。二重トランスフェクトした細胞におけるAsp2/BACEのプールとNogo-Bとの共分布に注目すること。

【 0 0 1 7 】

図4A

Nogoイソ型過剰発現はSHSY5Y-APPswe細胞におけるAbeta産生を増強しない。左パネルはSHSY5Y-APPswedish細胞中へのトランスフェクションのAbeta X-40産生に対する効果を示す。右パネルはトランスフェクションのAbeta X-42産生に対する効果を示す。各パネルにおいてバーはそれぞれGFP、Asp2/BACE、Nogo-AおよびNogo-Bを用いたトランスフェクション後の活性を示す。Asp2/BACEはこの細胞密度でこれらの細胞におけるAbeta産生が増加するのに対して、2つのNogoイソ型の単独トランスフェクションはこの細胞密度で産生を増強しないと思われることに注目すること。

【 0 0 1 8 】

図4B

Nogoイソ型とAsp2/BACEとの同時発現は、SHSY5Y-APPswe細胞におけるAb産生をモジュレートする。AbetaX-40（左パネル）とAbetaX-42（右パネル）とを測定するアッセイは、示したDNAの組み合わせにより同時トランスフェクトした細胞に対して、次の順で実施した。Asp2/BACE + GFP；Asp2/BACE + Nogo-A；Asp2/BACE + Nogo-B；Asp2/BACE + Nogo-C。二重トランスフェクションを利用してNogoイソ型のAPPプロセッシングに対する活性をアッセイすることができる。

【 0 0 1 9 】

配列の簡単な説明

配列番号 1 は、BACEヌクレオチドコード配列とアミノ酸配列を示す。

配列番号 2 は、BACEのアミノ酸配列である。

配列番号 3 は、NogoBヌクレオチドコード配列とアミノ酸配列を示す。

配列番号 4 は、NogoBのアミノ酸配列である。

配列番号 5 は、BACEと結合するタンパク質を同定するアッセイにおいて同定したNogoBのアミノ酸断片である。

配列番号 6 は、BACEと結合するタンパク質を同定するアッセイにおいて同定したNogoBのアミノ酸断片である。

配列番号 7 は、BACEと結合するタンパク質を同定するアッセイにおいて同定したNogoBのアミノ酸断片である。

10

20

30

40

50

配列番号 8 は、NogoAヌクレオチドコード配列とアミノ酸配列を示す。

配列番号 9 は、NogoAのアミノ酸配列である。

配列番号 10 は、NogoCヌクレオチドコード配列とアミノ酸配列を示す。

配列番号 11 は、NogoCのアミノ酸配列である。

配列番号 12 は、BACE2ヌクレオチドコード配列とアミノ酸配列を示す。

配列番号 13 は、BACE2のアミノ酸配列である。

【0020】

発明の詳細な説明

本明細書および添付の特許請求の範囲全体を通して、表現 "comprise" に相当する「含む」「含んでなる」「からなる」、および表現 "include" に相当する「含む」、ならびにそれらの変化形（例えば、「含んでなる (comprises)」、「含んでなる (comprising) (現在分詞)」、「含む (includes)」および「含む (現在分詞) (including)」などは、包含的に解釈されるべきである。すなわち、これらの表現は、文脈が許容する場合、特定して列挙されていない他の要素または整数を包含しうることを表すものとして意図される。

10

【0021】

本発明は、Nogo活性のモジュレーターを同定する方法およびBACE活性のモジュレーターを同定する方法を提供する。モジュレーターはNogoとBACEとの間の相互作用をモジュレートすることができる。

【0022】

本発明に従って使用するNogoポリペプチドは、BACEと結合することができるポリペプチドである。NogoポリペプチドはNogoA (アクセッション番号AJ251383)、NogoB (アクセッション番号AB015639) またはNogoC (アクセッション番号AF125103) でありうる。Nogoポリペプチドは配列番号4、9もしくは11のアミノ酸配列またはそれらの機能的変異体もしくは機能的断片を含む。Nogoポリペプチドは、好ましくは配列番号4のアミノ酸配列またはそれらの機能的変異体もしくは機能的断片を含む。変異体は天然のイソ型またはスプライス変異体を含みうる。本発明に従って使用する配列番号4、9または11の変異体または断片は、BACEと結合することができる。特に好ましいNogoの変異体としては、レチキュロン (reticulon) タンパク質ファミリーの他のメンバーが挙げられる。特に好ましい配列番号4の断片および変異体は、配列番号5、6および/または7に示したアミノ酸配列からなる。

20

【0023】

本発明に従って使用するBACEポリペプチドは、配列番号1もしくは配列番号2のアミノ酸配列を有するBACE (アクセッション番号AF190725、P56817) などの天然のBACEからなるものであってもよいし、あるいはBACEの変異体または断片であって、配列番号12もしくは配列番号13のアミノ酸配列を有するBACE2 (アクセッション番号AF204944、Q9Y5Z0) などの天然のBACEであるか、または既知のBACEと相同であるかもしくは既知のBACEの所望の機能を保持する他の未同定のイソ型もしくはスプライス変異体であるものであってもよい。本発明に利用するBACEのかかる変異体または断片は、Nogoポリペプチド、特に配列番号5、6または7の配列を有するNogoポリペプチドと、結合することができるものである。好ましくは、BACEの変異体または断片は、全長NogoA、NogoBおよび/またはNogoCと結合することができる。BACEの好ましい変異体または好ましい断片はまた、アスパルチルプロテアーゼ活性部位も含んでなる。かかる好ましい変異体および断片は、-セクレターゼ切断部位を含有するタンパク質およびポリペプチドを切断する能力を保持する。好ましくは、かかる変異体および断片は、配列番号2のアミノ酸残基93~96 (DTGS) および/もしくは残基289-292 (DSGT) または配列番号13の残基109~112 (DTGS) および/もしくは300-303 (DSGT) を含む。

30

40

【0024】

BACEの変異体または断片がNogoと結合することができるかどうかを決定するために、該変異体または断片とNogoとを、BACEとNogoとの間の複合体の形成に適した条件下で、接触さ

50

せればよい。同様に、Nogoの変異体または断片がBACEと結合することができるかどうかを決定するために、該変異体もしくは断片とBACEとを、NogoとBACEとの間の複合体の形成に適した条件下で、接触させればよい。本明細書に記載したいずれかのアッセイの1つを、試験薬不在のもとで実施してこれらのタンパク質の結合能を決定することができる。

【0025】

天然のアミノ酸配列をもつタンパク質をアッセイに使用することが好ましい。好ましいタンパク質はヒトタンパク質であるが、他の哺乳動物種または他の動物種由来の相同体を使用してもよい。所与のタンパク質のいずれの対立遺伝子変異体または種相同体を使用してもよい。以下に記載のタンパク質の変異体または断片に対する言及は、NogoおよびBACEの両方についての変異体または断片に関する。本発明のアッセイに使用する本明細書に記載の全てのタンパク質について、その変異体または断片のBACEまたはNogoと結合する能力は、必要に応じて維持されることが好ましい。

10

【0026】

人工的な突然変異を生じているがBACEもしくはNogo結合活性またはその他のNogoもしくはBACE活性は保持しているポリペプチドも、本発明において使用することができる。かかる突然変異体は当技術分野で周知の技術により作製することができ、そのような技術として位置指定突然変異誘発、無作為突然変異誘発ならびに制限酵素消化およびライゲーションが挙げられる。本発明に使用されるタンパク質は、天然タンパク質に対して好ましくはほぼ65%を上回る配列同一性、より好ましくは、配列番号2もしくは13または配列番号4、9もしくは11についての少なくとも20個、好ましくは少なくとも30個、例えば少なくとも40個、少なくとも60個もしくは少なくとも100個の連続アミノ酸の領域にわたってあるいはその配列の全長にわたって少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも97%または少なくとも99%の配列同一性を、有する。アミノ酸置換は、例えば、1個、2個または3~10個、20個または30個の置換によって生じさせるものであってよい。例えば次表に従って、保存的置換を生じさせることができる。第2列の同じブロック内で、そして好ましくは第3列の同じ行内で、アミノ酸を互いに置換することができる。

20

【表1】

| | | |
|---------|-------|------|
| 脂族アミノ酸 | 非極性 | GAP |
| | | ILV |
| | 極性非荷電 | CSTM |
| | | NQ |
| | 極性荷電 | DE |
| | | KR |
| 芳香族アミノ酸 | HFVY | |

30

40

【0027】

本アッセイに使用されるそれぞれのタンパク質のタンパク質配列全体が示されてもよい。結合アッセイにおいて第2成分に対する結合能、すなわちNogoポリペプチドに対するBACEおよびBACEポリペプチドに対するNogoの結合能を保持する上記のようなタンパク質の断片および変異体も、本発明にて使用することができる。あるいは、BACEの機能を保持するBA

50

CEの変異体または断片を、BACE活性のモジュレーターを同定するアッセイに使用してもよい。配列番号2の好ましい断片は、少なくとも30個、例えば少なくとも100個、少なくとも200個、少なくとも300個、少なくとも400個または少なくとも450個のアミノ酸長であろう。配列番号4の好ましい断片は長さで、少なくとも30個、例えば少なくとも100個、少なくとも200個または少なくとも250個のアミノ酸であろう。断片は、ポリペプチドの部分を含んでもよく、例えばキメラポリペプチドであってよい。キメラタンパク質を使用してBACEまたはNogoポリペプチドの精製を容易にすることができる。例えば、BACEの内腔ドメイン(配列番号2のアミノ酸1~460)をヒトIgGとカルボキシ末端で融合すればよい。

【0028】

本明細書に使用される場合、Nogoポリペプチド(a)は、配列番号4、9もしくは11の配列を有するNogoもしくはその変異体またはそれらのいずれかの断片を意味するために使用されるが、但しその変異体または断片はBACEと結合することができるかまたはNogoと結合し得るBACEの変異体もしくは断片と結合することができるものである。

10

【0029】

本明細書に使用される場合、BACEポリペプチド(a)は、配列番号2もしくは13の配列を有するBACEもしくはその変異体またはそれらのいずれかの断片を意味するために使用されるが、但しその変異体または断片はNogoと結合することができるかまたはBACEと結合し得るNogoの変異体もしくは断片と結合することができるものである。

【0030】

本発明において使用するポリペプチドは、化学修飾されたものであってもよく、例えば翻訳後修飾を受けたものであってもよい。例えば、それらはグリコシル化されているかまたは修飾アミノ酸残基を含むものであってもよい。ポリペプチドを、例えばHA、ヒスチジン、T7、mycまたはflagタグを用いてタグ付加して、検出または精製の助けとしてもよい。BACEポリペプチド(a)とNogoポリペプチド(b)を異なるラベルによりタグ付加して、BACE/Nogo複合体の同定に役立ててもよい。

20

【0031】

アッセイ

任意の適当なアッセイフォーマットを用いてNogo活性のモジュレーター、例えばBACE/Nogo相互作用のモジュレーターを同定してもよい。

【0032】

Nogo機能のモジュレーターを同定する方法の第1ステップとして、(a)配列番号2もしくは13の配列を含んでなるBACEポリペプチド、またはNogoと結合することができるその変異体もしくはいずれかの配列の断片；(b)配列番号4、9もしくは11の配列を含んでなるNogoポリペプチド、またはBACEと結合することができるその変異体もしくはいずれかの配列の断片；および(c)試験薬を、試験薬の不在下では(a)と(b)とが結合できる条件下で、接触させる。次いで、Nogoの活性をモニターする。例えば、BACEポリペプチド(a)とNogoポリペプチド(b)との間の相互作用を分析してもよい。試験薬の存在下でのBACEポリペプチド(a)とNogoポリペプチド(b)との間の相互作用を、試験薬の不在下でのBACEポリペプチド(a)とNogoポリペプチド(b)との間の相互作用と比較し、試験薬がBACEポリペプチド(a)とNogoポリペプチド(b)との結合をモジュレートするかどうか、そしてそれにより試験薬がNogoへのBACEの結合を増強するかまたは阻害するかを決定することができる。

30

40

【0033】

試験薬を、BACEポリペプチド(a)をコードするポリヌクレオチドまたは発現ベクター、およびNogoポリペプチド(b)をコードするポリヌクレオチドまたは発現ベクターを有する細胞と接触させてもよい。場合によっては、該細胞は、ペプチドもしくはアンチセンスポリヌクレオチドである試験薬をコードするポリヌクレオチドまたは発現ベクターを有するものでありうる。通常は細胞がそのポリヌクレオチドまたはベクターの転写と翻訳を可能にすることにより、ポリペプチドが同じ細胞中で発現される。

【0034】

試験薬は、細胞を洗浄、インキュベートまたは増殖させるために使う細胞外培地に供給し

50

てもよい。試験薬は、Nogoポリペプチド(b)とBACEポリペプチド(a)との相互作用を細胞の外側から間接的に、例えばBACEまたはNogoの細胞外ドメインとの相互作用によりモジュレートするものでもよいし、または細胞外培地から細胞中に取り込まれるものでもよい。BACEポリペプチド(a)とNogoポリペプチド(b)を細胞内で同時発現させる場合、細胞は天然に両方のタンパク質を発現するものであってもよく、例えば、細胞は一次培養で増殖させたニューロン細胞であってもよいし、または細胞は両方のタンパク質を組換え的に発現するものであってもよいし、または細胞は一方のタンパク質を天然に発現し、かつ他方のタンパク質を形質転換により組換え的に発現するものであってもよい。

【0035】

細胞は、一過的にまたは安定的にトランスフェクトまたは形質転換したものであってもよい。BACEポリペプチド(a)とNogoポリペプチド(b)を、両方とも一過的に発現するものであってもよいし、または両方とも安定して発現するものであってもよいし、または一方は安定的に発現しかつ他方は一過的に発現するものであってもよい。細胞は、当技術分野で周知の方法、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈降、リポフェクションまたは熱ショックによりトランスフェクトすることができる。該タンパク質を、ヒト細胞などの哺乳類細胞または酵母もしくは細菌などの非哺乳類細胞にて発現させてもよい。細胞は培養状態であるのが好ましい。使用するのが好ましい細胞系は、HEK293、COSおよびPC12細胞が挙げられる。

【0036】

BACEポリペプチド(a)を発現する細胞、またはBACEポリペプチド(a)を発現する細胞から得られた細胞ホモジネート、細胞ライセート、膜調製物もしくはタンパク質調製物を、Nogoポリペプチド(b)を発現する細胞、またはNogoポリペプチド(b)を発現する細胞から得られた細胞ホモジネート、細胞ライセート、膜調製物もしくはタンパク質調製物と接触させてもよい。

【0037】

細胞外環境でBACEポリペプチド(a)とNogoポリペプチド(b)との結合を可能にする条件は試験薬の不在下でアッセイを実施することにより決定することができる。

【0038】

試験すべき薬剤を除外した対照アッセイと試験薬を含めたアッセイとを並行してまたは続けて実施してもよい。試験薬を使用する実験と対照実験の結果を用いて、試験薬が結合を阻害するかまたは増強するかを決定することができる。

【0039】

試験する薬剤を、他の任意の既知の相互作用するタンパク質の組み合わせを用いて試験して、その試験薬がタンパク質/タンパク質相互作用の一般的インヒビターである可能性を排除してもよい。

【0040】

アッセイに使用するBACEポリペプチド(a)が配列番号2もしくは13の変異体または断片であるか、あるいはアッセイに使用するNogoポリペプチド(b)が配列番号4、9もしくは11の変異体または断片である場合、好ましくは、最初に試験薬の不在下でアッセイを実施して、変異体または断片が、結合活性もしくはプロテアーゼ活性などのモニターしようとする活性を示すことを確実にする。

【0041】

BACEポリペプチド(a)とNogoポリペプチド(b)との相互作用を分析するには、当技術分野で公知の多くの生化学的および分子細胞生物学的プロトコルを使用することができる(例えば、Sambrookら, 1989を参照)。いくつかの特定の例を以下に概説する。

【0042】

BACE/Nogo相互作用を、結合アッセイを用いて直接的に決定することができる。例えば、放射標識したBACEポリペプチド(a)をNogoポリペプチド(b)とともに、試験薬の存在下および不在下でインキュベートし、BACEポリペプチド(a)とNogoポリペプチド(b)との結合に対する試験薬の効果をモニターすればよい。典型的には、放射標識したBACEポリペプチド(a)

)を、Nogoポリペプチド(b)を含有する細胞膜とともにインキュベートして平衡に到達させる。次いで、その膜を、非結合の放射標識したBACEポリペプチド(a)から分離し、シンチレーション液中に溶解してシンチレーション計数により放射活性含量を測定することができる。薬剤の非特異的結合も、非放射性BACEポリペプチド(a)の飽和濃度での存在下で実験を繰り返すことにより測定しうる。好ましくは、試験薬の存在下および不在下の両方で、様々な濃度の放射標識BACEポリペプチドを用いて実験を繰り返すことにより、結合曲線を構築する。

【0043】

酵母の2ハイブリッドアッセイシステムを利用して、BACE/Nogo相互作用に対する試験薬の効果をモニターすることができる。例えば、BACEポリペプチド(a)をコードするポリヌクレオチドをGAL4結合ドメインベクター(GAL4_{B_D})中にクローニングし、Nogoポリヌクレオチド(b)をGAL4活性化ドメイン融合ベクター(GAL4_{A_D})中にクローニングすればよい。次いでGAL4_{A_D}とGAL4_{B_D}ベクターを酵母中で発現させ、試験薬の存在下および不在下で得られる -ガラクトシダーゼ活性をアッセイして、Harshmanら、1998が記載した液体窒素凍結破砕系を利用し、基質o-ニトロフェノール -D-ガラクトピラノシド(ONPG)を用いて定量化できる。

10

【0044】

「プル・ダウン」アッセイシステムも使用することができる。単離されたBACEポリペプチド(a)を表面に固定し、Nogoポリペプチド(b)の該表面への結合を試験薬の存在下および不在下でモニターすればよい。アッセイはまた、Nogoポリペプチド(b)を固定し、BACEポリペプチド(a)のその固定タンパク質への結合を測定することによっても実施できる。

20

【0045】

あるいは、BACEポリペプチド(a)を、BACEポリペプチド(a)とNogoポリペプチド(b)とを同時発現する細胞の細胞抽出物から免疫沈降するか、免疫精製するかまたはアフィニティ精製してもよい。次いで共沈降/同時精製するNogoポリペプチド(b)を、例えばウェスタンブロット技術を使用するかまたは組換え発現したタンパク質を放射標識することによって検出し、そしてホスフォイメージャー(phosphorimager)またはシンチレーションカウンタを用いて定量化することができる。一般的に、試験薬を細胞または細胞増殖培地に加えた後に、細胞ライセートを調製する。かかるアッセイはまた、Nogoポリペプチド(b)を沈降させるかまたは精製し、共沈降するかまたは同時精製されるBACEポリペプチド(a)を検出することにより、実施してもよい。

30

【0046】

アッセイはまた、その他のNogo機能をモニターすることにより実施することができる。例えば、Nogoの神経突起阻害活性をモニターしてもよい。神経突起阻害活性は、後根神経節(DRG)神経突起伸長アッセイ、DRG成長円錐退縮アッセイ(growth cone collapse assay)、神経細胞系(例えば、PC12細胞)神経突起伸長アッセイ、または繊維芽細胞(NIH 3T3など)細胞進展アッセイなどの任意の適当なアッセイフォーマットを用いてモニターすることができる。例えば、BACEとNogoを発現する細胞の存在下での神経突起伸長をモニターし、試験薬の神経突起伸長を阻害または促進する能力をアッセイすることができる。試験薬の神経突起伸長に対する効果が試験薬のBACE活性またはBACE/Nogo相互作用に対する効果に起因するのかどうかを確認するために、Nogoを発現するがBACEを発現しない細胞を用いて対照アッセイを実施してもよい。通常、細胞は1以上の神経栄養因子も発現すると思われる。

40

【0047】

本発明の重要な態様は、BACE活性のモジュレーターとして作用しうる薬剤であって、特に、Nogoが関係する疾患を治療するのに有用でありうる前記薬剤を同定するスクリーニング方法における、BACEポリペプチド(a)の使用である。任意の適当な方式をアッセイに用いて、BACE活性のモジュレーターを同定することができる。一般的に言えば、かかるスクリーニング方法は、BACEポリペプチド(a)と試験薬とを接触させ、次いで活性を測定することを伴う。例えば、BACE活性をモニターするステップは、例えば -セクレターゼ切断部

50

位 (SEVKM/DAEFRまたはSEVNL/DAEFR) を有するペプチドの切断によるBACEプロテアーゼ活性の評価、またはBACEとの結合が他のタンパク質に与える効果の評価を含んでもよい。例えば、該アッセイは、Vassarら (1999) Science 286, 735-741, Hussainら (1999) Molecular and cellular Neuroscience 14,419-427, Sinhaら (1999) Nature 402,537-540またはYanら (1999) Nature 402,533-537に記載のAPPプロセシングの測定を伴う。

【0048】

モジュレーター活性は、本発明のBACEポリペプチド(a)を発現する細胞を、研究対象の薬剤と接触させ、薬剤のBACE活性に対する効果をモニターして決定することができる。このポリペプチドを発現する細胞はin vitroまたはin vivoの状態であってよい。本発明のポリペプチドは天然にまたは組換え的に発現されてもよい。好ましくは、アッセイはin vitroで組換えポリペプチドを発現する細胞を用いて実施する。

【0049】

候補モジュレーター

NogoもしくはBACE機能のモジュレーターは、NogoもしくはBACEと直接結合することにより効果を及ぼすものでもよいし、あるいは存在するBACE/Nogo相互作用を妨げるかまたはNogoもしくはBACEが媒介する活性を阻害する上流効果を有するものでもよい。

【0050】

モジュレーターはNogoとBACEとの相互作用を直接阻害してもよいしまたはBACEとリガンドとの間の相互作用を阻害してもよい。試験薬は、NogoまたはBACEリガンドと結合することはできるが何らかの機能的活性を欠くBACEの断片を含むものでもよい。あるいは、試験薬は、BACEと結合することができるが何らかの機能的活性を欠くNogoの断片を含むものでもよい。

【0051】

BACEもしくはNogoと特異的に結合する抗体もしくは抗体フラグメント、またはこれらのタンパク質と結合することができる化学化合物も候補化合物である。抗体または他の化合物が或るタンパク質と「特異的に結合する」というのは、それにとって特異的である前記タンパク質と高いアフィニティで結合するがその他のタンパク質とは低いアフィニティでしか結合しないことを意味する。抗体の特異的結合能を測定するための競合的結合アッセイまたは免疫放射線測定アッセイについての様々なプロトコルが当技術分野では周知である (例えば、Maddoxら、1993を参照)。かかるイムノアッセイは、通常は、「特異的タンパク質」とその抗体との間の複合体形成、およびその複合体形成の測定を伴う。

【0052】

さらに、コンビナトリアルライブラリー、規定された化学的実体、ペプチドおよびペプチドミメチックス、オリゴヌクレオチド、ならびにディスプレイライブラリー (例えば、ファージディスプレイライブラリー) などの天然産物ライブラリーを試験することもできる。試験薬は化学化合物であってもよい。試験薬のバッチ、例えば、1反応当たり10種類の薬剤を最初のスクリーニングに使用し、そして阻害を示すそれらバッチの薬剤を個々に試験してもよい。

【0053】

モジュレーター

Nogo活性のモジュレーターは、上記のアッセイにおいてNogoポリペプチド(b)とBACEポリペプチド(a)との結合において計測可能な低下もしくは増加をもたらすか、またはNogo活性もしくはBACE活性に対して影響を与える薬剤である。

【0054】

好ましいインヒビターは、 $1\mu\text{g ml}^{-1}$ 、 $10\mu\text{g ml}^{-1}$ 、 $100\mu\text{g ml}^{-1}$ 、 $500\mu\text{g ml}^{-1}$ 、 1mg ml^{-1} 、 10mg ml^{-1} または 100mg ml^{-1} のインヒビター濃度において、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも99%、結合を阻害するインヒビターである。

【0055】

10

20

30

40

50

好ましいアクチベーターは、 $1\mu\text{g ml}^{-1}$ 、 $10\mu\text{g ml}^{-1}$ 、 $100\mu\text{g ml}^{-1}$ 、 $500\mu\text{g ml}^{-1}$ 、 1mg ml^{-1} 、 10mg ml^{-1} または 100mg ml^{-1} のアクチベーター濃度において、少なくとも10%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも100%、少なくとも200%、少なくとも500%または少なくとも1000%、結合を促進するアクチベーターである。

【0056】

阻害パーセントまたは促進パーセントは、試験薬の存在下および不在下でのアッセイを比較したときの発現/活性の減少率または増加率を表す。阻害パーセントまたは促進パーセントの上記のような程度とインヒビターまたはアクチベーターの濃度とを任意に組み合わせることにより本発明のインヒビターまたはアクチベーターを規定してもよく、より低い濃度で阻害または促進がより大きくなることが好ましい。

10

【0057】

上記のようなアッセイにおいて活性を示す試験薬を、*in vivo*系、動物モデルにおいて試験することができる。候補インヒビターのもつ、Nogoが媒介するシグナル伝達を減少する能力について、例えば軸索成長に対する効果をモニターすることにより、試験してもよい。

【0058】

候補アクチベーターを、Nogoが媒介するシグナル伝達を増加する能力について試験してもよい。最終的には、かかる薬剤を、標的病状の動物モデルにおいて試験する。

【0059】

治療用途

20

本発明の方法により同定される、BACEとNogoとの間の相互作用のモジュレーターまたはNogo活性もしくはBACE活性のモジュレーターを、Nogo活性またはBACE活性のモジュレーションに反応性の障害の治療または予防に使用することができる。

【0060】

特に、BACE活性および/またはNogo活性のモジュレーションに反応性の神経障害を治療することができる。NogoまたはBACE活性のモジュレーターを使用して、かかる障害に苦しむ患者の症状を軽減するかまたは状態を改善することができる。

【0061】

NogoまたはBACE活性のモジュレーターは軸索再生に有用でありうる。これは、神経系、そして特に脊髄、脳（例えば脳卒中後の）、および末梢神経系に損傷を受けている患者を治療するのに有用でありうる。かかるモジュレーターは典型的には、例えばNogoの軸索再生に対する阻害効果を阻害することによりNogo活性を阻害する。

30

【0062】

NogoまたはBACE活性のモジュレーターは、新生物疾患、過増殖障害ならびに増殖不全障害を治療または予防するのに有用でありうる。特に、固形腫瘍、癌腫、グリア芽細胞腫、稀突起膠細胞腫、神経芽細胞腫および網膜芽細胞腫などの神経系の新生物疾患を、NogoまたはBACE活性のモジュレーターを用いて治療または予防することができる。NogoまたはBACE機能のモジュレーターを用いて治療しうる過増殖障害および増殖不全障害としては、肝硬変、乾癬、良性腫瘍、ケロイド形成、線維嚢胞症および組織肥大が挙げられる。かかるモジュレーターは、典型的には、例えば軸索再生に対するNogoの阻害効果を増強することにより、Nogo活性を増強または促進しうる。

40

【0063】

NogoまたはBACE活性のモジュレーターは、癌の転移または拡散を防止するのに有用である。例えば、Nogoの阻害活性を増強する薬剤は、肺、腎臓、肝臓または筋肉などの身体の他の器官へのCNS癌の拡散を予防するために有用でありうる。

【0064】

BACEポリペプチドおよびBACEポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもかかる障害の治療または予防に使用することができる。

【0065】

従って、本発明は、BACE、またはNogoと結合することができるその変異体、またはNogoと

50

結合することができるそれらのいずれかの断片をコードするポリヌクレオチドの、Nogo活性のモジュレーションに反応性の障害の治療法にて使用するための医薬品の製造における使用であって、ここで前記ポリヌクレオチドは、

- (a) 配列番号1もしくは12の配列；または
 - (b) 配列番号1もしくは12の相補体とハイブリダイズする配列；または
 - (c) (a)もしくは(b)に規定した配列について遺伝コードの結果として縮重している配列；または
 - (d) (a)、(b)もしくは(c)に規定したポリヌクレオチドと相補的である配列；
- を含んでなる、前記使用を提供する。

【0066】

配列番号1または12のコード配列の相補体とハイブリダイズする配列を含んでなるポリヌクレオチドは、バックグラウンドを有意に超えるレベルでハイブリダイズすることができる。バックグラウンドのハイブリダイゼーションは、例えば、cDNAライブラリー中に存在する他のcDNAが原因で起こりうる。本発明のポリヌクレオチドと配列番号1または12のコード配列の相補体との間の相互作用により発生するシグナルレベルは、典型的には、他のポリヌクレオチドと配列番号1または12のコード配列との間の相互作用の少なくとも10倍、好ましくは少なくとも100倍高い。その相互作用の強度は例えば、プローブを、例えば³²Pを用いて放射標識して測定することができる。選択的ハイブリダイゼーションは、典型的には、低ストリンジェンシー（0.3M 塩化ナトリウムおよび0.03M クエン酸ナトリウム、約40）、中度のストリンジェンシー（例えば、0.3M 塩化ナトリウムおよび0.03M クエン酸ナトリウム、約50）または高ストリンジェンシー（例えば、0.03M 塩化ナトリウムおよび0.003M クエン酸ナトリウム、約60）の条件を用いて達成することができる。しかし、かかるハイブリダイゼーションは当技術分野で公知のいずれの適当な条件で実施してもよい（Sambrookら、1989を参照）。例えば、高ストリンジェンシーが必要な場合には、適当な条件は、60にて0.2×SSCが挙げられる。低ストリンジェンシーが必要な場合には、適当な条件は、60にて2×SSCが挙げられる。

10

20

30

40

50

【0067】

配列番号1もしくは12のDNAコード配列の相補体に選択的にハイブリダイズすることができるヌクレオチド配列は一般的に、配列番号1のコード配列に対して、配列番号1もしくは12における少なくとも20個、好ましくは少なくとも30個、例えば少なくとも40個、少なくとも60個、さらに好ましくは少なくとも100個の連続ヌクレオチドの領域にわたって、または最も好ましくは配列番号1もしくは12の全長領域にわたって、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%または少なくとも99%の配列同一性を有する。核酸およびタンパク質の相同性を評価する方法は当技術分野では周知である。例えば、UWCGCパッケージは、相同性を計算するのに使用しうるBESTFITプログラムを提供する（Devereuxら、1984）。同様に、PILEUPおよびBLASTアルゴリズムを利用して配列を整列させることができる（例えば、Altschul、1993およびAltschulら、1990に記載）。かかるプログラムは多数の異なる設定が可能である。本発明に従って、デフォルトの設定を使用することができる。

【0068】

上記の配列同一性の程度と最小サイズとの任意の組み合わせを用いてBACEポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを規定してもよく、よりストリンジェントな組み合わせ（すなわち、より長い長さにわたるより高い配列同一性）を用いることが好ましい。従って、例えば、25ヌクレオチドにわたって、好ましくは30ヌクレオチドにわたって、少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌクレオチドは本発明の一態様を形成し、同様に40ヌクレオチドにわたって、少なくとも95%の配列同一性を有するポリヌクレオチドは本発明の一態様を形成する。

【0069】

配列番号1もしくは12のコード配列をヌクレオチド置換、例えば1個、2個または3~10個、25個、50個または100個の置換に由来するヌクレオチド置換より、改変してもよい。

配列番号 2 もしくは 1 3 のポリヌクレオチドを、その代わりにまたは追加的に、1 個以上の挿入および/または欠失および/または一端もしくは両端の伸長により、改変することができる。改変したポリヌクレオチドは一般的に、Nogo と結合することができるタンパク質をコードする。典型的には改変したポリペプチドによりコードされるタンパク質はアスパルチルプロテアーゼ活性を有する。縮重置換を生じさせてもよいし、および/または改変した配列が翻訳されたときに、例えば、上記の表に示したような保存的アミノ酸置換をもたらす置換を生じさせてもよい。

【0070】

ポリヌクレオチドは DNA または RNA を含むうる。それらはまた、合成ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドであってもよい。ポリヌクレオチドに対する様々な異なるタイプの修飾が当技術分野では周知である。これらとしては、メチルホスホネート主鎖およびホスホロチオエート主鎖、分子の 3' 末端および/または 5' 末端におけるアクリジンまたはポリリジン鎖の付加が挙げられる。本発明の目的のために、本明細書に記載のポリヌクレオチドは当技術分野で利用しうるいずれの方法により修飾してもよいことは理解されるべきである。かかる修飾は、本発明のポリヌクレオチドの *in vivo* 活性または寿命を増強するために実施することができる。

10

【0071】

BACE ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、組換え法により、合成により、または当業者が利用しうる任意の方法により製造すればよい。それらはまた、標準技術によりクローニングしてもよい。ポリヌクレオチドは、典型的には単離されたおよび/または精製された形態で提供される。

20

【0072】

一般的に、本明細書に記載の技術は当技術分野で周知であるが、特に Sambrook ら, 1989, *Molecular Cloning: a laboratory manual* を参照することができる。

【0073】

またポリヌクレオチドは本発明のアッセイにおける不可欠な成分であり、本発明で使用するタンパク質または試験薬を同定するためのプローブ(またはプローブを設計するためのテンプレート)となりうる。本発明のヌクレオチドは組換えタンパク質合成に関与するとともに、それ自体が治療薬として遺伝子治療技術に利用されうる。アンチセンス配列も、例えば BACE の発現のダウンレギュレーションのための戦略として、遺伝子治療に利用しうる。

30

【0074】

本発明に使用するポリヌクレオチドは、発現ベクター中に挿入してもよい。かかる発現ベクターは分子生物学の技術により慣用法により構築され、例えば、プラスミド DNA、ならびにタンパク質発現を可能にするために必要でありかつ正しい方向に配置された、適当なイニシエーター、プロモーター、エンハンサーおよびポリアデニル化シグナルなどの他のエレメントの使用を伴う。その他の適当なベクターは、当業者には明らかであろう。この点についてのさらなる例は、Sambrook らを参照すること。

【0075】

また、ポリヌクレオチドを上記ベクター中にアンチセンス方向に挿入して、アンチセンス RNA の産生を提供することもできる。アンチセンス RNA または他のアンチセンスポリヌクレオチドはまた、合成法によって作ることもできる。かかるアンチセンスポリヌクレオチドは、本発明のアッセイにおいて試験化合物として使用することができ、または Nogo 活性のモジュレーションに反応性の障害の治療方法において、特に脊髄または末梢神経系の損傷の治療用に、有用でありうる。

40

【0076】

適当なウイルスベクターの例としては、単純ヘルペスウイルスベクターおよびレトロウイルスがあり、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルスおよび HPV ウイルス (HPV-16 または HPV-18 など) が挙げられる。当業者にはこれらのウイルスを使用する遺伝子導入技術はよく知られている。例えば、レトロウイルスベクターを利用して、アンチセ

50

ンスRNAを生じるポリヌクレオチドを宿主ゲノム中に安定的に組み込むことができる。対照的に、複製欠陥アデノウイルスベクターはエピソームのまま保持され、従って一過性発現を可能にする。

【0077】

上記の病的状態のいずれかを予防または治療するのに使用する薬剤の製剤化は、その特定の薬剤の性質、製薬または獣医学用途のいずれを意図するかなどの要因に依存しうる。典型的には、モジュレーターは製薬上許容される担体または希釈剤とともに製剤化されて使用される。例えば、局所、非経口、静脈内、筋肉内、皮下、眼内、経皮または経口投与用に製剤化することができる。医師はそれぞれの特定の患者に対して必要な投与経路を決定しうるであろう。製薬担体または希釈剤は例えば、等張溶液であってもよい。

10

【0078】

薬剤の用量は、様々なパラメーター、特に使用する薬剤；治療する患者の年齢、体重および状態；投与経路；ならびに必要な投与計画に従って決定することができる。さらに、医師は必要な投与経路および任意の特定の患者に対する用量を決定しうるであろう。

【0079】

モジュレーターは特定の部位へ、さもなくば脳細胞を標的として投与されるべきであろう。例えば、モジュレーターをニューロンへ送達してもよい。これは、例えば、単純ヘルペスウイルスなどのウイルス株による送達によって達成することができる。本発明のポリヌクレオチドを含むウイルスベクターは先に記載した。ウイルスベクターの送達方法は、例えば、本発明のポリヌクレオチドを投与する場合に使用しうる。ベクターはさらに、ある特定のニューロンに特異的であるプロモーターまたは他の調節配列を含んでもよい。

20

【0080】

本発明のポリヌクレオチドとベクターは、裸の核酸構築物として直接投与することができる。哺乳類細胞による裸の核酸構築物の取込みは、複数の既知のトランスフェクション技術により増強され、例えば、トランスフェクション剤の使用を伴う技術が挙げられる。これらの薬剤の例としては、カチオン剤（例えばリン酸カルシウムおよびDEAE-デキストラン）およびリポフェクタント（例えばlipofectamTMおよびtransfectamTM）が挙げられる。

【0081】

典型的には、核酸構築物をトランスフェクション剤と混合して組成物を製造する。好ましくは、裸の核酸構築物、ポリヌクレオチドを含むウイルスベクターまたは組成物を製薬上許容される担体または希釈剤と混合して、医薬組成物を製造する。適当な担体および希釈剤としては、等張生理食塩水、例えばリン酸緩衝化生理食塩水が挙げられる。組成物は、非経口、筋肉内、静脈内、皮下、または経皮投与用に製剤化することができる。

30

【0082】

医薬組成物は、本発明のポリヌクレオチド、遺伝子治療用のウイルスベクターが適切な領域で細胞中に取り込まれる方法で投与する。本発明のポリヌクレオチドをウイルスベクターにより細胞へ送達するとき、投与されるウイルスの量は、アデノウイルスベクターについては、 $10^6 \sim 10^{10}$ pfu、好ましくは $10^7 \sim 10^9$ pfuの範囲、さらに好ましくは約 10^8 pfuである。注射するとき、典型的には、製薬上許容される適当な担体または希釈剤中に含有させたウイルスを1~2ml投与する。本発明のポリヌクレオチドを裸の核酸として投与するとき、投与する核酸の量は典型的には $1 \mu\text{g} \sim 10\text{mg}$ の範囲である。

40

【0083】

産物を生じるポリヌクレオチドが誘導プロモーターの制御下にある場合、治療期間中だけ遺伝子発現を誘導するのが必要である場合がある。病的状態が治療されてしまったら、インデューサーを除去し、本発明のポリペプチドの発現を終了させる。これは明らかに臨床上有利である。かかる系は、例えば、抗生物質テトラサイクリンを投与し、そのtetリプレッサー/VP16融合タンパク質に対する効果によって遺伝子発現を活性化する系が挙げられる。

【0084】

50

組織特異的プロモーターの使用は、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチドおよびベクターを用いる疾患の治療の助けとなるであろう。関係する罹患した細胞型のみにおいて治療遺伝子を発現させることができることは、かかる遺伝子が他の細胞型にて発現されると有毒である場合には特に、有利であろう。

【0085】

上記の投与経路および用量は手引きとしてだけ意図されるものであり、熟達した医師であれば、任意の特定の患者およびその状態に対する最適な投与経路および用量を容易に決定しうるであろう。次の実施例は本発明を説明するものである。

【実施例】

【0086】

10

実施例 1

標的タンパク質BACE1を、プライマー：AGGAAGTGGAGTGGCCACCATGGCCCAAGCCCTGCCCおよびGTAGGGGTAATTGGCCTTCAGCAGGGAGATGTCATCを用いてPCRにより増幅した。

【0087】

PCR産物を発現ベクター中にクローニングして、8残基ヒスチジンタグをC末端にイン・フレームで挿入した。この構築物をHEK293細胞中にトランスフェクトし、発現構築物について選択する条件下でその細胞を増殖させた。

【0088】

代表的な実験において、ほぼ 10^8 個のトランスフェクトした細胞由来の膜濃縮画分65mgから、BACEをアフィニティ精製した。1% CHAPS0中に溶解した膜タンパク質を500 μ l Ni-NTA樹脂とともにインキュベートし、150mMイミダゾールを用いて溶出した。得られる溶出液をセファロース (Pierce) を用いて1時間、前清澄化した。セファロースを捨てた後、溶出液を、セファロース (Pierceアミノリンクプラス (aminolink plus)) と共有結合した抗His抗体 (Serotec) とともに4 \times に一夜インキュベートした。最後に、免疫沈降させたタンパク質をサンプルバッファー中に再懸濁し、4~12%ビス-トリスゲル上にて還元条件下で分離し、コロイド状クーマシーブルーを用いて染色した。タグ付加細胞系に特異的なバンドを切り出し、トリプシンを用いてゲル中で消化した。トリプシン消化した全ペプチドをLC/MS/MSにかけて、非重複タンパク質データベースをサーチすることによりタンパク質を同定した。

20

【0089】

代表的実験において同定したタンパク質を以下にまとめた。

30

【0090】

同定されたNogoB (ASY) ペプチド：

1 MEDLDQSPLV SSSDSPRPQ PAFKYQFVRE PEDEEEEEEE EEEDEDEDLE
51 ELEVLERKPA AGLSAAPVPT APAAGAPLMD FGNDVFPAP RGPLPAAPPV
101 APERQPCWDP SPVSSTVPAP SPLSAAVSP SKLPQDDEPP ARPPPPPPAS
151 VSPQAEPVWT PPAPAPAAPP STPAAPKRRG SSGSVVVDLL YWRDIKKTGV
201 VFGASLFLLL SLTVFSIVSV TAYIALALLS VTISFRIYKG VIQAIQKSDE
251 GHPFRAYLES EVAISEELVQ KYSNSALGHV NCTIKELRRL FLVDDLVDLSL
301 KFAVLMWVFT YVGALFNGLT LLILALISLF SVPVIYERHQ AQIDHYLGLA
351 NKNVKDAMAK IQAKIPGLKR KAE

40

下線を引いたペプチドは、NogoBを他のNogoイソ型から識別するのに十分なペプチドである。

【0091】

実施例 2：PC12細胞の分化と神経突起伸長の測定

PC12細胞を、6ウェルプレートを用いて1ウェル当たり 1×10^5 細胞にて1.5mlの完全DMEMにまく。まいた細胞を37 $^{\circ}$ Cにて5% CO₂中で一夜インキュベートしてそれらを付着させる。細胞を、予熱した完全DMEMを用いて洗浄する。1.5mlの低血清DMEM+/-NGF+/-Bace+/-Nogo+/-試験薬を加える。0、0.1、1、10、50および100ng/mlのBace、NogoおよびNGFの濃度範囲を試験する。試験薬を0、0.001、0.01、0.1、1および10nMの濃度で異なるウェルに加える

50

。次いで細胞を48時間、37℃にて5% CO₂中でインキュベートしてそれらを付着させる。

【0092】

48時間後、細胞はほぼ50%コンフルエントになるので、神経突起伸長を測定するために4%パラホルムアルデヒドリン酸中で固定する。酸フクシン染色液をPBS中に希釈し(2倍希釈)、混合し、そしてシリンジを通してろ過滅菌する。希釈した染色液500μlを各ウェルに加える。細胞を染色液中で2分間室温にてインキュベートし、そしてPBS(1ml)中で4回洗浄する。フクシンは細胞体と神経突起を赤く染色する。細胞体当たりの神経突起数と長さを倒立顕微鏡上で適当な画像解析およびソフトウェアを用いて測定する。

【0093】

実施例3

スウェーデン(Swedish)突然変異を含有するヒトAPP構築物を過剰発現する成体トランスジェニックマウス(呼称Tas10)由来の切片を、様々な抗体マーカーを用いて染色した。これらは、アミロイドプラークおよびそれに結合しているかまたはその周囲にあるタンパク質の検出が可能になるように選択した。

【0094】

代表的実験において、NogoAタンパク質に対するモノクローナル抗体(クローン6D5)は、切片(例えばTas10動物4)を、全てではないにしてもほとんどのプラーク様構造を取り囲む環状パターンに染色することを見出した(図1A)。

【0095】

これが実際にプラークに関連する染色であることを確認するために、アミロイドペプチドに対するモノクローナル抗体(クローン1E8)と、NogoAに対するアフィニティ精製したポリクローナル抗体(Alpha Diagnostics)とを一緒に用いて、さらなる切片を二重染色した。これらの切片において、濃いピンク色の産物が、アミロイドタンパク質が標識されているプラークに析出し、これらは、NogoAタンパク質発現の部位に対応する暗青色/紫色の産物に取り囲まれていた。これらの観察は、新しいアミロイド沈着領域におけるプラーク縁部の周囲にNogoAが過剰発現するという本発明者らの先の知見を立証するものであった(図1B)。

【0096】

神経フィラメント(Chemicon)、GFAP(Sigma)およびリン酸化タウ(phospho-tau)(クローンAT8)を含むさらなる様々な抗体マーカーはどれも、NogoA抗体を用いて観察したのと類似のパターンを生じることにはなかった。Asp2/BACEに対するモノクローナル抗体(クローン9B21)を用いて同じ動物由来の切片を染色すると、NogoA染色に非常によく似た環状染色パターンを生じることが見出された(図1C)。次の連続切片および二重染色での実験において、NogoAとAsp2/BACEタンパク質は顕著に密接した関連を示すことが明らかになった(図1E)。観察し得た唯一の違いは、NogoA染色が、この領域のニューロンに特徴的な形態である分離した細胞構造を標識していると思われるAsp2/BACE染色よりも、さらに広がって分布することであった(図1D)。

【0097】

NogoA発現上昇と病理進行との相関のさらなる確証を、より低いプラーク量を示すトランスジェニック動物由来の切片の染色パターンにおいて見出した。これらの切片では、より少なくかつより小さいプラークが見られ、これらはより強度の弱いNogoA染色により取り囲まれていた(図1E)。

【0098】

実施例4

プラークを囲む沈着物中に見出されるNogoAの起源を決定するため、アミロイドペプチド誘導毒性に感受性のあることが知られる培養ニューロン(この事例では胚性海馬ニューロン)を研究した。他のタイプの培養ニューロンについても類似の結果が得られる。

【0099】

培養海馬ニューロンを固定してNogoA特異的モノクローナル抗体を用いて染色した。細胞は、顕著な細胞質と軸索の染色を、一部の明らかな細胞表面クラスターとともに示した。

10

20

30

40

50

比較的成熟した培養物において、NogoAはまた、シナプスに相当する神経突起に沿った軸索瘤に、ある程度の集積を示すことも示される(図2)。かかる培養物をAbeta1-42ペプチドにより処理することにより、それらのNogoA発現に対する効果を確認することができ、またアルツハイマー病などの疾患(限定されるものでないが)の進行および病理を改変する手段としての、これらの応答を改変する分子を同定する系としても利用することができる。

【0100】

実施例 5

スウェーデン(Swedish)突然変異は、この突然変異を有する個体がアルツハイマー病を早期に発症しやすくする。スウェーデン(Swedish)突然変異を有するヒトAPP遺伝子を安定的に過剰発現するヒト神経芽細胞腫細胞(SHSY5Y)は、APPから毒性Abetaペプチド断片へのプロセッシングを改変する薬剤の効果を研究する上で有用な系を提供することができる。これらの細胞は通常、容易に検出可能なレベルのAbetaペプチドを培養培地中に分泌する。Nogo-A、Nogo-BもしくはNogo-Cの単独でのトランスフェクション、またはそれらをBACE/Asp2と組み合わせたトランスフェクションを用いて、これらのタンパク質の過剰発現がAPPに与える効果を確認することができる。Nogoイソ型によるAbeta形成の抑制により、Tas10マウスにおいてプラーク周囲に見られるNogoAの過剰発現がおそらく補償的/保護的機構を意味することが示唆された一方で、発現の上昇が特にアルツハイマー病、一般的には神経変性疾患の病理の一因となることも示唆された。従って、NogoとBACE/Asp2との相互作用を変化させる分子のスクリーニングは、必要に応じて結合のアゴニストまたはアンタゴニストを同定するように構成できるであろう。

10

20

【0101】

Nogoイソ型をコードするcDNAを、培養SHSY5Y-APP_{swe}細胞中にトランスフェクトし、固定した細胞中で発現されたタンパク質を免疫組織化学を用いて検出した。Asp2はc末端mycエピトープ(図3A左パネル)を用いて検出したのに対して、NogoA(図3A右パネル)およびBイソ型は、図面の説明に記載のように、イソ型特異的ウサギポリクローナル抗体(それぞれ67および66と名付けた)またはモノクローナル抗体(抗Nogo-A 6D5)を用いて検出した。これらの実験は、これらのタンパク質をこの細胞バックグラウンドで過剰発現させることが可能であり、それをNogoに影響されるAPPプロセッシングのモジュレーターについてのアッセイの基礎として利用しうることを立証する。さらに、二重トランスフェクトした細胞において、顕微鏡試験により細胞内のトランスフェクトしたタンパク質の一部の共局在を実証することができた。これらのデータは、Nogo-A(図3A)とNogo-B(図3B)の両方が、適当な細胞バックグラウンドにおいてAsp2/BACEと相互作用しうることを示し、しかもその相互作用がプラーク形成中のAPPのプロセッシングを変化させる原因に十分なりうることを示唆する。

30

【0102】

実施例 6

ヒト神経芽細胞腫の細胞系SHSY5Y-APP_{swedish}を、試験構築物をコードするcDNAを用いてトランスフェクトし、そしてAPPプロセッシングおよびAbetaの培地中への分泌に与える効果をELISAアッセイを用いて測定することができる。低細胞密度で実施した実験において、本発明者らは、Asp2/BACE構築物のトランスフェクション後に、Abeta x-40およびx-42の産生の増強を検出することができた(図4A)。NogoAまたはNogoBを発現する構築物を用いて並行的にトランスフェクトした細胞は、Abeta産生において同様の増加をもたらさないことが見出され、このことはそれら単独ではアミロイド形成を増強するには十分でないことを示唆する。

40

【0103】

さらなる実験において、3つのNogoイソ型全てとAsp2/BACEとの同時発現の効果を試験した。ならし培地の分析は、Nogoイソ型が検出可能なAbetaペプチドのレベルを顕著に低下させるようであることを示す(図4B)。観察されたAbetaレベルの変化は、Asp2/BACEとNogoとの直接的な細胞内相互作用(これは、細胞ライセートからのこれらのタンパク質の免

50

疫共沈降により見出された)によるのであろう。このことは、トランスフェクトされた細胞中のそれらの共局在により支持されるが、すなわちモジュレーションは細胞内局在のレベルで生じていると思われる。全てのNogoイソ型はC末端ER保持モチーフを有しているので、Nogo発現の増加に伴うAsp2/BACE活性の観察された変化は、正常なAPPプロセシングの部位から離れた小胞体内でより多くのAsp2/BACEが保持される結果を引き起したものである。

【図面の簡単な説明】

【0104】

【図1A】Nogo-Aモノクローナル抗体(6D5)を用いて染色したTas10(マウス番号4)の切片。

10

【図1B】左パネルは抗Nogo-Aポリクローナル抗体を用いて染色した切片を、異なる2つの倍率で示す。

【図1C】これらのTas10トランスジェニックマウスにおいて、Asp2/BACE特異的モノクローナル抗体(9B21)を用いた同様の環状染色。

【図1D】モノクローナル9B21を用いたTas10トランスジェニックマウス脳切片のAsp2/BACE染色を示す。

【図1E】Nogo-A(左パネル)とAsp2/BACE(右パネル)に対して染色したマウス番号3(18月齢Tas10トランスジェニック)からの連続切片。

【図2】胚性海馬ニューロンにおける細胞質全体のNogo-A発現および若干の表面局在を示す。

20

【図3A】一過性トランスフェクションにより、高レベルのAsp2/BACEまたはNogo-Aタンパク質を産生するSHSY5Y-APPswe細胞を示す。

【図3B】Asp2/BACE-mycおよびNogo-Aを同時トランスフェクションしたSHSY5Y細胞を示す。

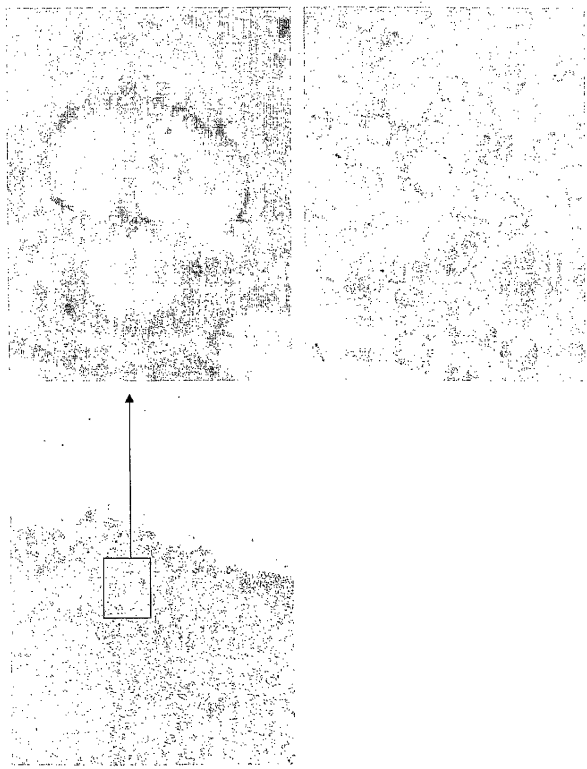
【図3C】Asp2/BACE-mycおよびNogo-Bを同時トランスフェクションしたSHSY5Y細胞を示す。

【図4A】SHSY5Y-APPswe細胞におけるNogoイソ型過剰発現の、Abeta産生に対する効果を示す。

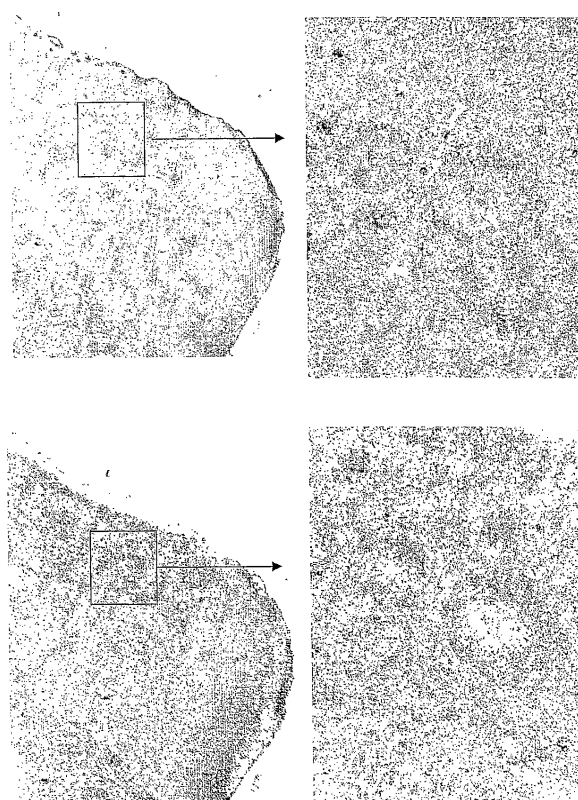
【図4B】Nogoイソ型とAsp2/BACEとを同時発現させたSHSY5Y-APPswe細胞における、Ab産生のモジュレーションを示す。

30

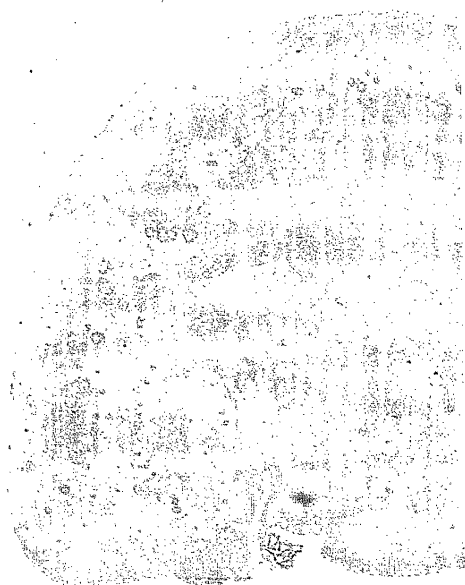
【 図 1 A 】



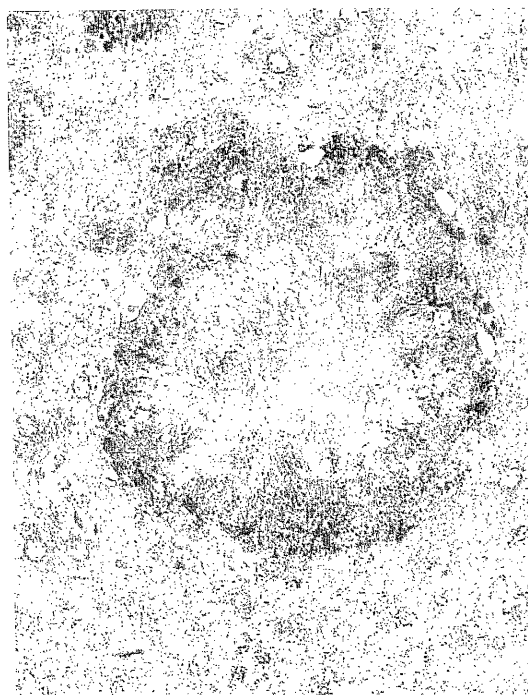
【 図 1 B 】



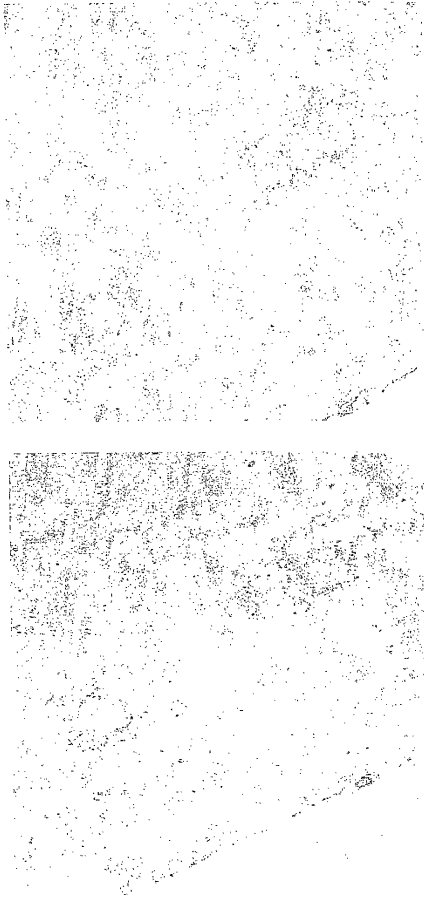
【 図 1 C 】



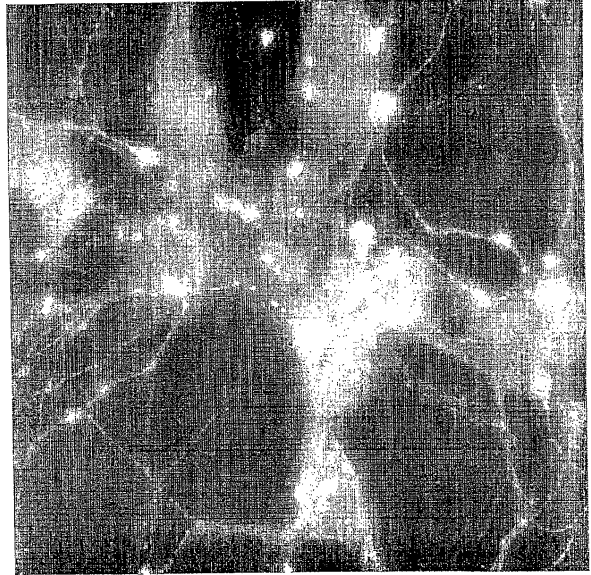
【 図 1 D 】



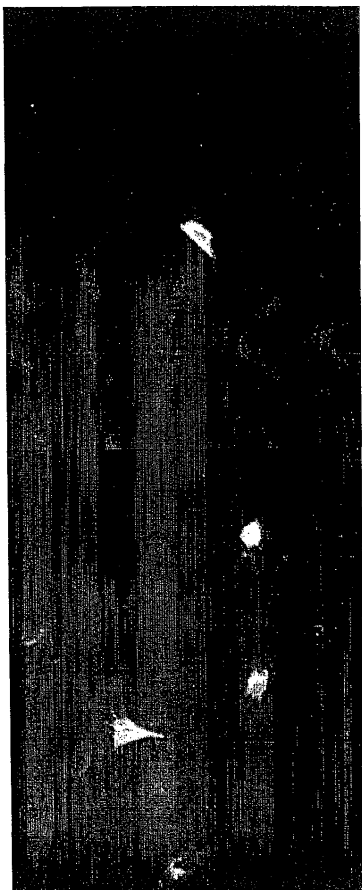
【 図 1 E 】



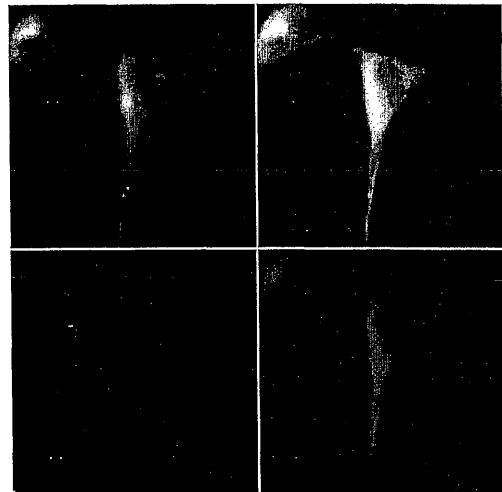
【 図 2 】



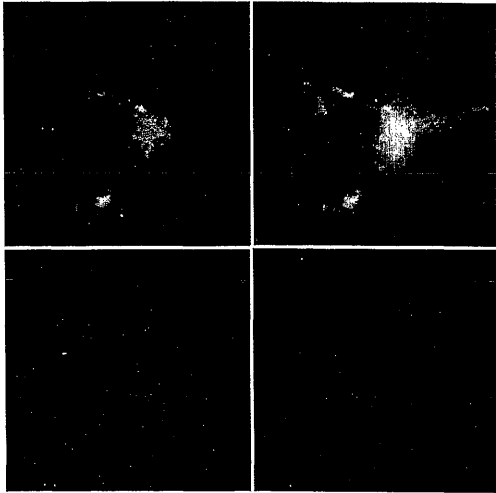
【 図 3 A 】



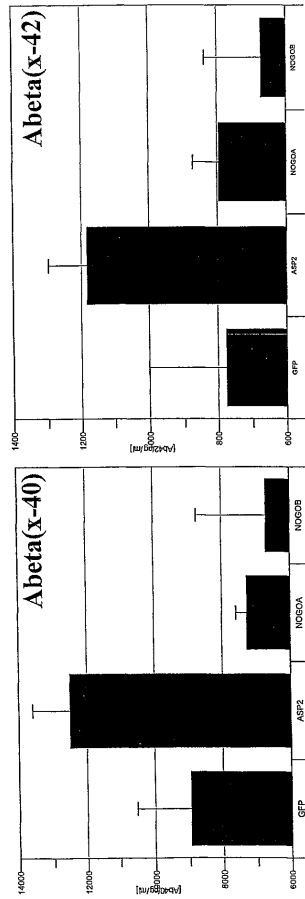
【 図 3 B 】



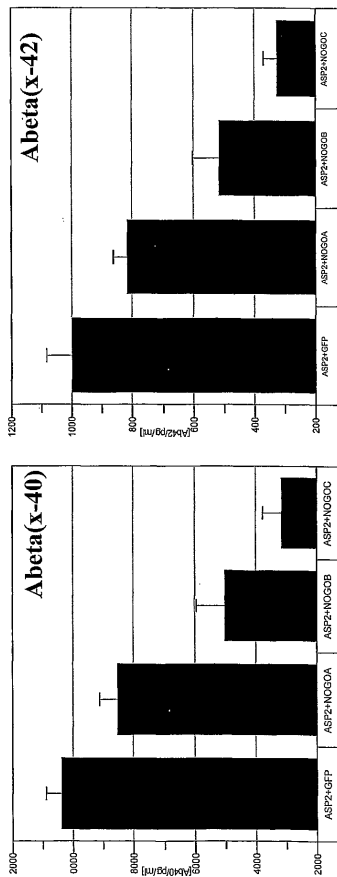
【 図 3 C 】



【 図 4 A 】



【 図 4 B 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
25 July 2002 (25.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/057483 A2

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/00
- (21) International Application Number: PCT/GB02/00228
- (22) International Filing Date: 18 January 2002 (18.01.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 0101312.7 18 January 2001 (18.01.2001) GB
- (71) Applicants (for all designated States except US): **GLAXO GROUP LIMITED** [GB/GB]; Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford, Middlesex UB6 0NN (GB); **SMITHKLINE BEECHAM PLC** [GB/GB]; New Horizons Court, Brentford, Middlesex TW8 9EP (GB).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): **BLACKSTOCK, Walter, Philip** [GB/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY (GB); **HALE, Richard, Stephen** [GB/GB]; c/o GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY (GB); **PRINJHA, Rabinder** [GB/GB]; GlaxoSmithKline, New Frontiers Science Park, Third Avenue, Harlow, Essex CM19 5AW (GB); **ROWLEY, Adele** [GB/GB]; c/o GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY (GB).
- (74) Agent: **GIDDINGS, Peter, John**; GlaxoSmithKline, Corporate Intellectual Property, Two New Horizons Court, Brentford, Middlesex TW8 9EP (GB).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).
- Published:
without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/057483 A2

(54) Title: NOVEL ASSAY

(57) Abstract: A method of identifying a modulator Nogo function, the method comprising: (i) providing (a) a BACE polypeptide; (b) a Nogo polypeptide; (c) a test agent under conditions that would permit binding of a BACE polypeptide (a) to a Nogo polypeptide (b) in the absence of the test agent (c) wherein said BACE polypeptide (a) is BACE or a variant thereof or a fragment of either thereof capable of binding Nogo; and polypeptide (b) is Nogo or a variant thereof or a fragment of either thereof capable of binding BACE; (ii) monitoring Nogo mediated activity; and (iii) determining thereby whether the test agent is a modulator of Nogo activity. Modulators identified by a method of the invention and use of such modulators in the manufacture of a medicament for the treatment of disorders responsive to the modulation of Nogo activity such as acute neuronal injury.

WO 02/057483

PCT/GB02/00228

1

NOVEL ASSAY**Field of the Invention**

This invention relates to methods of identifying modulators of Nogo and/or
5 BACE activity and their use in the treatment of conditions which are responsive to
modulation of Nogo activity such as acute neuronal injury.

Background to the Invention

At least three Nogo isoforms are generated by alternative splicing of
10 transcripts derived from the NogoA gene. The C-terminal third of all three isoforms
shares high homology (approximately 70% at the amino acid level) with the reticulon
protein family. NogoA, the largest isoform, has been shown to inhibit axon
regeneration in culture. It is thought that the normal role of Nogo proteins is to
15 prevent axon sprouting in the uninjured central nervous system. NogoA is localised
to central nervous system myelin and is highly expressed in oligodendrocytes;
NogoB and NogoC are expressed in some neurons and several non-neural tissues.
All Nogo isoforms surprisingly have a C-terminal ER-retention motif but at least
some NogoA protein is thought to reach the cell surface. All 3 Nogo isoforms have 2
20 potential trans-membrane domains. Both the C and N termini may be
cytoplasmically exposed and a 66 amino acid loop separated by the TM domains
may be located extracellularly.

An aspartyl protease called BACE (also known as Asp2 or memapsin2) has
recently been shown to be responsible for β -secretase activity in relation to amyloid
precursor protein (APP) processing. BACE is a type I transmembrane protein with a
25 large luminal domain containing the protease domain.

Summary of the Invention

The present inventors have identified a novel interaction between Nogo and
BACE. The interaction between Nogo and BACE provides a new therapeutic
30 intervention point in disorders involving defective NOGO function and more

WO 02/057483

PCT/GB02/00228

2

specifically in acute neuronal injury such as spinal injury, stroke, head injury and peripheral nerve damage, neoplastic disease, hyperproliferative disorders and dysproliferative disorders. In addition, BACE is now proposed as a target for identifying agents which may be useful in the treatment of acute neuronal injury, neoplastic disorders, hyperproliferative disorders and dysproliferative disorders.

Accordingly the invention provides a method of identifying a modulator of NOGO function, the method comprising:

- (i) providing
 - (a) a BACE polypeptide
 - (b) a Nogo polypeptide
 - (c) a test agent

under conditions that would permit binding of a BACE polypeptide (a) to a Nogo polypeptide (b) in the absence of the test agent (c) and wherein said BACE polypeptide (a) is BACE or a variant thereof or a fragment of either thereof capable of binding Nogo and said Nogo polypeptide (b) is Nogo or a variant thereof or a fragment of either thereof capable of binding BACE.

- (ii) monitoring Nogo mediated activity; and
- (iii) determining thereby whether the test agent is a modulator of Nogo activity.

In a further aspect, the invention provides a method for identification of a modulator of BACE activity, which method comprises:

- (i) contacting BACE or a variant thereof or a fragment of either thereof which maintains a BACE function with a test agent; and
- (ii) monitoring for BACE activity

thereby determining whether the test agent is a modulator of BACE activity.

The invention also provides:

- a modulator identifiable by a method according to the invention;
- use of a modulator identifiable by a method according to the invention in the manufacture of a medicament for the treatment or prophylaxis of acute

WO 02/057483

PCT/GB02/00228

3

- neuronal injury, neoplastic disorders, hyperproliferative disorders or dysproliferative disorders;
- use of a BACE polypeptide or a polynucleotide encoding a BACE polypeptide in the manufacture of a medicament for the treatment of acute neuronal injury, neoplasia, hyperproliferative disorders or dysproliferative disorders wherein said BACE polypeptide is BACE or a variant thereof or fragment of either thereof which is capable of binding Nogo;
 - a method of treatment of acute neuronal injury, neoplasia, hyperproliferative disorders or dysproliferative disorders comprising administering an effective amount of a BACE polypeptide, a polynucleotide encoding a BACE polypeptide or a modulator of BACE function identified by a method of the invention to a human or animal in need of such treatment wherein said BACE polypeptide is BACE or a variant thereof or fragment of either thereof which variant or fragment is capable of binding Nogo; and
 - a method of treatment of acute neuronal injury, neoplasia, hyperproliferative disorders or dysproliferative disorders comprising:
 - (i) identifying a modulator of BACE activity; and
 - (ii) administering a therapeutically effective amount of the said modulator to a patient in need thereof.

20

Brief Description of the Figures**Figure 1A**

Tas10 (mouse #4) sections stained with Nogo-A monoclonal antibody (6D5). Note presence of a ring of staining surrounding plaques of all sizes.

Figure 1B

Left panels show sections stained with an Anti-Nogo-A polyclonal antibody at two different magnifications. The two panels on the right show double staining using the same Nogo-A polyclonal and an anti-Abeta monoclonal 1E8.

WO 02/057483

PCT/GB02/00228

4

Figure 1C

Similar ring-like staining with Asp2/BACE specific monoclonal antibody (9B21) in these Tas10 transgenic mice.

Figure 1D

- 5 Asp2/BACE staining of Tas10 transgenic mouse brain sections with monoclonal 9B21 shows a distinctive cellular staining extending in processes into the amyloid plaque core.

Figure 1E

- 10 Sequential sections from mouse #3 (18month old Tas10 transgenic) stained for Nogo-A (left panel) and Asp2/BACE (right panel). Note the lower levels of Nogo-A overexpression in animals with a lower amyloid load (compared with animal 4 in previous sections). Both proteins show a similar overlapping distribution in all plaques present in both sections.

15 Figure 2

Embryonic hippocampal neurons express Nogo-A throughout the cytoplasm, with some apparent surface localisation. Concentrations of Nogo-A immunoreactivity are seen in varicosities or synaptic structures along the processes.

20 Figure 3A

Transient transfections produce high levels of Asp2/BACE and Nogo-A protein in SHSY5Y-APP^{swe} cells. The left panel shows cells transfected with Asp2/BACE and stained with Anti-myc tag clone 9E10. The right panel shows cells transfected with Nogo-A and stained with a specific monoclonal antibody (clone 6D5).

25

Figure 3B

Cotransfection of Asp2/BACE-myc and Nogo-A into SHSY5Y cells. Panels showing the following stains. Top left Hoescht nuclear stain; Top right Asp2/BACE-myc; Bottom left Nogo-A polyclonal 67; Bottom right Merge of Asp2/BACE and Nogo-A

WO 02/057483

PCT/GB02/00228

5

stains. Note codistribution of a pool of Asp2/BACE with Nogo-A in the double-transfected cells.

Figure 3C

5 Cotransfection of Asp2/BACE-myc and Nogo-B into SHSY5Y cells. Panels showing the following stains. Top left Hoescht nuclear stain; Top right Asp2/BACE-myc; Bottom left Nogo-B polyclonal 66; Bottom right Merge of Asp2/BACE and Nogo-B stains. Note codistribution of a pool of Asp2/BACE with Nogo-B in the double-transfected cells.

10

Figure 4A

Nogo Isoform overexpression does not enhance Abeta production in SHSY5Y-APP^{swe} cells. Left panel shows effects of transfections into SHSY5Y-APP^{swe} cells on Abeta X-40 production. The right panel shows the effects of transfections on AbetaX-42 production. Bars represent the activity after transfection with GFP, Asp2/BACE, Nogo-A and Nogo-B respectively in each panel. Note Asp2/BACE increases Abeta production in these cells at this cell density while single transfection of the two Nogo isoforms appears not to enhance production at this cell density.

20

Figure 4B.

Co-expression of Nogo isoforms with Asp2/BACE modulates Ab production in SHSY5Y-APP^{swe} cells. Assays measuring AbetaX-40 (left panel) and AbetaX-42 (right panel) were conducted on cells cotransfected with the indicated combinations of DNA in the following order. Asp2/BACE plus GFP; Asp2/BACE plus Nogo-A; Asp2/BACE plus Nogo-B; Asp2/BACE plus Nogo-C. Double transfections can be used to assay the activity of Nogo isoforms on APP processing.

25

WO 02/057483

PCT/GB02/00228

6

Brief Description of the Sequences

- SEQ ID No: 1 shows the BACE nucleotide coding sequence and amino acid sequence.
- SEQ ID No: 2 is the amino acid sequence of BACE.
- 5 SEQ ID No: 3 shows the NogoB nucleotide coding sequence and amino acid sequence.
- SEQ ID No: 4 is the amino acid sequence of NogoB.
- SEQ ID No: 5 is an amino acid fragment of NogoB identified in an assay to identify proteins which bind BACE.
- 10 SEQ ID No: 6 is an amino acid fragment of NogoB identified in an assay to identify proteins which bind BACE.
- SEQ ID No: 7 is an amino acid fragment of NogoB identified in an assay to identify proteins which bind BACE.
- SEQ ID No: 8 shows the NogoA nucleotide coding sequence and amino acid
- 15 sequence.
- SEQ ID No: 9 is the amino acid sequence of NogoA.
- SEQ ID No: 10 shows the NogoC nucleotide coding sequence and amino acid sequence.
- SEQ ID No: 11 is the amino acid sequence of NogoC.
- 20 SEQ ID No: 12 shows the BACE2 nucleotide coding sequence and amino acid sequence.
- SEQ ID No: 13 is the amino acid sequence of BACE2.

Detailed Description of the Invention

- 25 Throughout the present specification and the accompanying claims the words "comprise" and "include" and variations such as "comprises", "comprising", "includes" and "including" are to be interpreted inclusively. That is, these words are intended to convey the possible inclusion of other elements or integers not specifically recited, where the context allows.

WO 02/057483

PCT/GB02/00228

7

The invention provides a method for identifying a modulator of Nogo activity and a method for identifying a modulator of BACE activity. A modulator may modulate the interaction between Nogo and BACE.

A Nogo polypeptide for use in accordance with the invention is one which
5 capable of binding BACE. The Nogo polypeptide may be NogoA, (accession number AJ251383), NogoB (accession number AB015639) or NogoC (accession number AF125103). The Nogo polypeptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID No: 4, 9 or 11 or a functional variant or functional fragment thereof. The
10 Nogo polypeptide preferably comprises the amino acid sequence of SEQ ID No: 4 or a functional variant or a functional fragment thereof. A variant may comprise a naturally occurring isoform or splice variant. A variant or fragment of SEQ ID No: 4, 9 or 11 for use in accordance with the invention is capable of binding to BACE. Particularly preferred variants of Nogo include other members of the reticulon protein family. Particularly preferred fragments and variants of SEQ ID No: 4
15 comprise the amino acid sequence shown in SEQ ID No: 5, 6 and/or 7.

A BACE polypeptide for use in accordance with the may comprise a naturally occurring BACE such as BACE (accession numbers AF190725, P56817) having the amino acid sequence of SED ID No: 1 or SEQ ID No: 2 or may comprise a variant or fragment of BACE which may be a naturally occurring BACE such as BACE2
20 (accession numbers AF204944, Q9Y5Z0) having the amino acid sequence of SED ID No: 12 or SEQ ID No: 13 or another unidentified isoform or splice variant which is homologous to or retains the desired function of a known BACE. Such a variant or fragment of BACE for use in the invention is one which is capable of binding to a Nogo polypeptide, in particular to a Nogo polypeptide having the sequence of SEQ
25 ID No: 5, 6 or 7. Preferably a variant or fragment of BACE is capable of binding to full length NogoA, NogoB and/or NogoC. A preferred variant or a preferred fragment of BACE may also comprise an aspartyl protease active site. Such preferred variants and fragments retain the ability to cleave proteins and peptides comprising a β -secretase cleavage site. Preferably such variants and fragments

WO 02/057483

PCT/GB02/00228

8

encompass amino acid residues 93 to 96 (DTGS) and/or residues 289-292 (DSGT) of SEQ ID No: 2 or residues 109-112 (DTGS) and/or 300-303 (DSGT) of SEQ ID No: 13.

To determine whether a variant or fragment of BACE is capable of binding to Nogo the variant or fragment can be contacted with Nogo under conditions suitable for the formation of a complex between BACE and Nogo. Similarly, to determine whether a variant or fragment of Nogo is capable of binding to BACE, the variant or fragment can be contacted with BACE under conditions suitable for the formation of a complex between Nogo and BACE. Any one of the assays described herein can be carried out in the absence of a test agent to determine the binding capabilities of these proteins.

Proteins with naturally occurring amino acid sequences are preferred for use in the assays. Preferred proteins are human proteins but homologues from other mammalian species, or other animal species may be used. Any allelic variant or species homologue of the defined proteins may be used. References to a variant or fragment of the protein as described below relates to a variant or fragment of both Nogo and BACE. For all the proteins described herein for use in an assay of the invention, the ability of the variant or fragment to bind BACE or Nogo as appropriate is preferably maintained.

Polypeptides that have been artificially mutated but retain BACE or Nogo binding activity or other Nogo or BACE activity may also be used in the invention. Such mutants may be generated by techniques well known in the art, including site directed mutagenesis, random mutagenesis and restriction enzyme digestion and ligation. A protein for use in the invention preferably has more than about 65% sequence identity to a natural protein, more preferably at least 70%, at least 80%, at least 90%, at least 95%, at least 97% or at least 99% sequence identity thereto over a region of at least 20, preferably at least 30, for instance at least 40, at least 60 or at least 100 contiguous amino acids or over the full length of SEQ ID No: 2 or 13 or SEQ ID No: 4, 9 or 11. Amino acid substitutions may be made, for example from

WO 02/057483

PCT/GB02/00228

9

1, 2 or 3 to 10, 20 or 30 substitutions. Conservative substitutions may be made, for example according to the following Table. Amino acids in the same block in the second column and preferably in the same line in the third column may be substituted for each other.

5

| | | |
|-----------|-----------------|---------|
| ALIPHATIC | Non-polar | G A P |
| | | I L V |
| | Polar-uncharged | C S T M |
| | | N Q |
| | Polar-charged | D E |
| | | K R |
| AROMATIC | | H F W Y |

The entire protein sequence of each of the proteins used in the assay may be present. Fragments of the proteins and variants described above that retain the ability to bind to the second component in the binding assay, i.e. BACE for Nogo

10 polypeptides and Nogo for BACE polypeptides may also be used in the invention. Alternatively variants or fragments of BACE which retain a function of BACE may be used in assays to identify modulators of BACE activity. Preferred fragments of SEQ ID No: 2 will be at least 30, e.g. at least 100, at least 200, at least 300, at least 400 or at least 450 amino acids in length. Preferred fragments of SEQ ID No: 4 will

15 be at least 30, e.g. at least 100, at least 200 or at least 250 amino acids in length. A fragment may comprise part of a polypeptide, for example a chimeric polypeptide. A chimeric protein may be used to facilitate the purification of a BACE or Nogo polypeptide. For example, the luminal domain of BACE (amino acids 1 to 460 of SEQ ID No: 2) may be fused to human IgG at the carboxy-terminus.

20 As used herein, a Nogo polypeptide (a) is used to refer to Nogo having the sequence of SEQ ID No: 4, 9 or 11 or a variant thereof or a fragment of either thereof

WO 02/057483

PCT/GB02/00228

10

which variant or fragment is capable of binding to BACE, or to a variant or a fragment of BACE which is capable of binding to Nogo.

As used herein, a BACE polypeptide (a) is used to refer to BACE having the sequence of SEQ ID No: 2 or 13 or a variant thereof or a fragment of either thereof
5 which variant or fragment is capable of binding to Nogo, or to a variant or a fragment of Nogo which is capable of binding to BACE.

The polypeptides for use in the invention may be chemically modified, e.g. post-translationally modified. For example, they may be glycosylated or comprise modified amino acid residues. The polypeptides may be tagged to aid detection or
10 purification, for example using a HA, histidine, T7, myc or flag tag. The BACE polypeptide (a) and the Nogo polypeptide (b) may be tagged with different labels which may assist in identification of a BACE/Nogo complex.

Assays

15 Any suitable assay format may be used for identifying a modulator of a Nogo activity, for example a modulator of a BACE/ Nogo interaction.

As the first step of the method for identifying a modulator of Nogo function, (a) a BACE polypeptide comprising the sequence of SEQ ID No: 2 or 13 or a variant thereof or a fragment of either sequence capable of binding to Nogo; (b) a Nogo
20 polypeptide comprising the sequence of SEQ ID No: 4, 9 or 11 or a variant thereof or a fragment of either sequence capable of binding to BACE; and (c) a test agent are contacted under conditions that would permit binding of (a) to (b) in the absence of a test agent. An activity of Nogo is then monitored. For example, the interaction between the BACE polypeptide (a) and the Nogo polypeptide (b) may be analysed.
25 The interaction between the BACE polypeptide (a) and the Nogo polypeptide (b) in the presence of a test agent may be compared with the interaction between the BACE polypeptide (a) and the Nogo polypeptide (b) in the absence of the test agent to determine whether the test agent modulates the binding of BACE polypeptide (a) and

WO 02/057483

PCT/GB02/00228

11

the Nogo polypeptide (b) and thereby whether the test agent enhances or inhibits the binding BACE to Nogo.

The test agent can be contacted with a cell harbouring a polynucleotide or expression vector encoding a BACE polypeptide (a) and a polynucleotide or
5 expression vector encoding a Nogo polypeptide (b). Optionally, the cell may harbour a polynucleotide or expression vector encoding a test agent, wherein the test agent is a peptide or an antisense polynucleotide. The cell typically allows transcription and translation of the polynucleotides or vectors so that the polypeptides are expressed in the same cell.

10 The test agent may be provided in the extracellular medium used for washing, incubating or growing the cell. The test agent may modulate the interaction of the Nogo polypeptide (b) with the BACE polypeptide (a) indirectly from outside the cell, for example by interacting with an extracellular domain of BACE or Nogo or may be taken up into the cell from the extracellular medium. Where the BACE polypeptide
15 (a) and the Nogo polypeptide (b) are coexpressed in a cell, the cell may express both proteins naturally, for example the cell may be a neuronal cell grown in a primary culture, or the cell may express both proteins recombinantly, or the cell may naturally express one protein and be transformed to express the other protein recombinantly.

The cell may be transiently or stably transfected or transformed. The BACE
20 polypeptide (a) and the Nogo polypeptide (b) may both be transiently expressed, both stably expressed or one may be stably expressed and the other transiently expressed. Cells can be transfected by methods well known in the art, for example, by electroporation, calcium phosphate precipitation, lipofection or heat shock. The proteins may be expressed in mammalian cells such as human cells or non-
25 mammalian cells such as yeast or bacteria. It is preferred that the cells are in culture. Preferred cell lines which may be used include HEK293, COS and PC12 cells.

A cell expressing a BACE polypeptide (a) or a cell homogenate, a cell lysate, a membrane preparation or a protein preparation derived from a cell expressing a BACE polypeptide (a) can be contacted with a cell expressing a Nogo polypeptide

(b) or a cell homogenate, a cell lysate, a membrane preparation or a protein preparation derived from cells expressing a Nogo polypeptide (b).

The conditions which permit binding of a BACE polypeptide (a) to a Nogo polypeptide (b) in an extracellular environment can be determined by carrying out the assay in the absence of a test agent.

A control assay in which the agent to be tested is omitted and an assay in which a test agent is included can be carried out in parallel or subsequently. The results of the experiments using the test agent and the control experiments can be used to determine whether the test agent inhibits or enhances binding.

The agent tested may be tested with any other known interacting protein combinations to exclude the possibility that the test agent is a general inhibitor of protein/protein interactions.

Where the BACE polypeptide (a) used in the assay is a variant or fragment of SEQ ID No: 2 or 13, or the Nogo polypeptide (b) used in the assay is a variant or fragment of SEQ ID No: 4, 9 or 11, the assay is preferably run first in the absence of a test agent to ensure that the variant or fragment exhibits the activity being monitored, such as binding activity or protease activity.

A number of biochemical and molecular cell biology protocols known in the art can be used to analyse the interaction of a BACE polypeptide (a) and a Nogo polypeptide (b) (see for example Sambrook *et al.*, 1989). Some specific examples are outlined below:

The BACE/Nogo interaction can be determined directly using a binding assay. For example, a radiolabelled BACE polypeptide (a) may be incubated with a Nogo polypeptide (b) in the presence and absence of the test agent and the effect of the test agent on the binding of the BACE polypeptide (a) to the Nogo polypeptide (b) is monitored. Typically, the radiolabelled BACE polypeptide (a) is incubated with cell membranes containing the Nogo polypeptide (b) until equilibrium is reached. The membranes can then be separated from non-bound radiolabelled BACE polypeptide (a) and dissolved in scintillation fluid to allow the radioactive content to

be determined by scintillation counting. Non-specific binding of the agent may also be determined by repeating the experiment in the presence of a saturating concentration of a non-radioactive BACE polypeptide (a). Preferably a binding curve is constructed by repeating the experiment with various concentrations of the radiolabelled BACE polypeptide, both in the presence and absence of the test agent.

5 A yeast-2 hybrid assay system may be used to monitor the effect of a test agent on the BACE/Nogo interaction. For example, a polynucleotide encoding a BACE polypeptide (a) can be cloned into GAL4 binding domain vector (GAL4_{BD}) and a Nogo polynucleotide (b) can be cloned into a GAL4 activation domain fusion vector (GAL4_{AD}). The GAL4_{AD} and GAL4_{BD} vectors can then be expressed in yeast and the resulting β -galactosidase activity in the presence and absence of the test agent can be assayed and quantified using the substrate o-nitrophenol β -D-galactopyranoside (ONPG) using a liquid nitrogen freeze fracture regime as described by Harshman *et al.*, 1998.

15 A "pull-down" assay system may also be used. Isolated BACE polypeptide (a) may be immobilised on a surface and binding of a Nogo polypeptide (b) to the surface may be monitored in the presence and absence of the test agent. The assay can also be carried out by immobilizing a Nogo polypeptide (b) and measuring the binding of a BACE polypeptide (a) to the immobilized protein.

20 Alternatively, of a BACE polypeptide (a) may be immunoprecipitated, immunopurified or affinity purified from a cell extract of cells co-expressing a BACE polypeptide (a) and a Nogo polypeptide (b). Coprecipitating/copurifying Nogo polypeptide (b) can then be detected, for example using Western blotting techniques or by radiolabelling recombinantly expressed proteins, and quantified using a phosphorimager or scintillation counter. The test agent is generally added to the cells or the cell growth medium prior to preparation of the cell lysate. Such assays may also be carried out by precipitating or purifying a Nogo polypeptide (b) and detecting coprecipitating or copurifying BACE polypeptide (a).

The assays may also be carried out monitoring other Nogo functions. For

WO 02/057483

PCT/GB02/00228

14

example, the neurite inhibitory activity of Nogo may be monitored. Neurite inhibitory activity may be monitored using any suitable assay format such as a dorsal root ganglion (DRG) neurite outgrowth assay, a DRG growth cone collapse assay, a neuronal cell line (for example, PC12 cell) neurite outgrowth assay or a fibroblast (such as NIH 3T3) cell spreading assay. For example, neurite outgrowth in the presence of a cell expressing BACE and Nogo may be monitored and the ability of a test agent to inhibit or promote neurite outgrowth may be assayed. To determine whether the effect of the test agent on neurite growth results from the effect of the test agent on BACE activity or on the BACE/Nogo interaction, a control assay may be carried out using cells expressing Nogo but not BACE. Typically, the cell will also express one or more neurotrophic factors.

An important aspect of the present invention is the use of a BACE polypeptide (a) in screening methods to identify agents that may act as modulators of BACE activity and in particular agents that may be useful in treating Nogo associated disease. Any suitable form may be used for the assay to identify a modulator of BACE activity. In general terms, such screening methods may involve contacting BACE polypeptide (a) with a test agent and then measuring activity. For example, the step of monitoring BACE activity may involve assessment of BACE protease activity, for example by cleaving a peptide comprising the β -secretase cleavage site (SEVKM/DAEFR or SEVNL/DAEFR) or the effect of binding of BACE to other proteins. For example the assay may involve determination of APP processing as described in Vassar *et al.* (1999) *Science* 286, 735-741, Hussain *et al.* (1999) *Molecular and Cellular Neuroscience* 14, 419-427, Sinha *et al.* (1999) *Nature* 402, 537-540 or Yan *et al.* (1999) *Nature* 402, 533-537.

Modulator activity can be determined by contacting cells expressing a BACE polypeptide (a) of the invention with an agent under investigation and monitoring the effect of the agent on BACE activity. The cells expressing the polypeptide may be *in vitro* or *in vivo*. The polypeptide of the invention may be naturally or recombinantly

WO 02/057483

PCT/GB02/00228

15

expressed. Preferably, the assay is carried out *in vitro* using cells expressing recombinant polypeptide.

Candidate Modulators

5 A modulator of Nogo or BACE function may exert its effect by binding directly to Nogo or BACE or may have an upstream effect which prevents the BACE/Nogo interaction occurring or which inhibits Nogo or BACE mediated activity.

10 A modulator may directly inhibit the interaction of Nogo with BACE or inhibit interaction between BACE and a ligand. A test agent may comprise a fragment of a BACE which is capable of binding Nogo or a BACE ligand but which lacks any functional activity. Alternatively, a test agent may comprise a fragment of Nogo which is capable of binding BACE but which lacks any functional activity.

15 Antibodies, or antibody fragments that specifically bind to BACE or Nogo or chemical compounds capable of binding these proteins are also candidate compounds. An antibody, or other compound, "specifically binds" to a protein when it binds with high affinity to the protein for which it is specific but does not bind or binds with only low affinity to other proteins. A variety of protocols for competitive binding or immunoradiometric assays to determine the specific binding capability of 20 an antibody are well known in the art (see for example Maddox *et al.* 1993). Such immunoassays typically involve the formation of complexes between the "specific protein" and its antibody and the measurement of complex formation.

25 Furthermore, combinatorial libraries, defined chemical identities, peptide and peptide mimetics, oligonucleotides and natural product libraries, such as display libraries (e.g. phage display libraries) may also be tested. The test agents may be chemical compounds. Batches of the test agents may be used in an initial screen of, for example, ten agents per reaction, and the agents of batches which show inhibition tested individually.

Modulators

A modulator of Nogo activity is an agent which produces a measurable reduction or increase in binding of a Nogo polypeptide (b) to BACE polypeptide (a) in the assays described above, or an effect on Nogo activity or BACE activity.

Preferred inhibitors are those which inhibit binding by at least 10%, at least 20%, at least 30%, at least 40% at least 50%, at least 60%, at least 70%, at least 80%, at least 90%, at least 95% or at least 99% at a concentration of the inhibitor of $1\mu\text{g ml}^{-1}$, $10\mu\text{g ml}^{-1}$, $100\mu\text{g ml}^{-1}$, $500\mu\text{g ml}^{-1}$, 1mg ml^{-1} , 10mg ml^{-1} or 100mg ml^{-1} .

Preferred activators are those which activate binding by at least 10%, at least 25%, at least 50%, at least 100%, at least, 200%, at least 500% or at least 1000% at a concentration of the activator $1\mu\text{g ml}^{-1}$, $10\mu\text{g ml}^{-1}$, $100\mu\text{g ml}^{-1}$, $500\mu\text{g ml}^{-1}$, 1mg ml^{-1} , 10mg ml^{-1} or 100mg ml^{-1} .

The percentage inhibition or activation represents the percentage decrease or increase in expression/activity in a comparison of assays in the presence and absence of the test agent. Any combination of the above mentioned degrees of percentage inhibition or activation and concentration of inhibitor or activator may be used to define an inhibitor or activator of the invention, with greater inhibition or activation at lower concentrations being preferred.

Test agents which show activity in assays such as those described above can be tested in *in vivo* systems, an animal model. Candidate inhibitors could be tested for their ability to decrease Nogo mediated signalling, for example by monitoring the effect on axon growth.

Candidate activators could be tested for their ability to increase Nogo mediated signalling. Ultimately such agents would be tested in animal models of the target disease states.

25 Therapeutic use

Modulators of the interaction between BACE and Nogo or of Nogo activity or of BACE activity identified by the methods of the invention may be used for the treatment or prophylaxis of a disorder that is responsive to modulation of Nogo activity or BACE activity.

In particular, neuronal disorders that are responsive to modulation of BACE and/or Nogo activity may be treated. A modulator of Nogo or BACE activity may be used to alleviate the symptoms or to improve the condition of a patient suffering from such a disorder.

5 Modulators of Nogo or BACE activity may be useful in axon regeneration. This may be useful in treating patients suffering injury to the nervous system, and in particular to the spinal cord, brain, for example following stroke, and peripheral nervous system. Such modulators will typically inhibit Nogo activity, for example by inhibiting the inhibitory effect of Nogo on axon regeneration.

10 Modulators of Nogo or BACE activity may be useful in treating or preventing neoplastic disorders, hyperproliferative disorders and dysproliferative disorders. In particular neoplastic disorders of the nervous system such as solid tumours, carcinomas, glioblastomas, oligodendrogliomas, neuroblastomas and retinoblastomas may be treated or prevented using modulators of Nogo or BACE activity.

15 Hyperproliferative disorders and dysproliferative disorders that may be treated with a modulator of Nogo or BACE function include cirrhosis of the liver, psoriasis, benign tumours, keloid formation, fibrocystic conditions and tissue hypertrophy. Such modulators will typically enhance or promote Nogo activity, for example by promoting the inhibitory effect of Nogo on axon regeneration.

20 Modulators of Nogo or BACE activity may be useful in preventing metastasis or spreading of a cancer. For example, an agent which promotes the inhibitory activity of Nogo may be useful for preventing spreading of a CNS cancer to other organs of the body, such as lung, kidney, liver or muscle.

25 BACE polypeptides and polynucleotides encoding BACE polypeptides may also be used in the treatment or prophylaxis of such disorders.

The invention therefore provides a use of a polynucleotide which encodes BACE or a variant thereof which is capable of binding Nogo or a fragment of either thereof which is capable of binding Nogo, which polynucleotide comprises:

- (a) the sequence of SEQ ID No: 1 or 12; or

WO 02/057483

PCT/GB02/00228

18

- (b) a sequence that hybridizes to the complement of SEQ ID No: 1 or 12;
or
(c) a sequence that is degenerate as a result of the genetic code with respect to a sequence defined in (a) or (b); or
5 (d) a sequence that is complementary to a polynucleotide defined in (a), (b) or (c);

in the manufacture of a medicament for use in a method of treatment of a disorder that is responsive to modulation of Nogo activity.

A polynucleotide comprising a sequence that hybridizes to the complement of
10 the coding sequence of SEQ ID No: 1 or 12 can hybridize at a level significantly above background. Background hybridization may occur, for example, because of other cDNAs present in a cDNA library. The signal level generated by the interaction between a polynucleotide of the invention and the complement of the coding sequence of SEQ ID No: 1 or 12 is typically at least 10 fold, preferably at
15 least 100 fold, as intense as interactions between other polynucleotides and the coding sequence of SEQ ID No: 1 or 12. The intensity of interaction may be measured, for example, by radiolabelling the probe, e.g. with ³²P. Selective hybridisation may typically be achieved using conditions of low stringency (0.3M sodium chloride and 0.03M sodium citrate at about 40°C), medium stringency (for
20 example, 0.3M sodium chloride and 0.03M sodium citrate at about 50°C) or high stringency (for example, 0.03M sodium chloride and 0.003M sodium citrate at about 60°C). However, such hybridization may be carried out under any suitable conditions known in the art (see Sambrook *et al.*, 1989). For example, if high stringency is required, suitable conditions include 0.2 X SSC at 60°C. If lower
25 stringency is required, suitable conditions include 2 X SSC at 60°C.

A nucleotide sequence which is capable of selectively hybridizing to the complement of the DNA coding sequence of SEQ ID No: 1 or 12 will generally have at least 60%, at least 70%, at least 80%, at least 90%, at least 95%, at least 98% or at least 99% sequence identity to the coding sequence of SEQ ID No: 1 over a region of

WO 02/057483

PCT/GB02/00228

19

at least 20, preferably at least 30, for instance at least 40, at least 60, more preferably at least 100 contiguous nucleotides or most preferably over the full length of SEQ ID No: 1 or 12. Methods of measuring nucleic acid and protein homology are well known in the art. For example the UWGCG Package provides the BESTFIT

5 program which can be used to calculate homology (Devereux *et al.*, 1984). Similarly, the PILEUP and BLAST algorithms can be used to line up sequences (for example as described in Altschul, 1993 and Altschul *et al.*, 1990.) Many different settings are possible for such programs. According to the invention, the default settings may be used.

10 Any combination of the above mentioned degrees of sequence identity and minimum sizes may be used to define polynucleotides encoding a BACE polypeptide, with the more stringent combinations (i.e. higher sequence identity over longer lengths) being preferred. Thus, for example a polynucleotide which has at least 90% sequence identity over 25, preferably over 50 nucleotides forms one aspect

15 of the invention, as does a polynucleotide which has at least 95% sequence identity over 40 nucleotides.

The coding sequence of SEQ ID No: 1 or 12 may be modified by nucleotide substitutions, for example from 1, 2 or 3 to 10, 25, 50 or 100 substitutions. The polynucleotide of SEQ ID No: 2 or 13 may alternatively or additionally be modified

20 by one or more insertions and/or deletions and/or by an extension at either or both ends. The modified polynucleotide generally encodes a protein that can bind Nogo. Typically the protein encoded by the modified polypeptide has aspartyl protease activity. Degenerate substitutions may be made and/or substitutions may be made which would result in a conservative amino acid substitution when the modified

25 sequence is translated, for example as shown in the Table above.

Polynucleotides may comprise DNA or RNA. They may also be polynucleotides which include within them synthetic or modified nucleotides. A number of different types of modification to polynucleotides are known in the art. These include methylphosphonate and phosphorothioate backbones, addition of

WO 02/057483

PCT/GB02/00228

20

acridine or polylysine chains at the 3' and/or 5' ends of the molecule. For the purposes of the present invention, it is to be understood that the polynucleotides described herein may be modified by any method available in the art. Such modifications may be carried out in order to enhance the *in vivo* activity or lifespan

5 of polynucleotides of the invention.

WO 02/057483

PCT/GB02/00228

21

Polynucleotides encoding a BACE polypeptide may be produced recombinantly, synthetically, or by any means available to those of skill in the art. They may also be cloned by standard techniques. The polynucleotides are typically provided in isolated and/or purified form.

5 Although in general the techniques mentioned herein are well known in the art, reference may be made in particular to Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning: a laboratory manual.

A polynucleotide may also be an essential component in an assay of the invention, a probe (or template for designing a probe) for identifying proteins that may be used in the invention or a test agent. The nucleotides may be involved in recombinant protein synthesis as well as therapeutic agents in their own right, utilised in gene therapy techniques. Antisense sequences, may also be used in gene therapy, such as in strategies for down regulation of expression of BACE.

10 Polynucleotides for use in the invention can be inserted into expression vectors. Such expression vectors are routinely constructed in the art of molecular biology and may for example involve the use of plasmid DNA and appropriate initiators, promoters, enhancers and other elements, such as for example polyadenylation signals which may be necessary, and which are positioned in the correct orientation, in order to allow for protein expression. Other suitable vectors
15 would be apparent to persons skilled in the art. By way of further example in this regard we refer to Sambrook *et al.*

Polynucleotides may also be inserted into the vectors described above in an antisense orientation in order to provide for the production of antisense RNA. Antisense RNA or other antisense polynucleotides may also be produced by
20 synthetic means. Such antisense polynucleotides may be used as test compounds in the assays of the invention or may be useful in a method of treatment of a disorder responsive to modulation of Nogo activity, in particular for the treatment of injury to the spinal cord or peripheral nervous system.

Examples of suitable viral vectors include herpes simplex viral vectors and retroviruses, including lentiviruses, adenoviruses, adeno-associated viruses and HPV viruses (such as HPV-16 or HPV-18). Gene transfer techniques using these viruses are known to those skilled in the art. Retrovirus vectors for example may be used to stably integrate the polynucleotide giving rise to the antisense RNA into the host genome. Replication-defective adenovirus vectors by contrast remain episomal and therefore allow transient expression.

The formulation of an agent for use in preventing or treating any of the above mentioned conditions will depend upon factors such as the nature of the agent identified, whether a pharmaceutical or veterinary use is intended, etc. Typically a modulator is formulated for use with a pharmaceutically acceptable carrier or diluent. For example it may be formulated for topical, parenteral, intravenous, intramuscular, subcutaneous, intraocular, transdermal or oral administration. A physician will be able to determine the required route of administration for each particular patient. The pharmaceutical carrier or diluent may be, for example, an isotonic solution.

The dose of an agent may be determined according to various parameters, especially according to the agent used; the age, weight and condition of the patient to be treated; the route of administration; and the required regimen. Again, a physician will be able to determine the required route of administration and dosage for any particular patient.

Modulators may have to be administered to specific sites, or otherwise targeted to brain cells. For example, the modulator may be delivered to neurons. This may be achieved, for example, by delivery via a viral strain such as herpes simplex virus. Viral vectors comprising polynucleotides of the invention are described above. The viral vector delivery method may be used in the case of administration of, for example, polynucleotides of the invention. The vector may further comprise a promoter or other regulatory sequence that is specific to certain neurons.

The polynucleotides and vectors of the invention may be administered directly as a naked nucleic acid construct. Uptake of naked nucleic acid constructs by mammalian cells is enhanced by several known transfection techniques for example those including the use of transfection agents. Example of these agents
5 include cationic agents (for example calcium phosphate and DEAE-dextran) and lipofectants (for example lipofectam™ and transfectam™).

Typically, nucleic acid constructs are mixed with the transfection agent to produce a composition. Preferably the naked nucleic acid construct, viral vector comprising the polynucleotide or composition is combined with a pharmaceutically
10 acceptable carrier or diluent to produce a pharmaceutical composition. Suitable carriers and diluents include isotonic saline solutions, for example phosphate-buffered saline. The composition may be formulated for parenteral, intramuscular, intravenous, subcutaneous, or transdermal administration.

The pharmaceutical composition is administered in such a way that the
15 polynucleotide of the invention, viral vector for gene therapy, can be incorporated into cells at an appropriate area. When the polynucleotide of the invention is delivered to cells by a viral vector, the amount of virus administered is in the range of from 10^6 to 10^{10} pfu, preferably from 10^7 to 10^9 pfu, more preferably about 10^8 pfu for adenoviral vectors. When injected, typically 1-2 ml of virus in a pharmaceutically
20 acceptable suitable carrier or diluent is administered. When the polynucleotide of the invention is administered as a naked nucleic acid, the amount of nucleic acid administered is typically in the range of from 1 μ g to 10 mg.

Where the polynucleotide giving rise to the product is under the control of an inducible promoter, it may only be necessary to induce gene expression for the
25 duration of the treatment. Once the condition has been treated, the inducer is removed and expression of the polypeptide of the invention ceases. This will clearly have clinical advantages. Such a system may, for example, involve administering the antibiotic tetracycline, to activate gene expression via its effect on the tet repressor/VP16 fusion protein.

The use of tissue-specific promoters will be of assistance in the treatment of disease using the polypeptides, polynucleotide and vectors of the invention. It will be advantageous to be able express therapeutic genes in only the relevant affected cell types, especially where such genes are toxic when expressed in other cell types.

5 The routes of administration and dosages described above are intended only as a guide since a skilled physician will be able to determine readily the optimum route of administration and dosage for any particular patient and condition.

The following Example illustrates the invention.

Example 1

10 The target protein BACE1 was amplified by PCR using primers:
AGGAAGTGAAGTGGCCACCATGGCCCAAGCCCTGCC and
GTAGGGTAATTGGCCTTCAGCAGGGAGATGTCATC.

15 The PCR product was cloned into an expression vector such that an 8 residue histidine tag was inserted in frame at the C-terminus. This construct was transfected into HEK293 cells that were expanded under conditions selecting for the expression construct.

In a representative experiment BACE was affinity purified from 65 mg of the membrane-enriched fraction derived from approximately 10^8 transfected cells. Membrane proteins, solubilized in 1% CHAPSO, were incubated with 500 μ l Ni-NTA resin and eluted with 150 mM imidazole. The resulting eluate was precleared with sepharose (Pierce) for 1 hour. After discarding the sepharose, the eluate was incubated with anti-His antibody (Serotec) covalently bound to sepharose (Pierce aminolink plus) at 4° C overnight. Finally immunoprecipitated proteins were resuspended in sample buffer, separated on a 4-12% bis-tris gel under reduced conditions and stained with colloidal Coomassie blue. Bands specific to the tagged cell line were excised and in-gel digested with trypsin. All trypsin digested peptides were subjected to LC/MS/MS and proteins were identified by searching a non-redundant protein database.

Proteins identified in a representative experiment are summarised below.

WO 02/057483

PCT/GB02/00228

25

NogoB (ASY) peptides identified:

1 MEDLDQSPVLV SSSDSPPRPQ PAFKYQFVRE PEDEEEEEEE EEEDEDEDLE
 51 ELEVLERKPA AGLSAAPVPT APAAGAPLMD FGNDVFPAP RGPLPAAPPV
 101 APERQPCWDP SPVSSTVPAP SPLSAAAVSP SKLPQDDEPP ARPPPPPPAS
 5 151 VSPQAEPVWT PPAPAPAAPP STPAAPKRRG SSGSVVVDLL YWRDIKKTGV
 201 VFGASLFLLL SLTVFSIVSV TAYIALALLS VTISFRIYKG VIQAIQKSDE
 251 GHPFRAYLES EVAISEELVQ KYSNSALGHV NCTIKELRRL FLVDDLVDLSL
 301 KFAVLMWVFT YVGALFNGLT LLLALISLF SVPVIYERHQ AQIDHYLGLA
 351 NKNVKDAMAK IQAKIPGLKR KAE

10

The underlined peptide is sufficient to distinguish NogoB from other Nogo isoforms.

Example 2: Differentiating PC12 cells and measuring neurite outgrowth

15

PC12 cells are plated at 1×10^5 cells per well in 1.5 ml complete DMEM using a 6-well plate. Plated cells are incubated overnight at 37° C in 5% CO₂ to allow them to attach. Cells are washed with complete, prewarmed DMEM. 1.5 ml low serum DMEM +/- NGF +/- Bace +/- Nogo +/- test agent is added. A range of
 20 concentrations of Bace, Nogo and NGF of 0, 0.1, 1, 10, 50 and 100 ng/ml are tested. The test agent is added to different wells at concentrations of 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 and 10 nM. The cells are then incubated for 48 hours at 37° C in 5% CO₂ to allow them to attach.

25 After 48 Hours the cells should be about 50% confluent and are fixed in 4% paraformaldehyde phosphate for measurement of neurite outgrowth. Acid fuchin stain is diluted (2x) in PBS, mixed and filter sterilised through a syringe. 500µl of diluted stain is added to each well. Cells are incubated in the stain for 2 minutes at room temperature and washed in PBS (1 ml) four times. Fuchin stains cell bodies and

WO 02/057483

PCT/GB02/00228

26

neurites red. Neurite number and length/cell body are measured on an inverted microscope using appropriate image analysis and software.

5 Example 3

Sections from adult transgenic mice (designated Tas10) overexpressing human APP constructs containing the Swedish mutation were stained with a variety of antibody markers. These were chosen to allow the detection of amyloid plaques and proteins associated with or around them.

10 In a representative experiment a monoclonal antibody against the Nogo-A protein (clone 6D5) was found to stain the sections (for example Tas10 animal 4) in a pattern reminiscent of a ring surrounding most if not all plaque like structures (Figure 1A).

In order to confirm that this was actually plaque associated staining, further sections were double-stained with a monoclonal antibody (clone 1E8) directed against the amyloid peptide together with an affinity purified polyclonal antibody directed against Nogo-A (Alpha Diagnostics). In these sections an intense pink coloured product was deposited in the plaques labelling amyloid protein and these were surrounded by a darker blue/purple product corresponding to sites of Nogo-A protein expression. These observations confirmed our earlier finding of overexpression of Nogo-A around the edges of plaques in regions of new amyloid deposition (Figure 1B).

25 A number of additional antibody markers including neurofilament (Chemicon), GFAP (Sigma) and phospho-tau (clone AT8) all failed to produce a pattern similar to that seen with the Nogo-A antibodies. A monoclonal antibody directed against Asp2/BACE (clone 9B21) was used to stain sections from the same animal and were found to produce a ring like staining pattern most closely resembling the Nogo-A staining (Figure 1C). In subsequent serial sections and double-staining experiments it was apparent that the Nogo-A and Asp2/BACE proteins show a remarkably close association (Figure 1E). The only distinction that could be observed was that the Nogo-A stain was more diffusely distributed than the Asp2/BACE staining which

WO 02/057483

PCT/GB02/00228

27

appeared to label discrete cellular structures with features characteristic of neurons in this region (Figure 1D).

Further confirmation of the correlation of elevated Nogo-A expression with progressive pathology was found in the staining pattern of sections from transgenic animals displaying a lower plaque load. In these sections fewer and smaller plaques were seen and these were surrounded by less intense Nogo-A staining (Figure 1E).

Example 4

To determine the source of the Nogo-A found in the deposits surrounding the plaques cultured neurons that are known to be sensitive to amyloid peptide induced toxicity (in this case embryonic hippocampal neurons) were studied. Similar results can be obtained with other types of cultured neurons.

Cultured hippocampal neurons were fixed and stained with a Nogo-A specific monoclonal; the cells displayed prominent cytoplasmic and axonal staining with some apparent cell surface clusters. In relatively mature cultures the Nogo-A can be seen to also show some concentration in varicosities along the processes that may represent synapses (Figure 2). Treatment of such cultures with Abeta1-42 peptide can be used to determine their effects on Nogo-A expression and further used as a system to identify molecules that alter those responses as a means of modifying the progression and pathology of diseases such as (but not limited to) Alzheimer's disease.

Example 5

Human neuroblastoma cells (SHSY5Y) stably over-expressing the human APP gene carrying the Swedish mutation which predisposes affected individuals to early onset Alzheimer's disease can provide a useful system in which to study the effects of modifying agents on processing of APP into toxic Abeta peptide fragments. These cells normally secrete readily detectable levels of Abeta peptide into the culture medium. Transfection of Nogo-A, Nogo-B or Nogo-C alone or in combination with

WO 02/057483

PCT/GB02/00228

28

BACE/Asp2 can be used to determine the effects of overexpression of these proteins on APP. Repression of Abeta formation by Nogo isoforms would be likely to indicate that the overexpression of Nogo-A seen around the plaques in the Tas10 mice represents a compensatory/ protective mechanism while an increase would suggest that elevated expression contributes to the pathology of Alzheimer's disease in particular and neurodegenerative diseases in general. Screens of molecules altering the interactions of Nogo with BACE/Asp2 could thus be configured to identify agonists or antagonists of the binding as required.

cDNAs encoding Nogo isoforms were transfected into cultured SHSY5Y-APP_{swe} cells and expressed proteins detected in fixed cells with immunohistochemistry. Asp2 was detected using a c-terminal myc epitope (Figure 3A left panel) while the Nogo-A (Figure 3A right panel) and B isoforms were detected using isoform specific rabbit polyclonal antibodies (designated 67 and 66 respectively or monoclonal Anti-Nogo-A 6D5 as indicated in the figure legends). These experiments confirm that it is possible to overexpress these proteins in this cellular background and can be used as the basis of an assay for modulators of Nogo influenced APP processing.

Furthermore, in double transfected cells, microscopic examination was able to demonstrate the co-localisation of some of the transfected proteins within the cells. These data suggest that both Nogo-A (Figure 3A) and Nogo-B (Figure 3B) show the ability to interact with Asp2/BACE in an appropriate cellular background and that this interaction may well be responsible for altering the processing of APP during plaque formation.

Example 6

The human neuroblastoma cell-line SHSY5Y-APP_{swedish} can be transfected with cDNAs encoding test constructs and the effects on APP processing and secretion of Abeta into the media can be measured using ELISA assays. In experiments performed at low cell-densities we were able to detect an enhanced production of Abeta x-40 and x-42 following transfection of an Asp2/BACE construct (Figure 4A).

WO 02/057483

PCT/GB02/00228

29

Cells transfected with Nogo-A or Nogo-B expressing constructs in parallel were found not to produce the same increase in Abeta production suggesting they are not sufficient alone for enhanced amyloidogenesis.

In further experiments the effects of co-expression of all three Nogo isoforms with Asp2/BACE was tested. Analysis of conditioned media suggests that the Nogo isoforms appear to significantly reduce the levels of detectable Abeta peptide (Figure 4B). The observed alterations in Abeta levels may be due to the direct intracellular interaction of Asp2/BACE with Nogo which was found by co-immunoprecipitation of these proteins from cell lysates. This is supported by their co-localisation in transfected cells and therefore the modulation may be at the level of sub-cellular localisation. Since all the Nogo isoforms have a C-terminal ER retention motif the observed changes in Asp2/BACE activity with increased Nogo expression could cause the retention of more Asp2/BACE within the endoplasmic reticulum away from the sites of normal APP processing.

CLAIMS

1. A method of identifying a modulator Nogo function, the method comprising:
 - 5 (i) providing
 - (a) a BACE polypeptide;
 - (b) a Nogo polypeptide;
 - (c) a test agentunder conditions that would permit binding of a BACE polypeptide
10 (a) to a Nogo polypeptide (b) in the absence of the test agent (c)
wherein said BACE polypeptide (a) is BACE or a variant thereof or a fragment of either thereof capable of binding Nogo; and polypeptide (b) is Nogo or a variant thereof or a fragment of either thereof capable of binding BACE;
 - 15 (ii) monitoring Nogo mediated activity; and
 - (iii) determining thereby whether the test agent is a modulator of Nogo activity.
2. A method according to claim 1 wherein step (ii) comprises monitoring the interaction between (a) and (b).
- 20 3. A method according to claim 2 wherein the modulator inhibits the binding of (a) to (b).
4. A method according to claim 2 wherein the modulator enhances the binding of (a) to (b).
5. A method according to claim 1 wherein step (ii) comprises monitoring protease activity.
- 25 6. A method according to claim 5 wherein said protease activity is β -secretase cleavage of amyloid precursor protein.
7. A method according to claim 5 or 6 wherein the modulator inhibits said protease activity.

8. A method according to any one of the preceding claims wherein the BACE polypeptide (a) is BACE or a said fragment thereof.
9. A method according to any one of the preceding claims wherein the Nogo polypeptide (b) is NogoB or a said fragment thereof.
- 5 10. A method for identification of a modulator of BACE activity, which method comprises:
- (i) contacting a BACE polypeptide or a variant thereof or a fragment of either thereof which maintains a BACE function with a test agent and
- 10 (ii) monitoring for BACE activity thereby determining whether the test agent is a modulator of BACE activity.
11. A method according to claim 10 wherein the BACE activity comprises the ability of the polypeptide to interact with Nogo, or a variant thereof or a fragment of either thereof.
- 15 12. A modulator of Nogo activity which is identifiable by a method according to any one of claims 1 to 9.
13. A modulator of BACE activity which is identifiable by a method according to claim 10 or 11.
- 20 14. Use of a modulator according to claim 12 or 13 in the manufacture of a medicament for the treatment of acute neuronal injury.
15. Use of a BACE polypeptide, or a polynucleotide encoding a BACE polypeptide in the manufacture of a medicament for the treatment of acute neuronal injury wherein said BACE polypeptide is BACE or a variant thereof or fragment of either thereof which is capable of
- 25 binding Nogo.
16. A method of treatment of acute neuronal injury, which method comprises administering an effective amount of a BACE polypeptide, a polynucleotide encoding a BACE polypeptide or a modulator

according to claim 12 or 13 to a human or animal in need of such treatment wherein said BACE polypeptide is BACE or a variant thereof or fragment of either thereof which is capable of binding Nogo.

- 5 17. A method of treatment of acute neuronal injury, which method comprises:
- (i) identifying a modulator of BACE activity; and
 - (ii) administering a therapeutically effective amount of the said modulator to a patient in need thereof.
- 10 18. A use according to claim 14 or 15 or a method according to claim 16 or 17 wherein said acute neuronal injury is selected from spinal injury, stroke, brain injury and peripheral nervous system damage.
- 15 19. Use of a modulator according to claim 12 or 13 in the manufacture of a medicament for the treatment of neoplasia of the central nervous system.
- 20 20. Use of a BACE polypeptide, or a polynucleotide encoding a BACE polypeptide in the manufacture of a medicament for the treatment of a neoplastic, hyperproliferative or dysproliferative disorder wherein said BACE polypeptide is BACE or a variant thereof or fragment of either thereof which is capable of binding Nogo.
- 25 21. A method of treatment of of a neoplastic, hyperproliferative or dysproliferative disorder, which method comprises administering an effective amount of a BACE polypeptide, a polynucleotide encoding a BACE polypeptide or a modulator according to claim 12 or 13 to a human or animal in need of such treatment wherein said BACE polypeptide is BACE or a variant thereof or fragment of either thereof which is capable of binding Nogo.
22. A method of treatment of a neoplastic, hyperproliferative or dysproliferative disorder, which method comprises:

- (i) identifying a modulator of BACE activity; and
 - (ii) administering a therapeutically effective amount of the said modulator to a patient in need thereof.
23. A use according to claim 19 or 20 or a method according to claim 21 or 22 wherein said of a neoplastic, hyperproliferative or dysproliferative disorder a disorder of the central nervous system.
- 5

WO 02/057483

1/11

PCT/GB02/00228

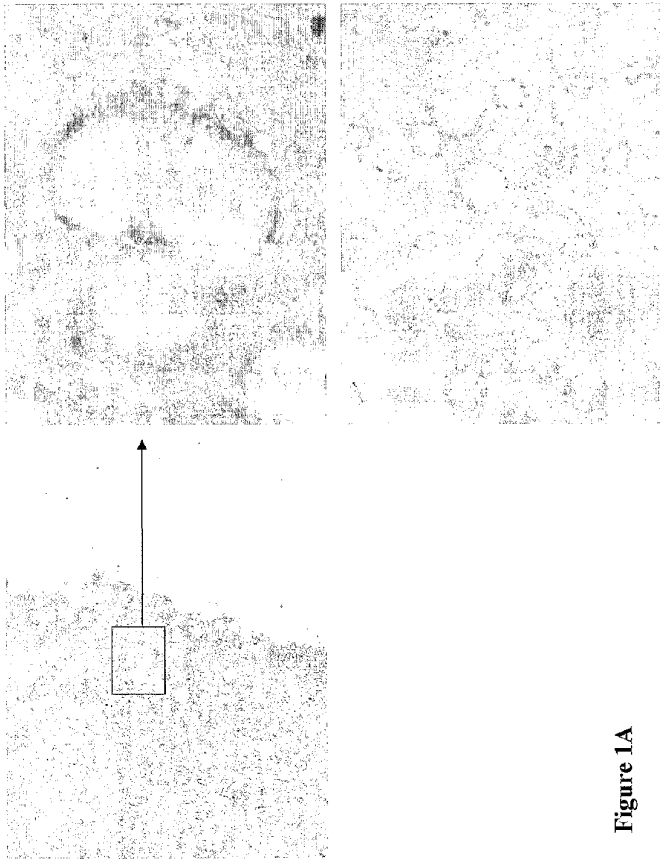


Figure 1A

WO 02/057483

2/11

PCT/GB02/00228

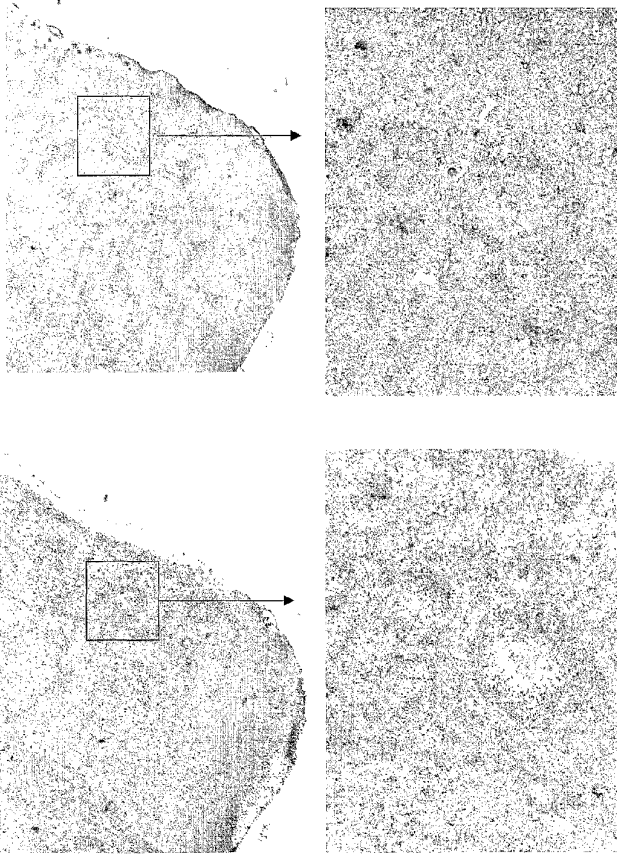
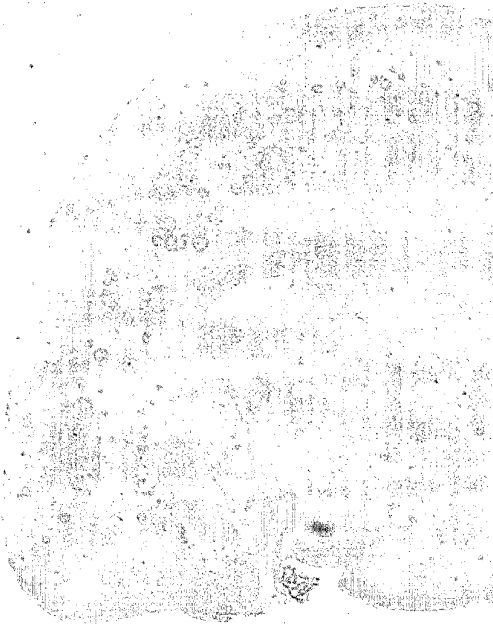


Figure 1B

Figure 1C



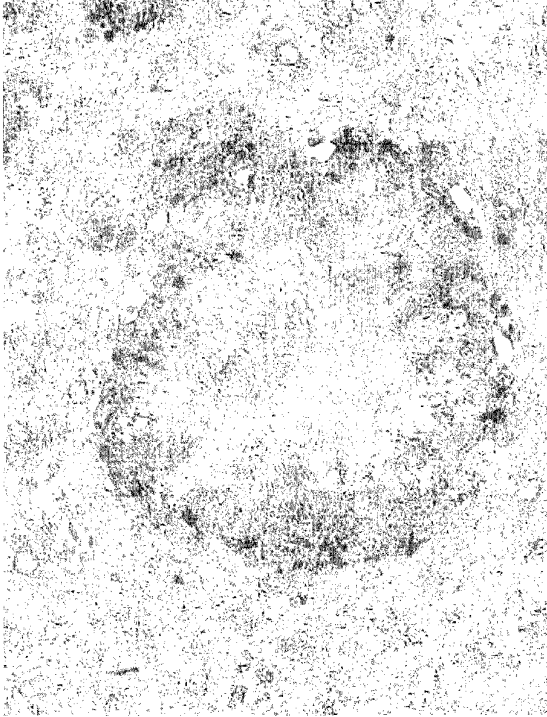


Figure 1D

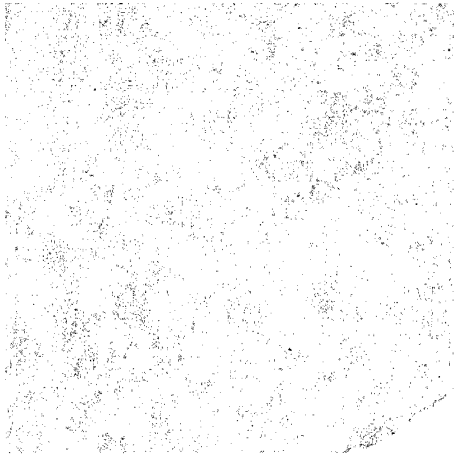


Figure 1E

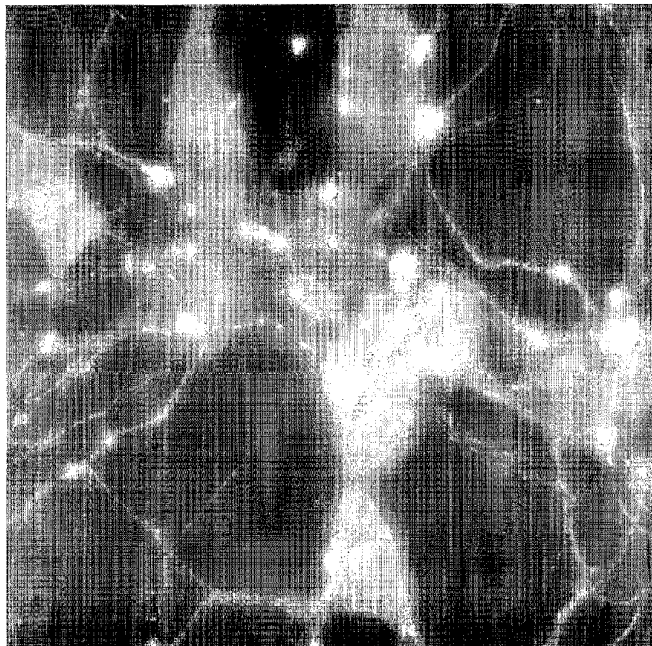
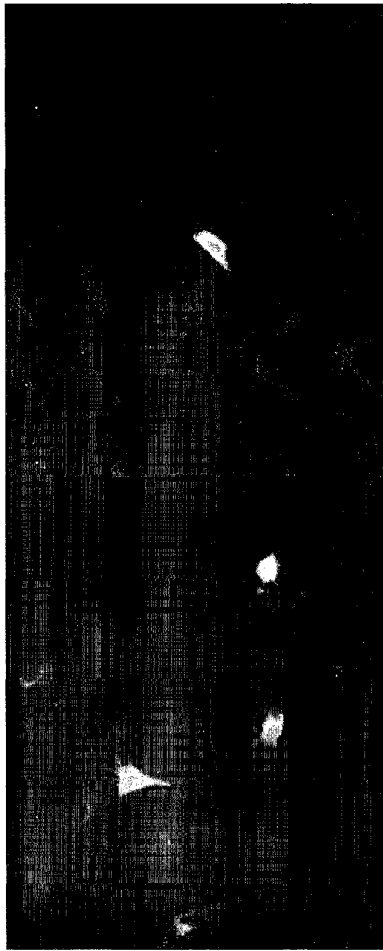


Figure 2

Figure 3A



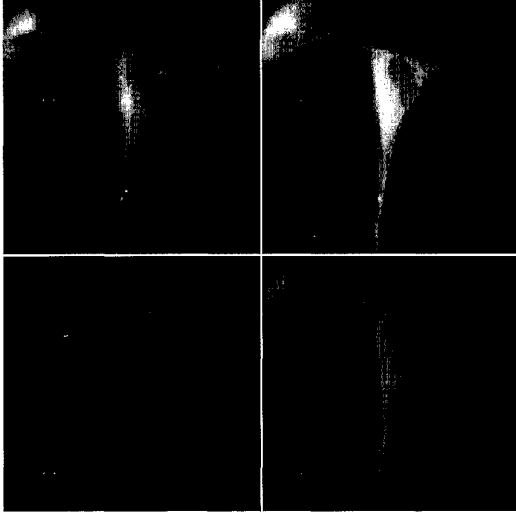


Figure 3B

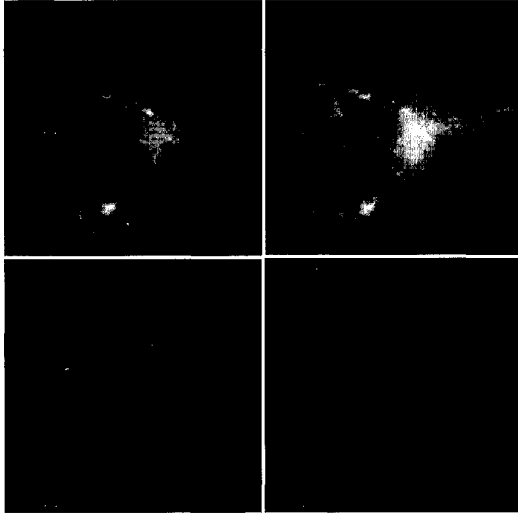


Figure 3C

Figure 4A

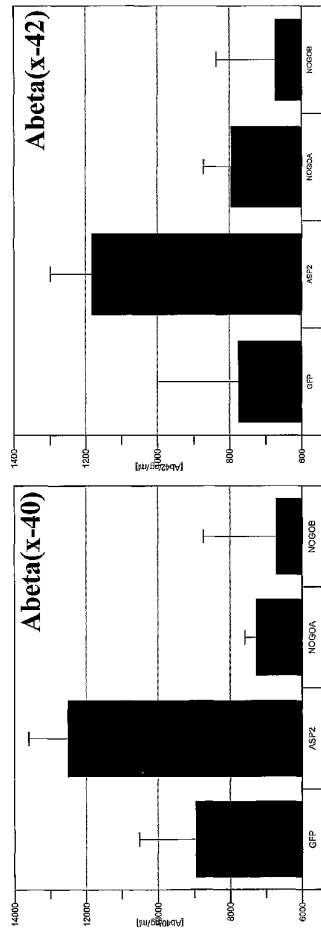
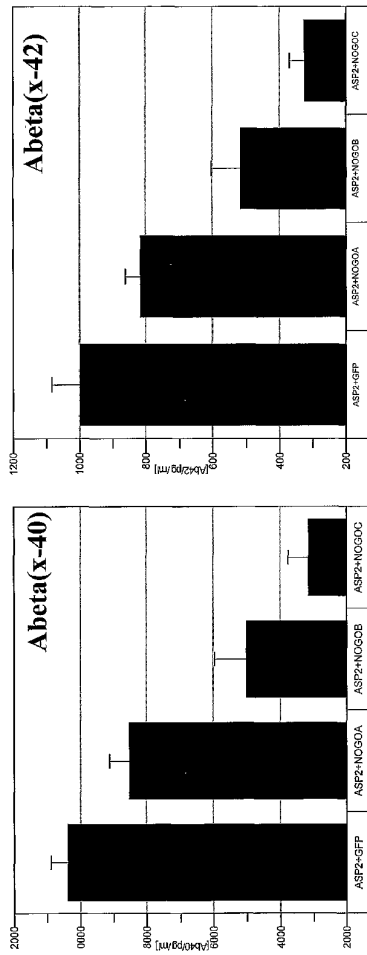


Figure 4B



WO 02/057483

PCT/GB02/00228

1/24

SEQUENCE LISTING

```

<110> GLAXO GROUP LIMITED
5 <120> ASSAY
  <130> PB0966 GCW
  <160> 13
  <170> PatentIn version 3.0<210> 1<211> 2526<212> DNA<213> Homo sapiens
10 <220><221> CDS<222> (454)..(1959)
  <400> 1
  ccacgcctcc gaagcccgcc cgggagctgc gagccgcgag ctggttatg gtggcctgag 60
  cagccaactgc agccacagga gcccgagccc ctgacccttg cccgcgctgc cggccgccc 120
  gggagccagg gaagccgca cgggcccgc atgcccgcc ccccagctc cggcggagcc 180
  ccagcctcgc taccagcct gcgcgctgc gtgagatgc agcgatctc gactccagc 240
  ctctccctg ctctcgtact ctgagatct cctctgaccg ctctccacg cccagaccg 300
  gggctggcc caggccctg cagccctgg cgtctgatg ccccagact cctctctctg 360
  agaagccacc agaccacc agacttggg gcagccgcca ggcagagc tggccatgt 420
  cgagccaga ggcgccgag gccgggccc acc atg gcc caa gcc ctg ccc tgg 474
  Met Ala Gln Ala Leu Pro Trp
  1 5
20
  ctc ctg ctg tgg atg gcc gcg gga gtg ctg cct gcc cac ggc acc cag 522
  Leu Leu Leu Trp Met Gly Ala Gly Val Leu Pro Ala His Gly Thr Gln
  10 15 20
25
  cac ggc atc cgg ctg ccc ctg cgc agc gcc ctg ggg ggc gcc ccc ctg 570
  His Gly Ile Arg Leu Pro Leu Arg Ser Gly Leu Gly Gly Ala Pro Leu
  25 30 35
30
  ggg ctg cgg ctg ccc cgg gag acc gac gaa gag ccc gag gag ccc gcc 618
  Gly Leu Arg Leu Pro Arg Glu Thr Asp Glu Glu Pro Glu Glu Pro Gly
  40 45 50 55
35
  cgg agg gac agc ttt gta gag atg gtg gac aac ctg ggg ggc aag tgc 666
  Arg Arg Gly Ser Phe Val Glu Met Val Asp Asn Leu Arg Gly Lys Ser
  60 65 70
40
  ggg cag gcc tac tac gtg gag atg acc gtg gcc agc ccc ccg cag acg 714
  Gly Gln Gly Tyr Tyr Val Glu Met Thr Val Gly Ser Pro Pro Gln Thr
  75 80 85
45
  ctc aac atc ctg gtg gat aca gcc agc agt aac ttt gca gtg ggt gct 762
  Leu Asn Ile Leu Val Asp Thr Gly Ser Ser Asn Phe Ala Val Gly Ala
  90 95 100
50
  gcc ccc cac ccc ttc ctg cat cgc tac tac cag agg cag ctg tcc agc 810
  Ala Pro His Pro Phe Leu His Arg Tyr Tyr Gln Arg Gln Leu Ser Ser
  105 110 115
55
  aca tac cgg gac ctg cgg aag ggt gtg tat gtg ccc tac acc cag gcc 858
  Thr Tyr Arg Asp Leu Arg Lys Gly Val Tyr Val Pro Tyr Thr Gln Gly
  120 125 130 135
  aag tgg gaa ggg gag ctg gcc acc gac ctg gta agc atc ccc cat gcc 906
  Lys Trp Glu Gly Glu Leu Gly Thr Asp Leu Val Ser Ile Pro His Gly
  140 145 150
  ccc aac gtc act gtg cgt gcc aac att gct gcc atc act gaa tca gac 954

```

WO 02/057483

2/24

PCT/GB02/00228

| | | |
|----|--|------|
| | Pro Asn Val Thr Val Arg Ala Asn Ile Ala Ala Ile Thr Glu Ser Asp | |
| | 155 160 165 | |
| 5 | aag ttc ttc atc aac ggc tcc aac tgg gaa ggc atc ctg ggg ctg gcc Lys Phe Phe Ile Asn Gly Ser Asn Trp Glu Gly Ile Leu Gly Leu Ala | 1002 |
| | 170 175 180 | |
| 10 | tat gct gag att gcc agg cct gac gac tcc ctg gag cct ttc ttt gac Tyr Ala Glu Ile Ala Arg Pro Asp Asp Ser Leu Glu Pro Phe Phe Asp | 1050 |
| | 185 190 195 | |
| 15 | tct ctg gta aag cag acc cac gtt ccc aac ctg ttc tcc ctg cag ctt Ser Leu Val Lys Gln Thr His Val Pro Asn Leu Phe Ser Leu Gln Leu | 1098 |
| | 200 205 210 215 | |
| 20 | tgt ggt gct ggc ttc ccc ctg aac cag tct gaa gtg ctg gcc tct gtc Cys Gly Ala Gly Phe Pro Leu Asn Gln Ser Glu Val Leu Ala Ser Val | 1146 |
| | 220 225 230 | |
| 25 | gga ggg agc atg atc att gga ggt atc gac cac tgg ctg tac aca ggc Gly Gly Ser Met Ile Ile Gly Gly Ile Asp His Ser Leu Tyr Thr Gly | 1194 |
| | 235 240 245 | |
| 30 | agt ctg tgg tat aca ccc atc cgg cgg gag tgg tat tat gag gtg atc Ser Leu Trp Tyr Thr Pro Ile Arg Arg Glu Trp Tyr Tyr Glu Val Ile | 1242 |
| | 250 255 260 | |
| 35 | att gtg cgg gtg gag atc aat gga cag gat ctg aaa atg gac tgc aag Ile Val Arg Val Glu Ile Asn Gly Gln Asp Leu Lys Met Asp Cys Lys | 1290 |
| | 265 270 275 | |
| 40 | gag tac aac tat gac aag agc att gtg gac agt ggc acc acc aac ctt Glu Tyr Asn Tyr Asp Lys Ser Ile Val Asp Ser Gly Thr Thr Asn Leu | 1338 |
| | 280 285 290 295 | |
| 45 | cgt ttg ccc aag aaa gtg ttt gaa gct gca atc aaa tcc atc aag gca Arg Leu Pro Lys Lys Val Phe Glu Ala Ala Val Lys Ser Ile Lys Ala | 1386 |
| | 300 305 310 | |
| 50 | gcc tcc tcc acg gag aag ttc cct gat ggt ttc tgg cta gga gag cag Ala Ser Ser Thr Glu Lys Phe Pro Asp Gly Phe Trp Leu Gly Glu Gln | 1434 |
| | 315 320 325 | |
| 55 | ctg gtg tgc tgg caa gca ggc acc acc cct tgg aac att ttc cca gtc Leu Val Cys Trp Gln Ala Gly Thr Thr Pro Trp Asn Ile Phe Pro Val | 1482 |
| | 330 335 340 | |
| 60 | atc tca ctg tac cta atg ggt gag gtt acc aac cag tcc ttc ggc atc Ile Ser Leu Tyr Leu Met Gly Glu Val Thr Asn Gln Ser Phe Arg Ile | 1530 |
| | 345 350 355 | |
| 65 | acc atc ctt ccg cag caa tac ctg cgg cca atg gaa gat gtg gcc acg Thr Ile Leu Pro Gln Gln Tyr Leu Arg Pro Val Glu Asp Val Ala Thr | 1578 |
| | 360 365 370 375 | |
| 70 | tcc caa gac gac tgt tac aag ttt gcc atc tca cag tca tcc acg ggc Ser Gln Asp Asp Cys Tyr Lys Phe Ala Ile Ser Gln Ser Ser Thr Gly | 1626 |
| | 380 385 390 | |

WO 02/057483

3/24

PCT/GB02/00228

act gtt atg gga gct gtt atc atg gag ggc ttc tac gtt gtc ttt gat 1674
 Thr Val Met Gly Ala Val Ile Met Glu Gly Phe Tyr Val Val Phe Asp
 395 400 405

5 cgg gcc cga aaa cga att ggc ttt gct glc agc gct tgc cat gtc cac 1722
 Arg Ala Arg Lys Arg Ile Gly Phe Ala Val Ser Ala Cys His Val His
 410 415 420

10 gat gag ttc agg acg gca gcc gtc gaa ggc cct ttt gtc acc ttg gac 1770
 Asp Glu Phe Arg Thr Ala Ala Val Glu Gly Pro Phe Val Thr Leu Asp
 425 430 435

15 atg gaa gac tgt ggc tac aac att cca cag aca gat gag tca acc ctc 1818
 Met Glu Asp Cys Gly Tyr Asn Ile Pro Gln Thr Asp Glu Ser Thr Leu
 440 445 450 455

atg acc ata gcc tat gtc atg gct gcc atc tgc gcc ctc ttc atg ctg 1866
 Met Thr Ile Ala Tyr Val Met Ala Ala Ile Cys Ala Leu Phe Met Leu
 460 465 470

20 cca ctc tgc ctc atg tgc tgc tag tgc tgc tgc cgc tgc ctg cgc 1914
 Pro Leu Cys Leu Met Val Cys Gln Trp Arg Cys Leu Arg Cys Leu Arg
 475 480 485

25 cag cag cat gat gac ttt gct gat gac atc tcc ctg ctg aag tga 1959
 Gln Gln His Asp Asp Phe Ala Asp Asp Ile Ser Leu Leu Lys
 490 495 500

30 ggaggccat gggcagaaga tagagattcc cctggaccac acctcctggt ttcactttgg 2019
 tcacaagtga gagacacaga tggcaccctgt gccagagaca cctcaggacc ctcccaccc 2079
 accaatgccc tctgccttga tggagaaga aaaggctgac aaggtgggtt ccagggactg 2139
 taactgtagg aaacagaaaa gagaagaag aagcactctg ctggcgggaa tactcttgg 2199
 caccccaat taaagtcggg aaattctgct gcttgaact tcagccctga accttgcctc 2259
 accatcctt taatctcc acccaaat attctcttt tcttagctc agaagctctg 2319
 35 scatccacg caagtaact tggcgtat cctctgata cctcgcga gaagagcca 2379
 agcttattc cctgctgccc aaagcagta gggagagat cacatttgc tattgcttt 2439
 agagacagg actglataaa caagcctaac attggtgcaa agattgctc tgaattaaa 2499
 aaaaaaact agaaaaaaa aaaaaaa 2526

40 <210> 2<211> 501<212> PRT<213> Homo sapiens
 <400> 2
 Met Ala Gln Ala Leu Pro Trp Leu Leu Trp Met Gly Ala Gly Val
 1 5 10 15

45 Leu Pro Ala His Gly Thr Gln His Gly Ile Arg Leu Pro Leu Arg Ser
 20 25 30
 Gly Leu Gly Gly Ala Pro Leu Gly Leu Arg Leu Pro Arg Glu Thr Asp
 35 40 45

50 Glu Glu Pro Glu Glu Pro Gly Arg Arg Gly Ser Phe Val Glu Met Val
 50 55 60

55 Asp Asn Leu Arg Gly Lys Ser Gly Gln Gly Tyr Tyr Val Glu Met Thr
 65 70 75 80
 Val Gly Ser Pro Pro Gln Thr Leu Asn Ile Leu Val Asp Thr Gly Ser
 85 90 95

WO 02/057483

4/24

PCT/GB02/00228

Ser Asn Phe Ala Val Gly Ala Ala Pro His Pro Phe Leu His Arg Tyr
100 105 110

5 Tyr Gln Arg Gln Leu Ser Ser Thr Tyr Arg Asp Leu Arg Lys Gly Val
115 120 125

Tyr Val Pro Tyr Thr Gln Gly Lys Trp Glu Gly Glu Leu Gly Thr Asp
130 135 140

10 Leu Val Ser Ile Pro His Gly Pro Asn Val Thr Val Arg Ala Asn Ile
145 150 155 160

Ala Ala Ile Thr Glu Ser Asp Lys Phe Phe Ile Asn Gly Ser Asn Trp
165 170 175

15 Glu Gly Ile Leu Gly Leu Ala Tyr Ala Glu Ile Ala Arg Pro Asp Asp
180 185 190

20 Ser Leu Glu Pro Phe Phe Asp Ser Leu Val Lys Gln Thr His Val Pro
195 200 205

Asn Leu Phe Ser Leu Gln Leu Cys Gly Ala Gly Phe Pro Leu Asn Gln
210 215 220

25 Ser Glu Val Leu Ala Ser Val Gly Gly Ser Met Ile Ile Gly Gly Ile
225 230 235 240

Asp His Ser Leu Tyr Thr Gly Ser Leu Trp Tyr Thr Pro Ile Arg Arg
245 250 255

30 Glu Trp Tyr Tyr Glu Val Ile Ile Val Arg Val Glu Ile Asn Gly Gln
260 265 270

35 Asp Leu Lys Met Asp Cys Lys Glu Tyr Asn Tyr Asp Lys Ser Ile Val
275 280 285

Asp Ser Gly Thr Thr Asn Leu Arg Leu Pro Lys Lys Val Phe Glu Ala
290 295 300

40 Ala Val Lys Ser Ile Lys Ala Ala Ser Ser Thr Glu Lys Phe Pro Asp
305 310 315 320

Gly Phe Trp Leu Gly Glu Gln Leu Val Cys Trp Gln Ala Gly Thr Thr
325 330 335

45 Pro Trp Asn Ile Phe Pro Val Ile Ser Leu Tyr Leu Met Gly Glu Val
340 345 350

50 Thr Asn Gln Ser Phe Arg Ile Thr Ile Leu Pro Gln Gln Tyr Leu Arg
355 360 365

Pro Val Glu Asp Val Ala Thr Ser Gln Asp Asp Cys Tyr Lys Phe Ala
370 375 380

55 Ile Ser Gln Ser Ser Thr Gly Thr Val Met Gly Ala Val Ile Met Glu
385 390 395 400

Gly Phe Tyr Val Val Phe Asp Arg Ala Arg Lys Arg Ile Phe Ala
405 410 415

WO 02/057483

5/24

PCT/GB02/00228

Val Ser Ala Cys His Val His Asp Glu Phe Arg Thr Ala Ala Val Glu
420 425 430

5 Gly Pro Phe Val Thr Leu Asp Met Glu Asp Cys Gly Tyr Asn Ile Pro
435 440 445

Gln Thr Asp Glu Ser Thr Leu Met Thr Ile Ala Tyr Val Met Ala Ala
450 455 460

10 Ile Cys Ala Leu Phe Met Leu Pro Leu Cys Leu Met Val Cys Gln Trp
465 470 475 480

15 Arg Cys Leu Arg Cys Leu Arg Gln Gln His Asp Asp Phe Ala Asp Asp
485 490 495

Ile Ser Leu Leu Lys
500

20 <210> 3<211> 2052<212> DNA<213> Homo sapiens
<220><221> CDS<222> (67)..(1188)
<400> 3
cgcgctctg agacagagcc ccggcggcg ccgacagcgc tgcagcatca tctccacct 60
ccagcc atg gaa gac ctg gac cag tct cct ctg gtc tgc tcc tgg gac 108
Met Glu Asp Leu Asp Gln Ser Pro Leu Val Ser Ser Ser Asp
1 5 10

30 agc cca ccc cgg ccg cag ccc gcg ttc aag tac cag ttc gtc agg gag 156
Ser Pro Pro Arg Pro Gln Pro Ala Phe Lys Tyr Gln Phe Val Arg Glu
15 20 25 30

35 ccc gag gac gag gag gaa gaa gag gag gaa gag gag gac gag gac 204
Pro Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp
35 40 45

40 gaa gac ctg gag gag ctg gag gtc ctg gag agg aag ccc gcc gcc ggg 252
Glu Asp Leu Glu Glu Leu Glu Val Leu Glu Arg Lys Pro Ala Ala Gly
50 55 60

45 ctg tcc gcg gcc cca gtc ccc acc gcc cct gcc gcc gcc gcc gcc ctg 300
Leu Ser Ala Ala Pro Val Pro Thr Ala Pro Ala Ala Ala Gly Ala Pro Leu
65 70 75

atg gac ttc gga aat gac ttc gtc ccg ccg gcg ccc cgg gga ccc ctg 348
Met Asp Phe Gly Asn Asp Phe Val Pro Pro Ala Pro Arg Gly Pro Leu
80 85 90

50 ccg gcc gct ccc ccc gtc gcc ccg gag cgg cag ccg tgt tgg gac ccg 396
Pro Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Glu Arg Gln Pro Cys Trp Asp Pro
95 100 105 110

agc ccg gtc tgc tgc acc gtc ccc gcg cca tcc ccg ctg tct gct gcc 444
Ser Pro Val Ser Ser Thr Val Pro Ala Pro Ser Pro Leu Ser Ala Ala
115 120 125

55 gca gtc tgc ccc tcc aag ctg cct cag gac gac gag cct ccg gcc cgg 492
Ala Val Ser Pro Ser Lys Leu Pro Gln Asp Asp Glu Pro Pro Ala Arg
130 135 140

WO 02/057483

6/24

PCT/GB02/00228

| | | |
|----|---|------|
| | cct ccc cct cct ccc ccc gcc agc gtg agc ccc cag gca gag ccc gtg Pro Pro Pro Pro Pro Ala Ser Val Ser Pro Gln Ala Glu Pro Val 145 150 155 | 540 |
| 5 | tgg acc ccg cca gcc ccg gct ccc gcc gcg ccc ccc tcc acc ccg gcc Trp Thr Pro Pro Ala Pro Ala Ala Pro Pro Ser Thr Pro Ala 160 165 170 | 588 |
| 10 | gca ccc aag cgc agg gcc tcc tca gcc tca gtg gtt gtt gac ctc ctg Ala Pro Lys Arg Arg Gly Ser Ser Gly Ser Val Val Val Asp Leu Leu 175 180 185 | 636 |
| 15 | tac tgg aga gac att aag aac act gga gtg gtt ttt ggt gcc agc cta Tyr Trp Arg Asp Ile Lys Lys Thr Gly Val Val Phe Gly Ala Ser Leu 195 200 205 | 684 |
| 20 | ttc ctg ctg ctt tca ttg aca gta ttc agc att gtg agc gta aca gcc Phe Leu Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe Ser Ile Val Ser Val Thr Ala 210 215 220 | 732 |
| | tac att gcc ttg gcc ctg ctc tct ggg acc atc agc ttt agg ata tac Tyr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Ser Val Thr Ile Ser Phe Arg Ile Tyr 225 230 235 | 780 |
| 25 | aag ggt gtg atc caa gct atc cag aaa tca gat gaa gcc cac cca ttc Lys Gly Val Ile Gln Ala Ile Gln Lys Ser Asp Gly Gly His Pro Phe 240 245 250 | 828 |
| 30 | agg gcc tat ctg gaa tct gaa gtt gct ata tct gag gag ttg gtt cag Arg Ala Tyr Leu Glu Ser Glu Val Ala Ile Ser Glu Glu Leu Val Gln 255 260 265 270 | 876 |
| 35 | aag tac agt aat tct gct ctt ggt cat gtg aac tgc acg ata aag gaa Lys Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Gly His Val Asn Cys Thr Ile Lys Glu 275 280 285 | 924 |
| 40 | ctc agg cgc ctc ttc tta gtt gat gat tta gtt gat tct ctg aag ttt Leu Arg Arg Leu Phe Leu Val Asp Asp Leu Val Asp Ser Leu Lys Phe 290 295 300 | 972 |
| | gca gtg ttg atg tgg gta ttt acc tat gtt ggt gcc ttg ttt aat ggt Ala Val Leu Met Trp Val Phe Thr Tyr Val Gly Ala Leu Phe Asn Gly 305 310 315 | 1020 |
| 45 | ctg aca cta ctg att ttg gct ctc att tca ctc ttc agt gtt cct gtt Leu Thr Leu Leu Ile Leu Ala Leu Ile Ser Leu Phe Ser Val Pro Val 320 325 330 | 1068 |
| 50 | att tat gaa cgg cat cag gca cag ata gat cat tat cta gga ctt gca Ile Tyr Glu Arg His Gln Ala Gln Ile Asp His Tyr Leu Gly Leu Ala 335 340 345 350 | 1116 |
| 55 | aat aag aat gtt aaa gat gct atg gct aaa atc caa gca aaa atc cct Asn Lys Asn Val Lys Asp Ala Met Ala Lys Ile Gln Ala Lys Ile Pro 355 360 365 . | 1164 |
| | gga ttg aag cgc aaa gct gaa tga aaacgccaa aataattagt aggagttcat Gly Leu Lys Arg Lys Ala Glu 370 | 1218 |

WO 02/057483

8/24

PCT/GB02/00228

210 215 220
 Ala Leu Ala Leu Leu Ser Val Thr Ile Ser Phe Arg Ile Tyr Lys Gly
 225 230 235 240
 5 Val Ile Gln Ala Ile Gln Lys Ser Asp Glu Gly His Pro Phe Arg Ala
 245 250 255
 Tyr Leu Glu Ser Glu Val Ala Ile Ser Glu Glu Leu Val Gln Lys Tyr
 10 260 265 270
 Ser Asn Ser Ala Leu Gly His Val Asn Cys Thr Ile Lys Glu Leu Arg
 275 280 285
 15 Arg Leu Phe Leu Val Asp Asp Leu Val Asp Ser Leu Lys Phe Ala Val
 290 295 300
 Leu Met Trp Val Phe Thr Tyr Val Gly Ala Leu Phe Asn Gly Leu Thr
 20 305 310 315 320
 Leu Leu Ile Leu Ala Leu Ile Ser Leu Phe Ser Val Pro Val Ile Tyr
 325 330 335
 25 Glu Arg His Gln Ala Gln Ile Asp His Tyr Leu Gly Leu Ala Asn Lys
 340 345 350
 Asn Val Lys Asp Ala Met Ala Lys Ile Gln Ala Lys Ile Pro Gly Leu
 355 360 365
 30 Lys Arg Lys Ala Glu
 370
 <210> 5<211> 13<212> PRT<213> Homo sapiens
 <400> 5
 35 Gly Pro Leu Pro Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Glu Arg
 1 5 10
 <210> 6<211> 14<212> PRT<213> Homo sapiens
 <400> 6
 40 Gly Ser Ser Gly Ser Val Val Val Asp Leu Leu Tyr Trp Arg
 1 5 10
 <210> 7<211> 14<212> PRT<213> Homo sapiens
 <400> 7
 45 Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Gly His Val Asn Cys Thr Ile Lys
 1 5 10
 <210> 8<211> 3579<212> DNA<213> Homo sapiens
 <220><221> CDS<222> (1)..(3579)
 <400> 8
 atg gaa gac ctg gac caa tct cct ctg gtc tgg tcc tgg gac agc cca 48
 Met Glu Asp Leu Asp Gln Ser Pro Leu Val Ser Ser Ser Asp Ser Pro
 1 5 10 15
 55 ccc cgg ccg cag ccc gcg ttc aag tac cag ttc gtg agg gag ccc gag 96
 Pro Arg Pro Gln Pro Ala Phe Lys Tyr Gln Phe Val Arg Glu Pro Glu
 20 25 30
 gac gag gag gaa gaa gag gag gaa gag gag gac gag gac gaa gac 144

WO 02/057483

9/24

PCT/GB02/00228

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | Asp | Glu | Glu | Glu | Glu | Glu | Glu | Glu | Glu | Glu | Asp | Glu | Asp | Glu | Asp | | |
| | 35 | | | | | | | | | 40 | | | | | 45 | | |
| 5 | ctg | gag | gag | ctg | gag | gta | ctg | gag | agg | aag | ccc | gcc | gcc | ggg | ctg | ccc | 192 |
| | Leu | Glu | Glu | Leu | Glu | Val | Leu | Glu | Arg | Lys | Pro | Ala | Ala | Gly | Leu | Ser | |
| | 50 | | | | | | 55 | | | | | | | | 60 | | |
| 10 | gcc | gcc | cca | ctg | ccc | acc | gcc | ccc | ccc | gcc | ggc | ggc | ccc | ctg | atg | gac | 240 |
| | Ala | Ala | Pro | Val | Pro | Thr | Ala | Pro | Ala | Ala | Gly | Ala | Pro | Leu | Met | Asp | |
| | 65 | | | | | | 70 | | | | 75 | | | | 80 | | |
| 15 | ttc | gga | aat | gac | ttc | gtg | ccg | ccg | ggc | ccc | ggg | gga | ccc | ctg | ccg | gcc | 288 |
| | Phe | Gly | Asn | Asp | Phe | Val | Pro | Pro | Ala | Pro | Arg | Gly | Pro | Leu | Pro | Ala | |
| | 85 | | | | | | | | | 90 | | | | | 95 | | |
| 20 | gct | ccc | ccc | gtc | ccc | ccg | gag | agg | cag | ccg | tct | tgg | gac | ccg | agc | ccg | 336 |
| | Ala | Pro | Pro | Val | Ala | Pro | Glu | Arg | Gln | Pro | Ser | Trp | Asp | Pro | Ser | Pro | |
| | 100 | | | | | | | | | 105 | | | | | 110 | | |
| 25 | gtg | tcg | tcg | acc | gtg | ccc | ggg | cca | ccc | ccc | ctg | tct | gct | gcc | gca | gtc | 384 |
| | Val | Ser | Thr | Val | Pro | Ala | Pro | Ser | Pro | Leu | Ser | Ala | Ala | Ala | Val | | |
| | 115 | | | | | | | 120 | | | | | 125 | | | | |
| 30 | tcg | ccc | ccc | aac | ctc | ccc | gag | gac | gag | ccc | ccc | gca | ggg | ccc | ctc | ccc | 432 |
| | Ser | Pro | Ser | Lys | Leu | Pro | Glu | Asp | Asp | Glu | Pro | Pro | Ala | Arg | Pro | Pro | |
| | 130 | | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | |
| 35 | ccc | ccc | ccc | ccg | gcc | agc | gtg | agc | ccc | ccc | gca | ggg | ccc | gtg | tgg | acc | 480 |
| | Pro | Pro | Pro | Pro | Ala | Ser | Val | Ser | Pro | Gln | Ala | Glu | Pro | Val | Trp | Thr | |
| | 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | | 160 | | |
| 40 | ccc | cca | gcc | ccg | gct | ccc | gcc | ggg | ccc | ccc | ccc | acc | ccg | gcc | ggg | ccc | 528 |
| | Pro | Pro | Ala | Pro | Ala | Pro | Ala | Ala | Pro | Pro | Ser | Thr | Pro | Ala | Ala | Pro | |
| | 165 | | | | | | | | | | 170 | | | | 175 | | |
| 45 | aag | cgc | agg | ggc | ccc | tcg | ggc | cca | gtg | gat | gag | acc | ctt | ttt | gct | ctt | 576 |
| | Lys | Arg | Arg | Gly | Ser | Ser | Gly | Ser | Val | Asp | Glu | Thr | Leu | Phe | Ala | Leu | |
| | 180 | | | | | | | | | 185 | | | | | 190 | | |
| 50 | ccc | gct | gca | tct | gag | ccc | gtg | ata | cgc | ccc | tct | gca | gaa | aat | atg | gac | 624 |
| | Pro | Ala | Ala | Ser | Glu | Pro | Val | Ile | Arg | Ser | Ser | Ala | Glu | Asn | Met | Asp | |
| | 195 | | | | | | 200 | | | | | | | | 205 | | |
| 55 | ttg | aag | gag | cag | cca | ggt | aac | act | att | tcg | gct | ggt | caa | gag | gat | ttc | 672 |
| | Leu | Lys | Glu | Gln | Pro | Gly | Asn | Thr | Ile | Ser | Ala | Gly | Gln | Glu | Asp | Phe | |
| | 210 | | | | | | 215 | | | | | | 220 | | | | |
| 60 | cca | tct | gtc | ctg | ctt | gaa | act | gct | gct | tct | ctt | ccc | tct | ctg | tct | ccc | 720 |
| | Pro | Ser | Val | Leu | Leu | Glu | Thr | Ala | Ala | Ser | Leu | Pro | Ser | Leu | Ser | Pro | |
| | 225 | | | | | | 230 | | | | | | 235 | | | 240 | |
| 65 | ctc | tca | gcc | gct | tct | ttc | aaa | gaa | cat | gaa | tac | ctt | ggt | aat | ttg | tca | 768 |
| | Leu | Ser | Ala | Ala | Ser | Phe | Lys | Glu | His | Glu | Tyr | Leu | Gly | Asn | Leu | Ser | |
| | 245 | | | | | | | | | 250 | | | | | 255 | | |
| 70 | aca | gta | tta | ccc | act | gaa | gga | aca | ctt | caa | gaa | aat | gtc | agt | gaa | gct | 816 |
| | Thr | Val | Leu | Pro | Thr | Glu | Gly | Thr | Leu | Gln | Glu | Asn | Val | Ser | Glu | Ala | |
| | 260 | | | | | | | | 265 | | | | | | 270 | | |

WO 02/057483

10/24

PCT/GB02/00228

| | | |
|----|--|------|
| | tct aaa gag gtc tca gag aag gca aaa act cta ctc ata gat aga gat Ser Lys Glu Val Ser Glu Lys Ala Lys Thr Leu Leu Ile Asp Arg Asp | 864 |
| | 275 280 285 | |
| 5 | tta aca gag ttt tca gaa tta gaa tac tca gaa atg gga tca tcy ttc Leu Thr Glu Phe Ser Glu Leu Glu Tyr Ser Glu Met Gly Ser Ser Phe | 912 |
| | 290 295 300 | |
| 10 | agt gtc tct cca aaa gca gaa tct gcc gta ata gta gca aat cct agg Ser Val Ser Pro Lys Ala Glu Ser Ala Val Ile Val Ala Asn Pro Arg | 960 |
| | 305 310 315 320 | |
| 15 | gaa gaa ata atc gtg aaa aat aaa gat gaa gaa gag aag tta gtt agt Glu Glu Ile Ile Val Lys Asn Lys Asp Glu Glu Lys Leu Val Ser | 1008 |
| | 325 330 335 | |
| 20 | aat aac atc ctt cat aat caa caa gag tta cct aca gct ctt act aaa Asn Asn Ile Leu His Asn Gln Gln Glu Leu Pro Thr Ala Leu Thr Lys | 1056 |
| | 340 345 350 | |
| 25 | tgg gtt aaa gag gat gaa gtt gtc tct tca gaa aaa gca aaa gac agt Leu Val Lys Glu Asp Glu Val Val Ser Ser Glu Lys Ala Lys Asp Ser | 1104 |
| | 355 360 365 | |
| 30 | ttt aat gaa aag aga gtt gca gtc gaa gct cct atg agg gag gaa tat Phe Asn Glu Lys Arg Val Ala Val Glu Ala Pro Met Arg Glu Glu Tyr | 1152 |
| | 370 375 380 | |
| 35 | gca gac ttc aaa cca ttt gag cga gta tgg gaa gtc aaa gat agt aag Ala Asp Phe Lys Pro Phe Glu Arg Val Trp Glu Val Lys Asp Ser Lys | 1200 |
| | 385 390 395 400 | |
| 40 | gaa gat agt gat atg ttg gct gct gga ggt aaa atc gag agc aac ttg Glu Asp Ser Asp Met Leu Ala Ala Gly Gly Lys Ile Glu Ser Asn Leu | 1248 |
| | 405 410 415 | |
| 45 | gaa agt aaa gtc gat aaa aaa tgt ttt gca gat agc ctt gag caa act Glu Ser Lys Val Asp Lys Lys Cys Phe Ala Asp Ser Leu Glu Gln Thr | 1296 |
| | 420 425 430 | |
| 50 | aat cac gaa aaa gat agt gag agt agt aat gat gat act tct ttc ccc Asn His Glu Lys Asp Ser Glu Ser Ser Asn Asp Asp Thr Ser Phe Pro | 1344 |
| | 435 440 445 | |
| 55 | agt acg cca gaa ggt ata aag gat cgt cca gga gca tat atc aca tgt Ser Thr Pro Glu Gly Ile Lys Asp Arg Pro Gly Ala Tyr Ile Thr Cys | 1392 |
| | 450 455 460 | |
| 60 | gct ccc ttt aac cca gca gca act gag agc att gca aca aac att ttt Ala Pro Phe Asn Pro Ala Ala Thr Glu Ser Ile Ala Thr Asn Ile Phe | 1440 |
| | 465 470 475 480 | |
| 65 | cct ttg tta gaa gat cct act tca gaa aat aag acc gat gaa aaa aaa Pro Leu Leu Gly Asp Pro Thr Ser Glu Asn Lys Thr Asp Glu Lys Lys | 1488 |
| | 485 490 495 | |
| 70 | ata gaa gaa aag aag gcc caa ata gta aca gag aag aat act agc acc Ile Glu Glu Lys Lys Ala Gln Ile Val Thr Glu Lys Asn Thr Ser Thr | 1536 |
| | 500 505 510 | |

WO 02/057483

11/24

PCT/GB02/00228

5 aaa aca tca aac cct ttt ctt gta gca gca cag gat tct gag aca gat 1584
 Lys Thr Ser Asn Pro Phe Leu Val Ala Ala Gln Asp Ser Glu Thr Asp
 515 520 525

5 tat gtc aca aca gat aat tta aca aag gtc act gag gaa gtc gtc gca 1632
 Tyr Val Thr Thr Asp Asn Leu Thr Lys Val Thr Glu Glu Val Val Ala
 530 535 540

10 aac atg cct gaa gcc ctg act cca gat tta gta cag gaa gca tgt gaa 1680
 Asn Met Pro Glu Gly Leu Thr Pro Asp Leu Val Gln Glu Ala Cys Glu
 545 550 555 560

15 agt gaa ttg aat gaa gtt act ggt aca aag att gct tat gaa aca aaa 1728
 Ser Glu Leu Asn Glu Val Thr Gly Thr Lys Ile Ala Tyr Glu Thr Lys
 565 570 575

20 atg gac ttg gtt caa aca tca gaa gtt atg caa gag tca ctc tat cct 1776
 Met Asp Leu Val Gln Thr Ser Glu Val Met Gln Glu Ser Leu Tyr Pro
 580 585 590

25 gca gca cag ctt tgc cca tca ttt gaa gag tca gaa gct act cct tca 1824
 Ala Ala Gln Leu Cys Pro Ser Phe Glu Glu Ser Glu Ala Thr Pro Ser
 595 600 605

30 cca gtt ttg cct gac att gtt atg gaa gca cca ttg aat tct gca gtt 1872
 Pro Val Leu Pro Asp Ile Val Met Glu Ala Pro Leu Asn Ser Ala Val
 610 615 620

35 cct agt gct ggt gct tcc gtg ata cag ccc agc tca tca cca tta gaa 1920
 Pro Ser Ala Gly Ala Ser Val Ile Gln Pro Ser Ser Ser Pro Leu Glu
 625 630 635 640

35 gct tct tca gtt aat tat gaa agc ata aaa cat gag cct gaa aac ccc 1968
 Ala Ser Ser Val Asn Tyr Glu Ser Ile Lys His Glu Pro Glu Asn Pro
 645 650 655

40 cca cca tat gaa gag gcc atg agt gta tca cta aaa aaa gta tca gga 2016
 Pro Pro Tyr Glu Glu Ala Met Ser Val Ser Leu Lys Lys Val Ser Gly
 660 665 670

45 ata aag gaa gaa att aaa gag cct gaa aat att aat gca gct ctt caa 2064
 Ile Lys Glu Glu Ile Lys Glu Pro Glu Asn Ile Asn Ala Ala Leu Gln
 675 680 685

50 gaa aca gaa gct cct tat ata tct att gca tgt gat tta att aaa gaa 2112
 Glu Thr Glu Ala Pro Tyr Ile Ser Ile Ala Cys Asp Leu Ile Lys Glu
 690 695 700

50 aca aag ctt tct gct gaa cca gct ccg gat ttc tct gat tat tca gaa 2160
 Thr Lys Leu Ser Ala Glu Pro Ala Pro Asp Phe Ser Asp Tyr Ser Glu
 705 710 715 720

55 atg gca aaa gtt gaa cag cca gtg cct gat cat tct gag cta gtt gaa 2208
 Met Ala Lys Val Glu Gln Pro Val Pro Asp His Ser Glu Leu Val Glu
 725 730 735

gat tcc tca cct gat tct gaa cca gtt gac tta ttt agt gat gat tca 2256
 Asp Ser Ser Pro Asp Ser Glu Pro Val Asp Leu Phe Ser Asp Asp Ser

WO 02/057483

12/24

PCT/GB02/00228

| | 740 | 745 | 750 | |
|----|---|-----|-----|------|
| | ata cct gac gtt cca caa aaa caa gat gaa act gtg atg ctt gtg aaa | | | 2304 |
| 5 | Ile Pro Asp Val Pro Gln Lys Gln Asp Glu Thr Val Met Leu Val Lys | | | |
| | 755 | 760 | 765 | |
| | gaa agt ctc act gag act tca ttt gag tca atg ata gaa tat gaa aat | | | 2352 |
| 10 | Glu Ser Leu Thr Glu Thr Ser Phe Glu Ser Met Ile Glu Tyr Glu Asn | | | |
| | 770 | 775 | 780 | |
| | aag gaa aaa ctc agt gct ttg cca cct gag gga gga aag cca tat ttg | | | 2400 |
| | Lys Glu Lys Leu Ser Ala Leu Pro Pro Glu Gly Gly Lys Pro Tyr Leu | | | |
| | 785 | 790 | 795 | 800 |
| | gaa tct ttt aag ctc agt tta gat aac aca aaa gat acc ctg tta cct | | | 2448 |
| 15 | Glu Ser Phe Lys Leu Ser Leu Asp Asn Thr Lys Asp Thr Leu Leu Pro | | | |
| | 805 | 810 | 815 | |
| | gat gaa gtt tca aca ttg agc aaa aag gag aaa att cct ttg cag atg | | | 2496 |
| 20 | Asp Glu Val Ser Thr Leu Ser Lys Lys Glu Lys Ile Pro Leu Gln Met | | | |
| | 820 | 825 | 830 | |
| | gag gag ctc agt act gca gtt tat tca aat gat gac tta ttt act tct | | | 2544 |
| 25 | Glu Glu Leu Ser Thr Ala Val Tyr Ser Asn Asp Asp Leu Phe Ile Ser | | | |
| | 835 | 840 | 845 | |
| | aag gaa gca cag ata aga gaa act gaa acg ttt tca gat tca tct cca | | | 2592 |
| | Lys Glu Ala Gln Ile Arg Glu Thr Glu Thr Phe Ser Asp Ser Ser Pro | | | |
| | 850 | 855 | 860 | |
| | att gaa att ata gat gag ttc cct aca ttg atc agt tct aaa act gat | | | 2640 |
| 30 | Ile Glu Ile Ile Asp Glu Phe Pro Thr Leu Ile Ser Ser Lys Thr Asp | | | |
| | 865 | 870 | 875 | 880 |
| | tca ttt tct aaa tta gcc agg gaa tat act gac cta gaa gta tcc cac | | | 2688 |
| 35 | Ser Phe Ser Lys Leu Ala Arg Glu Tyr Thr Asp Leu Glu Val Ser His | | | |
| | 885 | 890 | 895 | |
| | aaa agt gaa att gct aat gcc ccg gat gga gct ggg tca ttg cct tac | | | 2736 |
| 40 | Lys Ser Glu Ile Ala Asn Ala Pro Asp Gly Ala Gly Ser Leu Pro Cys | | | |
| | 900 | 905 | 910 | |
| | aca gaa ttg ccc cat gac ctt tct ttg aag aac ata caa ccc aaa gtt | | | 2784 |
| 45 | Thr Glu Leu Pro His Asp Leu Ser Leu Lys Asn Ile Gln Pro Lys Val | | | |
| | 915 | 920 | 925 | |
| | gaa gag aaa atc agt ttc tca gat gac ttt tct aaa aat ggg tct gct | | | 2832 |
| 50 | Glu Glu Lys Ile Ser Phe Ser Asp Asp Phe Ser Lys Asn Gly Ser Ala | | | |
| | 930 | 935 | 940 | |
| | aca tca aag gty ctc tta ttg oct cca gat gtt tct gct ttg gcc act | | | 2880 |
| | Thr Ser Lys Val Leu Leu Pro Pro Asp Val Ser Ala Leu Ala Thr | | | |
| | 945 | 950 | 955 | 960 |
| | caa gca gag ata gag agc ata gtt aaa ccc aaa gtt ctt gtg aaa gaa | | | 2928 |
| 55 | Gln Ala Glu Ile Glu Ser Ile Val Lys Pro Lys Val Leu Val Lys Glu | | | |
| | 965 | 970 | 975 | |
| | gct gag aaa aaa ctt oct tcc gat aca gaa aaa gag gac aga tca cca | | | 2976 |

WO 02/057483

14/24

PCT/GB02/00228

<210> 9
 <211> 1192<212> PRT<213> Homo sapiens
 <400> 9
 5 Met Glu Asp Leu Asp Gln Ser Pro Leu Val Ser Ser Ser Asp Ser Pro
 1 5 10 15
 Pro Arg Pro Gln Pro Ala Phe Lys Tyr Gln Phe Val Arg Glu Pro Glu
 20 25 30
 10 Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu Asp
 35 40 45
 Leu Glu Glu Leu Glu Val Leu Glu Arg Lys Pro Ala Ala Gly Leu Ser
 50 55 60
 15 Ala Ala Pro Val Pro Thr Ala Pro Ala Ala Gly Ala Pro Leu Met Asp
 65 70 75 80
 Phe Gly Asn Asp Phe Val Pro Pro Ala Pro Arg Gly Pro Leu Pro Ala
 85 90 95
 20 Ala Pro Pro Val Ala Pro Glu Arg Gln Pro Ser Trp Asp Pro Ser Pro
 100 105 110
 Val Ser Ser Thr Val Pro Ala Pro Ser Pro Leu Ser Ala Ala Val
 115 120 125
 25 Ser Pro Ser Lys Leu Pro Glu Asp Asp Glu Pro Pro Ala Arg Pro Pro
 130 135 140
 30 Pro Pro Pro Pro Ala Ser Val Ser Pro Gln Ala Glu Pro Val Trp Thr
 145 150 155 160
 Pro Pro Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro Pro Ser Thr Pro Ala Ala Pro
 165 170 175
 35 Lys Arg Arg Gly Ser Ser Gly Ser Val Asp Glu Thr Leu Phe Ala Leu
 180 185 190
 40 Pro Ala Ala Ser Glu Pro Val Ile Arg Ser Ser Ala Glu Asn Met Asp
 195 200 205
 Leu Lys Glu Gln Pro Gly Asn Thr Ile Ser Ala Gly Gln Glu Asp Phe
 210 215 220
 45 Pro Ser Val Leu Leu Glu Thr Ala Ala Ser Leu Pro Ser Leu Ser Pro
 225 230 235 240
 Leu Ser Ala Ala Ser Phe Lys Glu His Glu Tyr Leu Gly Asn Leu Ser
 245 250 255
 50 Thr Val Leu Pro Thr Glu Gly Thr Leu Gln Glu Asn Val Ser Glu Ala
 260 265 270
 55 Ser Lys Glu Val Ser Glu Lys Ala Lys Thr Leu Leu Ile Asp Arg Asp
 275 280 285
 Leu Thr Glu Phe Ser Glu Leu Glu Tyr Ser Glu Met Gly Ser Ser Phe
 290 295 300

WO 02/057483

15/24

PCT/GB02/00228

Ser Val Ser Pro Lys Ala Glu Ser Ala Val Ile Val Ala Asn Pro Arg
 305 310 315 320
 5 Glu Glu Ile Ile Val Lys Asn Lys Asp Glu Glu Lys Leu Val Ser
 325 330 335
 Asn Asn Ile Leu His Asn Gln Gln Glu Leu Pro Thr Ala Leu Thr Lys
 340 345 350
 10 Leu Val Lys Glu Asp Glu Val Val Ser Ser Glu Lys Ala Lys Asp Ser
 355 360 365
 Phe Asn Glu Lys Arg Val Ala Val Glu Ala Pro Met Arg Glu Glu Tyr
 370 375 380
 15 Ala Asp Phe Lys Pro Phe Glu Arg Val Trp Glu Val Lys Asp Ser Lys
 385 390 395 400
 20 Glu Asp Ser Asp Met Leu Ala Ala Gly Gly Lys Ile Glu Ser Asn Leu
 405 410 415
 Glu Ser Lys Val Asp Lys Lys Cys Phe Ala Asp Ser Leu Glu Gln Thr
 420 425 430
 25 Asn His Glu Lys Asp Ser Glu Ser Ser Asn Asp Asp Thr Ser Phe Pro
 435 440 445
 Ser Thr Pro Glu Gly Ile Lys Asp Arg Pro Gly Ala Tyr Ile Thr Cys
 450 455 460
 30 Ala Pro Phe Asn Pro Ala Ala Thr Glu Ser Ile Ala Thr Asn Ile Phe
 465 470 475 480
 35 Pro Leu Leu Gly Asp Pro Thr Ser Glu Asn Lys Thr Asp Glu Lys Lys
 485 490 495
 Ile Glu Glu Lys Lys Ala Gln Ile Val Thr Glu Lys Asn Thr Ser Thr
 500 505 510
 40 Lys Thr Ser Asn Pro Phe Leu Val Ala Ala Gln Asp Ser Glu Thr Asp
 515 520 525
 Tyr Val Thr Thr Asp Asn Leu Thr Lys Val Thr Glu Glu Val Val Ala
 530 535 540
 45 Asn Met Pro Glu Gly Leu Thr Pro Asp Leu Val Gln Glu Ala Cys Glu
 545 550 555 560
 50 Ser Glu Leu Asn Glu Val Thr Gly Thr Lys Ile Ala Tyr Glu Thr Lys
 565 570 575
 Met Asp Leu Val Gln Thr Ser Glu Val Met Gln Glu Ser Leu Tyr Pro
 580 585 590
 55 Ala Ala Gln Leu Cys Pro Ser Phe Glu Glu Ser Glu Ala Thr Pro Ser
 595 600 605
 Pro Val Leu Pro Asp Ile Val Met Glu Ala Pro Leu Asn Ser Ala Val
 610 615 620

WO 02/057483

16/24

PCT/GB02/00228

Pro Ser Ala Gly Ala Ser Val Ile Gln Pro Ser Ser Ser Pro Leu Glu
 625 630 635 640
 5 Ala Ser Ser Val Asn Tyr Glu Ser Ile Lys His Glu Pro Glu Asn Pro
 645 650 655
 Pro Pro Tyr Glu Glu Ala Met Ser Val Ser Leu Lys Lys Val Ser Gly
 660 665 670
 10 Ile Lys Glu Glu Ile Lys Glu Pro Glu Asn Ile Asn Ala Ala Leu Gln
 675 680 685
 Glu Thr Glu Ala Pro Tyr Ile Ser Ile Ala Cys Asp Leu Ile Lys Glu
 690 695 700
 15 Thr Lys Leu Ser Ala Glu Pro Ala Pro Asp Phe Ser Asp Tyr Ser Glu
 705 710 715 720
 20 Met Ala Lys Val Glu Gln Pro Val Pro Asp His Ser Glu Leu Val Glu
 725 730 735
 Asp Ser Ser Pro Asp Ser Glu Pro Val Asp Leu Phe Ser Asp Asp Ser
 740 745 750
 25 Ile Pro Asp Val Pro Gln Lys Gln Asp Glu Thr Val Met Leu Val Lys
 755 760 765
 30 Glu Ser Leu Thr Glu Thr Ser Phe Glu Ser Met Ile Glu Tyr Glu Asn
 770 775 780
 Lys Glu Lys Leu Ser Ala Leu Pro Pro Glu Gly Gly Lys Pro Tyr Leu
 785 790 795 800
 35 Glu Ser Phe Lys Leu Ser Leu Asp Asn Thr Lys Asp Thr Leu Leu Pro
 805 810 815
 Asp Glu Val Ser Thr Leu Ser Lys Lys Glu Lys Ile Pro Leu Gln Met
 820 825 830
 40 Glu Glu Leu Ser Thr Ala Val Tyr Ser Asn Asp Asp Leu Phe Ile Ser
 835 840 845
 45 Lys Glu Ala Gln Ile Arg Glu Thr Glu Thr Phe Ser Asp Ser Ser Pro
 850 855 860
 Ile Glu Ile Ile Asp Glu Phe Pro Thr Leu Ile Ser Ser Lys Thr Asp
 865 870 875 880
 50 Ser Phe Ser Lys Leu Ala Arg Glu Tyr Thr Asp Leu Glu Val Ser His
 885 890 895
 Lys Ser Glu Ile Ala Asn Ala Pro Asp Gly Ala Gly Ser Leu Pro Cys
 900 905 910
 55 Thr Glu Leu Pro His Asp Leu Ser Leu Lys Asn Ile Gln Pro Lys Val
 915 920 925
 Glu Glu Lys Ile Ser Phe Ser Asp Asp Phe Ser Lys Asn Gly Ser Ala

WO 02/057483

18/24

PCT/GB02/00228

```

ataattggag ctgcaangca gatcgtgaca agag atg gac ggt cag aag aaa aat 235
                               Met Asp Gly Gln Lys Lys Asn
                               1           5
5   tgg aag gac aag gtt gtt gac ctc ctg tac tgg aga gac att aag aag 283
   Trp Lys Asp Lys Val Val Asp Leu Leu Tyr Trp Arg Asp Ile Lys Lys
   10           15           20
10  act gga gtg gtg ttt ggt gcc agc cta ttc ctg ctg ctt tca ttg aca 331
   Thr Gly Val Val Phe Gly Ala Ser Leu Phe Leu Leu Ser Leu Thr
   25           30           35
15  gta ttc agc att gtg agc gta aca gcc tac att gcc ttg gcc ctg ctc 379
   Val Phe Ser Ile Val Ser Val Thr Ala Tyr Ile Ala Leu Ala Leu Leu
   40           45           50           55
20  tct gtg acc atc agc ttt agg ata tac aag ggt gtg atc caa gct atc 427
   Ser Val Thr Ile Ser Phe Arg Ile Tyr Lys Gly Val Ile Gln Ala Ile
   60           65           70
25  cag aaa tca gat gaa gcc cac cca ttc agg gca tat ctg gaa tct gaa 475
   Gln Lys Ser Asp Glu Gly His Pro Phe Arg Ala Tyr Leu Glu Ser Glu
   75           80           85
30  gtt gct ata tct gag gag ttg gtt cag aag tac agt aat tct gct ctt 523
   Val Ala Ile Ser Glu Glu Leu Val Gln Lys Tyr Ser Asn Ser Ala Leu
   90           95           100
35  ggt cat gtg aac tgc acg ata aag gaa ctc agg cgc ctc ttc tta gtt 571
   Gly His Val Asn Cys Thr Ile Lys Glu Leu Arg Arg Leu Phe Leu Val
   105           110           115
40  gat gat tta gtt gat tct ctg aag ttt gca gtg ttg atg tgg gta ttt 619
   Asp Asp Leu Val Asp Ser Leu Lys Phe Ala Val Leu Met Trp Val Phe
   120           125           130           135
45  acc tat gtt ggt gcc ttg ttt aat ggt ctg aca cta ctg att ttg gct 667
   Thr Tyr Val Gly Ala Leu Phe Asn Gly Leu Thr Leu Leu Ile Leu Ala
   140           145           150
50  ctc att tca ctc ctt cag tgt tcc tgt tat tta gaa cgg cat cag gca 715
   Leu Ile Ser Leu Leu Gln Cys Ser Cys Tyr Leu Glu Arg His Gln Ala
   155           160           165
55  cag ata gat cat tat cta gga ctt gca aat aag aat gtt aaa gat gct 763
   Gln Ile Asp His Tyr Leu Gly Leu Ala Asn Lys Asn Val Lys Asp Ala
   170           175           180
60  atg gct aaa atc caa gca aaa atc cct gga ttg aag cgc aaa gct gaa 811
   Met Ala Lys Ile Gln Ala Lys Ile Pro Gly Leu Lys Arg Lys Ala Glu
   185           190           195
70  tga aaaccccaa aataattagt aggaattcat ctttaaaggg gatattcatt 864
75  tgattatcac ggggagggtc aggoaagaac gaacctgac gttgcagtc agttcacag 924
   atcgtttgta gatctttatc tttagccatg cactgttgtg aggaaaatt acctgtctg 984
   actgccatgt gtccatcctc ttaagcattg taagtgctta tgtatggatt aaaccgtaa 1044
   tcatatcttt ttccatctc tctgagccac tgggtggaata aaaaacctgt atattttact 1104
   ttgttcgaga tagctctgac gcactctggc aagttgcaga gatgtggag ctgaaaaaaa 1164
   aaaaaaaaaa gcccttttca gttttgcaac tgtgtatggt ccgtgtagat tgatgcagat 1224

```

WO 02/057483

19/24

PCT/GB02/00228

```

tttctgaaat gaaatgttg tttgacgag atcataccgg taaagcagg atgacaaagc 1284
ttgcttttct ggtatgttct aggtgattg tgaactttac tgitatatta atggccaata 1344
taagtaata tagattatat atgtrtagtg tttcacaag cttagacctt taccttccag 1404
ccaccccaca gtgcttgaia tttcagagtc agtcattggt tatacatgtg tagttccaaa 1464
5  gcacataagc tagaggaaga aatatttcta gggcactac catcgttttc aacatgaaat 1524
gccacaccgc tagactctca acaacatcaa tttcattgca capactgact gtagttaat 1584
ttgtcacagc atctatggac tgaactaat gcttccaaa atgtgtttg ttgcaata 1644
tcaaacattg ttatcaga aattattaat tcaaaaaga agattatata catgtggtt 1704
10 taagctgac tgaactaat ctgtggaagc catgtgaac tgaaaaaga aagtatcaat 1764
aaagcttata gacccaaac gaaaaaaa aaaa . 1798

<210> 11
<211> 199<212> PRT<213> Homo sapiens
<400> 11
15 Met Asp Gly Gln Lys Lys Asn Trp Lys Asp Lys Val Val Asp Leu Leu
1 5 10 15
Tyr Trp Arg Asp Ile Lys Lys Thr Gly Val Val Phe Gly Ala Ser Leu
20 20 25 30
Phe Leu Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe Ser Ile Val Ser Val Thr Ala
35 40 45
Tyr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Ser Val Thr Ile Ser Phe Arg Ile Tyr
50 55 60
Lys Gly Val Ile Gln Ala Ile Gln Lys Ser Asp Glu Gly His Pro Phe
65 70 75 80
30 Arg Ala Tyr Leu Glu Ser Glu Val Ala Ile Ser Glu Glu Leu Val Gln
85 90 95
Lys Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Gly His Val Asn Cys Thr Ile Lys Glu
100 105 110
35 Leu Arg Arg Leu Phe Leu Val Asp Asp Leu Val Asp Ser Leu Lys Phe
115 120 125
Ala Val Leu Met Trp Val Phe Thr Tyr Val Gly Ala Leu Phe Asn Gly
130 135 140
Leu Thr Leu Leu Ile Leu Ala Leu Ile Ser Leu Leu Gln Cys Ser Cys
145 150 155 160
45 Tyr Leu Glu Arg His Gln Ala Gln Ile Asp His Tyr Leu Gly Leu Ala
165 170 175
Asn Lys Asn Val Lys Asp Ala Met Ala Lys Ile Gln Ala Lys Ile Pro
180 185 190
50 Gly Leu Lys Arg Lys Ala Glu
195

<210> 12<211> 1862<212> DNA<213> Homo sapiens
<220><221> CDS<222> (91)..(1647)
<400> 12
ggccgctgaa tgcccagtc gctgagccg gcctgccaga cgggacggga cggctagc 60
tgggcgcgcc ccccgccc ccgccgccc atg gcc gca ctg gcc cgg gcg ctg 114
Met Gly Ala Leu Ala Arg Ala Leu

```

WO 02/057483

20/24

PCT/GB02/00228

| | | | | |
|----|---|-----|-----|-----|
| | | 1 | 5 | |
| | ctg ctg cct ctg ctg gcc cag tgg ctc ctg cgc gcc gcc cag gag ctg | | | 162 |
| 5 | Leu Leu Pro Leu Leu Ala Gln Trp Leu Leu Arg Ala Ala Pro Glu Leu | 15 | 20 | |
| | gcc ccc gcg ccc ttc acg ctg ccc ctc cgg atg gcc gcg gcc acg aac | | | 210 |
| 10 | Ala Pro Ala Pro Phe Thr Leu Pro Leu Arg Val Ala Ala Ala Thr Asn | 25 | 35 | 40 |
| | cgc gta gtt gcg ccc acc ccg gga ccc ggg acc cct gcc gag cgc cac | | | 258 |
| | Arg Val Val Ala Pro Thr Pro Gly Pro Gly Thr Pro Ala Glu Arg His | 45 | 50 | 55 |
| 15 | gcc gac gcc ttg gcg ctc gcc ctg gag cct gcc ctg gcg tcc ccc gcg | | | 306 |
| | Ala Asp Gly Leu Ala Leu Ala Leu Glu Pro Ala Leu Ala Ser Pro Ala | 60 | 65 | 70 |
| 20 | ggc gcc gcc aac ttc ttg gcc atg gta gac aac ctg cag ggg gac tct | | | 354 |
| | Gly Ala Ala Asn Phe Leu Ala Met Val Asp Asn Leu Gln Gly Asp Ser | 75 | 80 | 85 |
| | ggc cgc gcc tac tac ctg gag atg ctg atc ggg acc ccc ccg cag aag | | | 402 |
| 25 | Gly Arg Gly Tyr Tyr Leu Glu Met Leu Ile Gly Thr Pro Pro Gln Lys | 90 | 95 | 100 |
| | cta cag att ctc gtt gac act gga agc agt aac ttt gcc gtg gca gga | | | 450 |
| 30 | Leu Gln Ile Leu Val Asp Thr Gly Ser Ser Asn Phe Ala Val Ala Gly | 105 | 110 | 115 |
| | acc ccg cac tcc tac ata gac acg tac ttt gac aca gag agg tct agc | | | 498 |
| | Thr Pro His Ser Tyr Ile Asp Thr Tyr Phe Asp Thr Glu Arg Ser Ser | 125 | 130 | 135 |
| 35 | aca tac cgc tcc aag gcc ttt gac gtc aca atg aag tac aca caa gga | | | 546 |
| | Thr Tyr Arg Ser Lys Gly Phe Asp Val Thr Val Lys Tyr Thr Gln Gly | 140 | 145 | 150 |
| 40 | agc tgg acg gcc ttc gtt ggg gaa gac ctc gtc acc atc ccc aaa ggc | | | 594 |
| | Ser Trp Thr Gly Phe Val Gly Glu Asp Leu Val Thr Ile Pro Lys Gly | 155 | 160 | 165 |
| | ttc aat act tct ttt ctt gtc aac att gcc act att ttt gaa tca gag | | | 642 |
| 45 | Phe Asn Thr Ser Phe Leu Val Asn Ile Ala Thr Ile Phe Glu Ser Glu | 170 | 175 | 180 |
| | aat ttc ttt ttg cct ggg att aaa tgg aat gga ata ctt gcc cta gct | | | 690 |
| 50 | Asn Phe Phe Leu Pro Gly Ile Lys Trp Asn Gly Ile Leu Gly Leu Ala | 185 | 190 | 195 |
| | tat gcc aca ctt gcc aag cca tca agt tct ctg gag acc ttc ttc gac | | | 738 |
| | Tyr Ala Thr Leu Ala Lys Pro Ser Ser Ser Leu Glu Thr Phe Asp | 205 | 210 | 215 |
| 55 | tcc ctg gtg aca caa gca aac atc ccc aac gtt ttc tcc atg cag atg | | | 786 |
| | Ser Leu Val Thr Gln Ala Asn Ile Pro Asn Val Phe Ser Met Gln Met | 220 | 225 | 230 |
| | tgt gga gcc gcc ttg ccc gtt gct gga tct gga acc aac gga ggt agt | | | 834 |

WO 02/057483

22/24

PCT/GB02/00228

```

tat gog ctc atg agc gtc tgt gga gcc atc ctc ctt gtc tta atc gtc 1554
Tyr Ala Leu Met Ser Val Cys Gly Ala Ile Leu Leu Val Leu Ile Val
475 480 485
5 ctg ctg ctg ctg cgg ttc cgg tgt cag cgt cgc ccc cgt gac cct gag 1602
Leu Leu Leu Leu Pro Phe Arg Cys Gln Arg Arg Pro Arg Asp Pro Glu
490 495 500
10 gtc gtc aat gat gag tcc tct ctg gtc aga cat cgc tgg aaa tga 1647
Val Val Asn Asp Glu Ser Ser Leu Val Arg His Arg Trp Lys
505 510 515
atagccagcc ctgacctcaa gcaacctaga actcagctat taagaaatc acatttcag 1707
ggcagcagcc gggatcgaag ctggcctttt ctctgtgcc caaccgtctt caatctctgt 1767
15 tctgtcccca gatgccttct agattcaactg tcttttgatt cttgatttc aagcttccaa 1827
atctccocta ctccaagaa aaaaaaaaaa aaaaa 1862
<210> 13
<211> 518<212> PRT<213> Homo sapiens
<400> 13
20 Met Gly Ala Leu Ala Arg Ala Leu Leu Pro Leu Leu Ala Gln Trp
1 5 10 15
Leu Leu Arg Ala Ala Pro Glu Leu Ala Pro Ala Pro Phe Thr Leu Pro
25 20 25 30
Leu Arg Val Ala Ala Ala Thr Asn Arg Val Val Ala Pro Thr Pro Gly
35 40 45
30 Pro Gly Thr Pro Ala Glu Arg His Ala Asp Gly Leu Ala Leu Ala Leu
50 55 60
Glu Pro Ala Leu Ala Ser Pro Ala Gly Ala Ala Asn Phe Leu Ala Met
65 70 75 80
35 Val Asp Asn Leu Gln Gly Asp Ser Gly Arg Gly Tyr Tyr Leu Glu Met
85 90 95
Leu Ile Gly Thr Pro Pro Gln Lys Leu Gln Ile Leu Val Asp Thr Gly
100 105 110
40 Ser Ser Asn Phe Ala Val Ala Gly Thr Pro His Ser Tyr Ile Asp Thr
115 120 125
45 Tyr Phe Asp Thr Glu Arg Ser Ser Thr Tyr Arg Ser Lys Gly Phe Asp
130 135 140
Val Thr Val Lys Tyr Thr Gln Gly Ser Trp Thr Gly Phe Val Gly Glu
145 150 155 160
50 Asp Leu Val Thr Ile Pro Lys Gly Phe Asn Thr Ser Phe Leu Val Asn
165 170 175
11e Ala Thr Ile Phe Glu Ser Glu Asn Phe Phe Leu Pro Gly Ile Lys
180 185 190
55 Trp Asn Gly Ile Leu Gly Leu Ala Tyr Ala Thr Leu Ala Lys Pro Ser
195 200 205

```

WO 02/057483

23/24

PCT/GB02/00228

Ser Ser Leu Glu Thr Phe Phe Asp Ser Leu Val Thr Gln Ala Asn Ile
 210 215 220
 5 Pro Asn Val Phe Ser Met Gln Met Cys Gly Ala Gly Leu Pro Val Ala
 225 230 235 240
 Gly Ser Gly Thr Asn Gly Gly Ser Leu Val Leu Gly Gly Ile Glu Pro
 245 250 255
 10 Ser Leu Tyr Lys Gly Asp Ile Trp Tyr Thr Pro Ile Lys Glu Glu Trp
 260 265 270
 Tyr Tyr Gln Ile Glu Ile Leu Lys Leu Glu Ile Gly Gly Gln Ser Leu
 275 280 285
 15 Asn Leu Asp Cys Arg Glu Tyr Asn Ala Asp Lys Ala Ile Val Asp Ser
 290 295 300
 Gly Thr Thr Leu Leu Arg Leu Pro Gln Lys Val Phe Asp Ala Val Val
 305 310 315 320
 20 Glu Ala Val Ala Arg Ala Ser Leu Ile Pro Glu Phe Ser Asp Gly Phe
 325 330 335
 Trp Thr Gly Ser Gln Leu Ala Cys Trp Thr Asn Ser Glu Thr Pro Trp
 340 345 350
 25 Ser Tyr Phe Pro Lys Ile Ser Ile Tyr Leu Arg Asp Glu Asn Ser Ser
 355 360 365
 30 Arg Ser Phe Arg Ile Thr Ile Leu Pro Gln Leu Tyr Ile Gln Pro Met
 370 375 380
 Met Gly Ala Gly Leu Asn Tyr Glu Cys Tyr Arg Phe Gly Ile Ser Pro
 385 390 395 400
 35 Ser Thr Asn Ala Leu Val Ile Gly Ala Thr Val Met Glu Gly Phe Tyr
 405 410 415
 40 Val Ile Phe Asp Arg Ala Gln Lys Arg Val Gly Phe Ala Ala Ser Pro
 420 425 430
 Cys Ala Glu Ile Ala Gly Ala Ala Val Ser Glu Ile Ser Gly Pro Phe
 435 440 445
 45 Ser Thr Glu Asp Val Ala Ser Asn Cys Val Pro Ala Gln Ser Leu Ser
 450 455 460
 50 Glu Pro Ile Leu Trp Ile Val Ser Tyr Ala Leu Met Ser Val Cys Gly
 465 470 475 480
 Ala Ile Leu Leu Val Leu Ile Val Leu Leu Leu Pro Phe Arg Cys
 485 490 495
 55 Gln Arg Arg Pro Arg Asp Pro Glu Val Val Asn Asp Glu Ser Ser Leu
 500 505 510
 Val Arg His Arg Trp Lys
 515

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
25 July 2002 (25.07.2002)

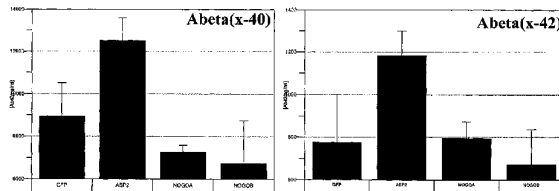
PCT

(10) International Publication Number
WO 02/057483 A3

- (51) International Patent Classification: G01N 33/68, C12Q 1/37, A61P 25/00, 35/00, A61K 38/00 [GB/GB]; c/o GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY (GB).
- (21) International Application Number: PCT/GB02/00228
- (22) International Filing Date: 18 January 2002 (18.01.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 0101312.7 18 January 2001 (18.01.2001) GB
- (71) Applicants (for all designated States except US): **GLAXO GROUP LIMITED** [GB/GB]; Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue, Greenford, Middlesex UB6 0NN (GB). **SMITHKLINE BEECHAM PLC** [GB/GB]; 980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS (GB).
- (72) Inventors: and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **BLACKSTOCK, Walter, Philip** [GB/GB]; GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY (GB). **HALE, Richard, Stephen** [GB/GB]; c/o GlaxoSmithKline, Gunnels Wood Road, Stevenage, Hertfordshire SG1 2NY (GB). **PRINJHA, Rabinder** [GB/GB]; GlaxoSmithKline, New Frontiers Science Park, Third Avenue, Harlow, Essex CM19 5AW (GB). **ROWLEY, Adele**
- (74) Agent: **GIDDINGS, Peter, John**; GlaxoSmithKline, Corporate Intellectual Property, 980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS (GB).
- (81) Designated States (national): AT, AG, AI, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SI, SG, SL, SK, SM, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 24 April 2003

[Continued on next page]

(54) Title: METHOD OF IDENTIFYING MODULATORS OF NOGO-FUNCTIONS



(57) Abstract: A method of identifying a modulator Nogo function, the method comprising (i) providing (a) a BACE1 polypeptide; (b) a Nogo polypeptide; (c) a test agent under conditions that would permit binding of a BACE1 polypeptide (a) to a Nogo polypeptide (b) in the absence of the test agent (c) wherein said BACE1 polypeptide (a) is BACE1 or a variant thereof or a fragment of either thereof capable of binding Nogo; and polypeptide (b) is Nogo or a variant thereof or a fragment of either thereof capable of binding BACE1; (ii) monitoring Nogo mediated activity; and (iii) determining thereby whether the test agent is a modulator of Nogo activity. Modulators identified by a method of the invention and use of such modulators in the manufacture of a medicament for the treatment of disorders responsive to the modulation of Nogo activity such as acute neuronal injury.

WO 02/057483 A3

WO 02/057483 A3



For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International Application No PCT/GB 02/00228 |
|---|--|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N3/68 C12Q1/37 A61P25/00 A61P35/00 A61K38/00 | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C12Q A61K | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | WO 00 69262 A (LIU YU WANG ; SCIOS INC (US); CORDELL BARBARA (US); LILLY CO ELI (U) 23 November 2000 (2000-11-23) abstract page 1, paragraph 2 claims 1-56 | 10,11, 17,18, 22,23 |
| X | WO 00 31235 A (CHEN MAIO S ; SCHWAB MARTIN E (CH)) 2 June 2000 (2000-06-02) abstract page 4, paragraph 3 | 15,16, 20,21 |
| P,X | WO 01 51520 A (UNIV YALE ; STRITTMATTER STEPHEN M (US)) 19 July 2001 (2001-07-19) abstract | 15,16, 20,21 |
| | -/- | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified) "O" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date of priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family | | |
| Date of actual completion of the international search 12 December 2002 | | Date of mailing of the international search report 22/01/2003 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5018 Patentstr 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax. (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Weijland, A |

Form PCT/ISA210 (Revised sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/GB 02/00228

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|---|-----------------------|
| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | CADELLI D S ET AL: "OLIGODENDROCYTE- AND MYELIN-ASSOCIATED INHIBITORS OF NEURITE OUTGROWTH: THEIR INVOLVEMENT IN THE LACK OF CNS REGENERATION" EXPERIMENTAL NEUROLOGY, SAN DIEGO, CA, US, vol. 115, 1992, pages 189-192, XP002929459 the whole document | 1-9 |
| A | KITAZUME SHINOBU ET AL: "Alzheimer's beta-secretase, beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme, is responsible for cleavage secretion of a Golgi-resident sialyltransferase." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 98, no. 24, 20 November 2001 (2001-11-20), pages 13554-13559, XP002224671 November 20, 2001 ISSN: 0027-8424 the whole document | 1-9 |

Form PCT/ISA210 (continuation of second sheet) (July 1999)

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No. PCT/GB 02/00228 |
|--|-------------------------------------|--|
| Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet) | | |
| This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons: | | |
| 1. | <input type="checkbox"/> | Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: |
| 2. | <input checked="" type="checkbox"/> | Claims Nos.: 12-14, 19, 22 (completely), 16, 18, 21, 23 (partly) because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210 |
| 3. | <input type="checkbox"/> | Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). |
| Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet) | | |
| This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows: | | |
| 1. | <input type="checkbox"/> | As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims. |
| 2. | <input type="checkbox"/> | As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee. |
| 3. | <input type="checkbox"/> | As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: |
| 4. | <input type="checkbox"/> | No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: |
| Remark on Protest | <input type="checkbox"/> | The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. |
| | <input type="checkbox"/> | No protest accompanied the payment of additional search fees. |

International Application No. PCT/8B 02 00228

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 12-14,19,22 (completely), 16,18,21,23 (partly)

Present claims 12-14, 16, 18, 19 and 21 to 23 relate to an extremely large number of possible compounds. Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the compounds/products/apparatus/methods claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely claims 1-9 relating to methods of identifying modulators of Nogo function, claims 10, 11 relating methods of identification of modulators for BACE activity, claims 15, 17, 20 relating to the use of BACE polypeptides or the treatment of neural injury and claims 16, 18, 21 and 23 as far they do not refer back to claims 12-14,19 or 22

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/GB 02/00228

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|-----------------------------|
| WO 0069262 | A | 23-11-2000 | AU 5009200 A 05-12-2000 |
| | | | EP 1176871 A1 06-02-2002 |
| | | | WO 0069262 A1 23-11-2000 |
| WO 0031235 | A | 02-06-2000 | AU 1469200 A 13-06-2000 |
| | | | CN 1354755 T 19-06-2002 |
| | | | CZ 20011608 A3 17-10-2001 |
| | | | EP 1124846 A2 22-08-2001 |
| | | | NO 20012223 A 02-07-2001 |
| | | | SK 6222001 A3 03-12-2001 |
| | | | WO 0031235 A2 02-06-2000 |
| | | | WO 0151520 |
| | | | BR 0107613 A 19-11-2002 |
| | | | CZ 20022438 A3 16-10-2002 |
| | | | EP 1248803 A2 16-10-2002 |
| | | | NO 20023387 A 11-09-2002 |
| | | | WO 0151520 A2 19-07-2001 |
| | | | US 2002012965 A1 31-01-2002 |
| | | | US 2002077295 A1 20-06-2002 |

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(71)出願人 595047190

スミスクライン ビーチャム パブリック リミテッド カンパニー

SmithKline Beecham p.l.c.

イギリス国 ティダブリュ8 9ジーエス,ミドルセックス,ブレントフォード,グレート ウェ
スト ロード 980

(74)代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔

(74)代理人 100118773

弁理士 藤田 節

(74)代理人 100096183

弁理士 石井 貞次

(72)発明者 ブラックストック,ウォルター,フィリップ

イギリス国 ハートフォードシャー エスジー1 2エヌワイ,スティーブネイジ,ガンネルス
ウッド ロード,グラクソスミスクライン

(72)発明者 ヘール,リチャード,スティーブン

イギリス国 ハートフォードシャー エスジー1 2エヌワイ,スティーブネイジ,ガンネルス
ウッド ロード,シーノオー グラクソスミスクライン

(72)発明者 プリンジャ,ラビンダー

イギリス国 エセックス シーエム19 5エーダブリュ,ハーロウ,サード アヴェニュー,ニ
ュー フロンティアース サイエンス パーク,グラクソスミスクライン

(72)発明者 ローリー,アデル

イギリス国 ハートフォードシャー エスジー1 2エヌワイ,スティーブネイジ,ガンネルス
ウッド ロード,シーノオー グラクソスミスクライン