

### Область изобретения

Изобретение относится к новым человеческим и мышинным генам, которые кодируют белок рецептора Nogo, причем данный рецептор способен регулировать рост аксонов. Данные гены рецептора Nogo избирательно экспрессируются в аксонах и дендритах нейронов в центральной нервной системе во время роста аксонов. Изобретение также относится к композициям, с помощью которых можно осуществлять избирательную блокаду опосредованного рецептором Nogo ингибирования роста аксонов путем блокирования взаимодействия Nogo с рецептором Nogo, вызывая последующее повышение роста аксонов.

### Предпосылки изобретения

Аксоны и дендриты нейронов представляют длинные клеточные отростки нейронов. На дистальном конце растущего аксона или нейрита расположен специализированный регион, известный как конус роста. Конусы роста ответственны за чувствительность к местному окружению и движению в направлении клетки-мишени нейрона. Конусы роста имеют форму руки, с некоторым количеством тонких филоподий, которые по-разному прилипают к поверхностям эмбриона. Конусы роста могут быть чувствительны к некоторым направляющим сигналам, например к поверхностной адгезивности, факторам роста, нейротрансмиттерам и электрическим полям. Направление роста конуса зависит от различных классов молекул адгезии, межклеточных сигналов, так же, как от факторов, которые стимулируют и ингибируют конусы роста. Конус роста, находящийся на конце растущего нейрита, продвигается с различными скоростями, но обычно со скоростью 1 или 2 мм в день. Конус состоит из широких и плоских отростков с многочисленными длинными микрошипами или филоподиями, которые простираются как шипы. Данные филоподии постоянно активны. В то время, как некоторые филоподии возвращаются назад к конусу роста, другие продолжают удлиняться сквозь субстрат. Продолжения между несколькими филоподиями образуют ламеллоподий.

Конус роста может обследовать область, которая лежит впереди его и по каждую сторону от его ламеллоподий и филоподий. Когда отросток входит в контакт с поверхностью, которая неблагоприятна, он отклоняется. Когда отросток входит в контакт с благоприятной поверхностью, он продолжает расти и может регулировать движение конуса роста в данном направлении. Следовательно, конус роста может направляться малыми вариациями поверхностных свойств субстратов. Когда конус роста достигает подходящей клетки-мишени, возникает синаптическое соединение.

В центральной нервной системе (ЦНС) поврежденные нейроны не регенерируют после повреждения, вызванного травмой или заболеванием. Отсутствие регенерации аксонов после повреждения может объясняться наличием ингибиторов роста аксонов. Данные ингибиторы преимущественно ассоциированы с миелином и представляют важный барьер для регенерации. Ингибиторы роста аксонов присутствуют в миелине, выделенном из ЦНС, и плазматической мембране олигодендроцитов, которые синтезируют миелин в ЦНС (Schwab et al., (1993) *Ann. Rev. Neurosci.* 16, 565-595).

Миелин ЦНС представляет собой сложное продолжение клеточной мембраны олигодендроцитов. Один олигодендроцит миелинизирует целых тридцать аксонных сегментов ЦНС. Отростки мембраны олигодендроцита обертываются вокруг аксонов концентрическим способом с образованием миелинового слоя. Плотные компактизованный зрелый миелин состоит из параллельных слоев бимолекулярных липидов, чередующихся слоями гидратированного белка. Активный синтез миелина начинается *in utero* и продолжается в первые 2 года жизни человека. Медленный синтез продолжается в течение детства и подросткового возраста, и кругооборот зрелого миелина продолжается с более низкой скоростью в течение жизни взрослого. Как развивающиеся, так и зрелые формы миелина чувствительны к повреждению вследствие болезни или физической травмы, что приводит к деградации миелина, окружающего аксоны.

Оказывается, что миелинассоциированные ингибиторы вносят первичный вклад в невозможность регенерации аксонов ЦНС *in vivo* после прерывания целостности аксона, в то время, как другие, не ассоциированные с миелином ингибиторы роста аксонов в ЦНС могут играть меньшую роль. Данные ингибиторы блокируют регенерацию аксонов после повреждения нейронов вследствие травмы, инсульта или вирусной инфекции.

Было охарактеризовано много происходящих из миелина ингибиторов роста аксонов (см. для обзора David et al., (1999) WO 995394547; Bandman et al., (1999) патент США 5858708; Schwab, (1996) *Neurochem. Res.* 21,755-761). Также описаны некоторые компоненты белого вещества ЦНС, NI35, NI250 (Nogo) и миелинассоциированный гликопротеин (MAG), которые обладают ингибиторной активностью в отношении распространения аксонов (Schwab et al., (1990) WO 9005191; Schwab et al., (1997) патент США 5684133). В частности, Nogo представляет 250 кДа миелинассоциированный ингибитор роста аксонов, который был клонирован и охарактеризован (Nagase et al., (1998) *DNA Res.* 5, 355-364; Schwab, (1990) *Exp. Neurol.* 109,2-5). кДНК Nogo вначале идентифицировали путем случайного анализа кДНК головного мозга и не придавали ему предполагаемой функции (Nagase et al., (1998) *DNA Res.* 5, 355-364).

Шваб с коллегами опубликовали последовательность шести пептидов, случайным образом выделенных из продукта протеолитического расщепления предполагаемого бычьего белка NI250 (Nogo) (Spillmann et al., (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 19283-19293). Вероятная полноразмерная последовательность кДНК данного белка в настоящее время хранится в GenBank. Данный клон кДНК человека размером 4,1 тыс. пар оснований, KIA0886, был получен при попытке Kazusa DNA Research Institute секвенировать выде-

ленную из головного мозга кДНК большой молекулярной массы (Nagase et al., (1998) DNA Res. 31, 355-364). Данный новый клон кДНК кодирует 135 кДа белок, который включает все шесть пептидных последовательностей, происходящих из бычьего Nogo.

Последовательность человеческого Nogo-A проявляет высокую степень гомологии по отношению к карбоксиконцевой трети белков семейства ретикулона (Rtn). Rtn1 также был назван нейроэндокринным специфичным белком (NSP), поскольку он экспрессируется исключительно в нейроэндокринных клетках (Van de Velde et al., (1994) J. Cell. Sci. 107, 2403-2416). Все белки Rtn обладают регионом длиной 200 аминокислотных остатков со сходством последовательности с карбоксильным концом данного белка (Van de Velde et al., (1994) J. Cell. Sci. 107, 2403-2416; Roebroek et al., (1996) Genomics 32, 191-199; Roebroek et al., (1998) Genomics 51, 98-106; Moreira et al., (1999) Genomics 58, 73-81; Morris et al., (1991) Biochim. Biophys. Acta 1450, 68-76). Родственные последовательности были обнаружены в геномах мухи и червя (Moreira et al., (1999) Genomics 58, 73-81). Данный регион обладает приблизительно 70% идентичностью по семейству Rtn. Аминоконцевые регионы не являются родственными один другому и происходят вследствие различных событий альтернативного сплайсинга РНК.

В результате анализа последовательностей, хранящихся в GenBank, и по гомологии с опубликованными изоформами Rtn были предсказаны три формы белка Nogo (Nogo-A, Nogo-B, Nogo-C). Nogo-B массой 37 кДа, возможно, может соответствовать NI35, и этим объясняется антигенное сходство ингибиторной активности в отношении разрастания аксонов NI35 и NI250 (Nogo-A). Nogo-B-Мус при SDS-PAGE проявляет электрофоретическую подвижность, соответствующую 25 кДа, и был описан ранее как Rtn4 или  $\nu$ p2015. Способность белка Nogo-A ингибировать регенерацию аксонов выявлена лишь недавно (GrandPre et al., (2000) Nature 403, 439-444; Chen et al., (2000) Nature 403, 434-439; Prinjha et al., (2000) Nature 403, 483-484).

Отсутствие в ЦНС повторного роста аксонов через очаг повреждения после травмы считалось причиной стойких неблагоприятных эффектов, ассоциированных с травмой, инсультом и демиелинизирующими нарушениями. Модуляция NI250 описана как средство лечения путем регенерации нейронов, поврежденных травмой, инсультом или дегенеративными нарушениями ЦНС (Schwab et al., (1994) WO 9417831; Tatabi et al., (1997) Neurosurgery 40, 541-546), так же, как и злокачественными опухолями в ЦНС, такими как глиобластома (Schwab et al., (1993) патент США 5250414; Schwab et al., (2000) патент США 6025333).

Имеются сообщения о том, что антитела, которые распознают NI250, могут использоваться для диагностики и лечения повреждения нервов в результате травмы, инфекции и дегенеративных нарушений в ЦНС (Schnell & Schwab, (1990) Nature 343, 269-272; Schwab et al., (1997) патент США 5684133). В аксонах, которые становятся миелинизированными, имеет место корреляция между развитием миелина и появлением Nogo. После того, как Nogo блокируется антителами, нейроны снова могут прорасти через очаги разрушения, вызванного повреждением нерва (Varga et al., (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 10959-10963).

Механизм действия, посредством которого Nogo ингибирует рост аксонов, еще не выяснен. Идентификация и характеристика данного механизма действия и биохимических путей, ассоциированных с эффектами Nogo, могли бы использоваться для лечения болезненных состояний, ассоциированных с повреждением аксонов и демиелинизацией аксонов.

### **Сущность изобретения**

Настоящее изобретение основано на открытии белков рецептора Nogo, уменьшающих опосредованное этим рецептором ингибирование роста аксонов, и относится к изолированным молекулам нуклеиновой кислоты, которые их кодируют.

Так, вариант изобретения относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему полипептид рецептора NOGO, по меньшей мере на 80, 90 и 95% идентичный полипептиду, содержащему аминокислоты 1-348 SEQ ID NO: 2 человека или SEQ ID NO: 4 мыши, или кодирующему полипептид, содержащий аминокислоты 1-348 SEQ ID NO: 2 человека или SEQ ID NO: 4 мыши.

Вариант изобретения относится также к изолированной молекуле нуклеиновой кислоты, которая кодирует растворимый фрагмент полипептида рецептора Nogo, содержащий по меньшей мере 50, 60 или 70 смежных аминокислот 1-348 из SEQ ID NO: 2 человека или SEQ ID NO: 4 мыши.

Вариант изобретения относится также к изолированной молекуле нуклеиновой кислоты, которая кодирует фрагмент полипептида рецептора Nogo (NgR), содержащий область LRRNT NgR, области LRR NgR и область LRRCT NgR в пределах аминокислот 1-309 SEQ ID NO: 2 человека или SEQ ID NO: 4 мыши.

Вариант представляет собой выделенный полинуклеотид, кодирующий полипептид рецептора NOGO, содержащий аминокислоты 1-348 SEQ ID NO: 2 человека или SEQ ID NO: 4 мыши, слитый с гетерологичным полипептидом.

Настоящее изобретение далее относится к указанной выше выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид рецептора NOGO, уменьшающий опосредованное этим рецептором ингибирование роста аксонов, функционально связанной с одним или несколькими элементами контроля экспрессии, включая векторы, в состав которых входят изолированные молекулы нуклеиновой кислоты.

Изобретение далее относится к клеткам-хозяевам, трансформированным таким образом, что они содержат молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению, и получаемым белкам по способам, включающим культивирование клетки-хозяина, трансформированной молекулой нуклеиновой кислоты по изобретению при условиях, в которых экспрессируется данный белок.

Настоящее изобретение включает изолированный полипептид, выбранный из группы, состоящей из изолированного полипептида, включающего фрагмент по меньшей мере из 50, 60 или 70 смежных аминокислот из последовательностей 1-348 SEQ ID NO: 2 человека, SEQ ID NO: 4 мыши; изолированного полипептида, включающего аминокислотную последовательность 1-348 SEQ ID NO: 2 человека, SEQ ID NO: 4 мыши; включающую по меньшей мере 1, например, 5, 10, 15 или 20 консервативных аминокислотных замен; изолированного полипептида, включающего аминокислотную последовательность 1-348 SEQ ID NO: 2 человека, SEQ ID NO: 4 мыши, включающую по меньшей мере 1, например, 5, 10, 15 или 20 встречающихся в природе аминокислотных замен, то есть изолированного полипептида с идентичностью аминокислотной последовательности, равной по меньшей мере 80, 90 или 95% по отношению к 1-348 SEQ ID NO: 2 человека, SEQ ID NO: 4 мыши.

Изобретение также относится к выделенному фрагменту полипептида рецептора Nogo (NgR), содержащему область LRRNT NgR, области LRR NgR и область LRRCT NgR в пределах аминокислот 1-309 SEQ ID NO: 2 человека или SEQ ID NO: 4 мыши.

Изобретение также относится к химерным полипептидам, включающим аминокислотную последовательность 1-348 SEQ ID NO: 2 человека, SEQ ID NO: 4 мыши.

Изобретение далее относится к антителам, которые связывают указанные выше белки рецептора Nogo. Антитела могут быть моноклональными и поликлональными антителами. В дополнение, антитела могут быть гуманизированными. Изобретение также относится к антителам, которые проявляют антиген-связывающую активность.

Изобретение также относится к способу лечения нарушения центральной нервной системы млекопитающего, включающему стадию введения эффективного количества композиции, содержащей в качестве действующего начала указанный выше выделенный полинуклеотид, или указанную выше клетку-хозяина, или указанный выше полипептид, или антитело, которые уменьшают опосредованное рецептором Nogo ингибирование роста аксонов. В некоторых осуществлениях нарушение центральной нервной системы является результатом черепной или церебральной травмы, повреждения спинного мозга, инсульта или демиелинизирующего заболевания. Примерами демиелинизирующих заболеваний являются рассеянный склероз, монофазная демиелинизация, энцефаломиелит, мультифокальная лейкоэнцефалопатия, панэнцефалит, болезнь Маркьяфава-Биньями (Marchiafava-Bignami), миелолизис моста, аденолейкодистрофия, болезнь Пелицеуса-Мерцбахера (Pelizaeus-Merzbacher), спонгиозная дегенерация, болезнь Александра (Alexander), болезнь Канавана (Canavan), метакроматическая лейкодистрофия и болезнь Краббе (Krabbe).

### Описание фигур

Фиг. 1 - сравнение доменов Nogo.

(a) представляет собой схематичную диаграмму, которая суммирует свойства белка Nogo, использованные в данном исследовании. (b) представляет фотографию фибробластов NIH-3T3, культивированных на поверхностях, покрытых Amino-Nogo, GST-Nogo-66 или без белка, и окрашенных с выявлением актина филаментов (масштаб 40 мкм). (c) представляет фотографию куриных ганглиев дорзального корешка E12, культивированных на поверхностях, покрытых Amino-Nogo, GST-Nogo-66 или без белка (связанных с субстратом) или в присутствии 100 нМ белка Nogo (растворимого) (масштаб 40 мкм). (d) представляет фотографию геля и иммуноблота, где очищенный белок Amino-Nogo-Мус-His подвергали SDS-PAGE- и окрашивали кумасси бриллиантовым голубым (СВВ) или выявляли иммуноблоттингом посредством антител против Мус (Мус) (маркеры молекулярной массы 200, 116, 97, 65 и 45 кДа находятся слева). (e) представляет график, показывающий экспериментальные данные, где измеряли процент фибробластов 3T3 с площадью более 1200 мкм<sup>2</sup> (покрытие) в экспериментах, проведенных по (b) на поверхностях, покрытых Nogo (черный цвет) или с растворимыми 100 нМ препаратами Nogo (голубой цвет) (АМ, Amino-Nogo; АМ+Мус, Amino-Nogo, преинкубированный с антителом против Мус; АМ+Мус+Мо, АМ+Мус, преинкубированные с антителом против мышиных IgG; Мус+Мо, антитело против Мус плюс антитело против мышиных IgG). (f) представляет график, показывающий экспериментальные данные, где определяли процент покрытия клетками COS-7 после культивирования на поверхностях, покрытых Nogo, или с растворимыми 100 нМ препаратами Nogo. (g) представляет график, показывающий экспериментальные данные, где эффекты очищенных препаратов GST-Nogo-66 или Amino-Nogo на морфологию конуса роста оценивали на культурах ганглиев дорзального корешка E12 в указанных концентрациях через 30 мин. В данном эксперименте было продемонстрировано, что при данном анализе GST-Nogo-66 действует в 2 раза более мощно по амплитуде, чем Amino-Nogo. (h) представляет график, показывающий экспериментальные данные, где проводили количественную оценку разрастаний нейритов на клетку в культурах ганглиев дорзального корешка E13 в экспериментах, проведенных по (c) на поверхностях, покрытых Nogo или с растворимыми 100 нМ препаратами Nogo. (i) представляет график, показывающий экспериментальные данные, где измеряли эффекты препаратов Nogo на разрастание нейритов в мозжечковых

гранулярных нейронах.

Фиг. 2 - фрагменты Nogo являются антагонистами действия Nogo и миелина ЦНС.

(а) представляет собой фотографию отростков куриного ганглия дорзального корешка E12, которые культивировали, после чего оценивали коллапс конуса роста, как описано на фиг. 4. Культуры подвергали действию следующих препаратов в течение 30 мин до фиксации и окрашивания родамин-фаллоидином: только буфер (контроль); 15 нМ GST-Nogo (Nogo); Pep1, Pep2 и Pep3 (Pep); 15 нМ GST-Nogo плюс Pep1, Pep2 и Pep3 по 1 мкМ каждого (Nogo + Pep). Заметьте, что коллапс конуса роста за счет Nogo блокировался добавлением пептидов. Pep1, остатки 1-25 внеклеточного домена; Pep2, 11-35; и Pep3, 21-45. (b) представляет график количественной оценки результатов анализа коллапса конуса роста по (а). Индивидуальные пептиды включали в концентрации 4 мкМ, а смесь пептидов 1-3 содержала по 1 мкМ каждого пептида. Миелин ЦНС получали, как описано, и указанные общие концентрации миелинового белка включали в культуры. Все результаты представляют собой средние  $\pm$  станд.ош.средн. (s.e.m.), рассчитанные на основе 4-7 измерений. Отмечены значения, значительно отличающиеся от соответствующих значений с теми же концентрациями Nogo или миелина, но без пептида (звездочка,  $p < 0,05$ , двухсторонний t-тест Стьюдента).

Фиг. 3 - антагонист Nogo Pep2-41.

(а) представляет график, показывающий результаты анализа коллапса конуса роста на куриных ганглиях дорзального корешка E12. Данный анализ проводили и подвергали количественной оценке, как в GrandPre et al., (2000) Nature 403,439-444. Анализ проводили без добавления (контроль), с 15 нМ GST-Nogo (Nogo) или 15 нМ GST-Nogo плюс 1 мкМ Pep2-41 (Nogo-Pep). Значения представляют собой средние  $\pm$  станд.ош.средн. (s.e.m.), рассчитанные на основе четырех измерений. (b) представляет график, показывающий результаты по связыванию, где измеряли связывание 10 нМ AP-Nogo с нейронами куриных ганглиев дорзального корешка E12, как описано на фиг. 4, с добавлением указанных концентраций Pep2-41.

Фиг. 4 - Nogo Pep2-41 предотвращает ингибирование разрастания нейритов Nogo и миелином ЦНС.

Данная фигура представляет собой график, на котором показаны результаты анализа разрастания, где нейроны культивировали в присутствии указанных концентраций Pep2-41, очищенного белка GST-Nogo (GST-Nogo-66) и грубого белка миелина ЦНС. Нейроны куриных ганглиев дорзального корешка E12 культивировали в стандартных условиях. Для анализа разрастания нейроны культивировали в присутствии указанных концентраций Pep2-41, очищенного белка GST-Nogo (GST-Nogo-66) и грубого белка миелина ЦНС. Данный эксперимент продемонстрировал, что Pep2-41 может обращать ингибирование разрастания нейритов за счет GST-Nogo или общего миелина ЦНС.

Фиг. 5 - анализ связывания лиганда аксонными рецепторами Nogo.

(а) представляет собой фотографию геля и иммуоблота, где белок His-AP-Nogo (66 аминокислот) экспрессировали в клетках HEK293T и очищали от кондиционной среды на смоле, содержащей никель посредством гистиридиновой метки. Очищенный белок подвергали SDS-PAGE и окрашивали общий белок CBV или проводили иммуноблоттинг с использованием антител против Nogo (анти-Nogo). Слева показаны маркеры молекулярной массы 200, 116, 97, 65 и 45 кДа, а справа находится миграция AP-Nogo. (b) представляет собой фотографию диссоциированных нейронов куриного ганглия дорзального корешка E12, которые инкубировали с 10 нМ AP-Nogo или 10 нМ AP-Nogo + 160 нМ GST-Nogo в течение 60 мин при 23°C. Клетки отмывали, фиксировали и инкубировали при 60°C для инактивации эндогенного AP. Связанный AP-Nogo выявляли путем инкубации с голубым нитротетразолием. Заметьте интенсивное окрашивание нейронов AP-Nogo, которое отменяется введением немеченого лиганда. (c) представляет график, показывающий экспериментальные данные, где оценивали эффективность AP-Nogo и GST-Nogo путем анализа коллапса конуса роста на куриных ганглиях дорзального корешка E12, как описано в разделе примеров. Определено, что  $EC_{50}$  AP-Nogo составляет 1 нМ или меньше. Показаны средние значения  $\pm$  станд.ош.средн., рассчитанные для 5-8 измерений. (d) представляет график, показывающий экспериментальные данные, где оценивали связывание AP-Nogo в концентрации 10 нМ с нейронами куриного ганглия дорзального корешка E12, или в присутствии 100 нМ GST-Nogo, или в присутствии 4 мкМ Pep2, которое количественно анализировали по (b), способом, описанным в разделе примеров. Показаны средние значения  $\pm$  станд.ош.средн., рассчитанные для 8 измерений. (e) представляет график, показывающий экспериментальные данные, где измеряли связывание AP-Nogo с нейронами ганглия дорзального корешка как функцию концентрации AP-Nogo. Приведен один из шести экспериментов со сходными результатами. (f) представляет график, суммирующий данные из (e), преобразованные для анализа Скотчарда. Очевидная  $K_d$  связывания AP-Nogo с нейронами куриного ганглия дорзального корешка E12 составляет 3 нМ.

Фиг. 6 - связывание Nogo с COS-7, экспрессирующими рецептор Nogo.

Данная фигура представляет собой фотографию клеток COS-7, которые трансфицировали экспрессирующим вектором, кодирующим мышинный рецептор Nogo. Через 2 дня после трансфекции оценивали связывание AP-Nogo или AP, как описано в разделе примеров для нейронов ганглия дорзального корешка. Отметьте избирательное связывание Nogo с клетками, экспрессирующими рецептор Nogo. Связывание сильно уменьшается в присутствии избытка пептида Nogo, не слитого с AP.

Фиг. 7 - структура рецептора Nogo.

Данная схематичная диаграмма иллюстрирует главные структурные черты рецептора Nogo.

Фиг. 8 - распределение мРНК рецептора Nogo.

Данная фигура представляет собой фотографию нозерн-блота мРНК рецептора Nogo для образцов polyA+РНК из указанных тканей мыши слева и для образцов общей РНК из различных регионов головного мозга крысы справа. Слева показана миграция маркеров размера РНК.

Фиг. 9 - иммуногистология рецептора Nogo-66.

(а) представляет собой фотографию иммуноблота, где анализировали мембранную фракцию (10 мкг белка) из указанных клеток или тканей цыпленка путем иммуноблоттинга против рецептора Nogo-66 (маркеры молекулярной массы в кДа находятся справа). (b) представляет собой фотографию клеток COS-7, экспрессирующих Мус-рецептор Nogo-66, или отростков куриного спинного мозга E5 (8 дней *in vitro*), окрашенных антителами против рецептора Nogo-66, против Мус или олигодендроцитспецифическими антителами O4. На нижних трех панелях показана иммуногистохимия той же области (масштаб 40 мкм для трех верхних панелей и 80 мкм для трех нижних панелей). (с) представляет собой фотографию фиксированных параформальдегидом вибраторных секций головного мозга или спинного мозга взрослого, окрашенных препаратом антител против рецептора Nogo-66. Данные результаты демонстрируют окрашивание профилей аксонов (стрелки) как в мосте, так и в спинном мозге. Окрашивание существенно снижается в присутствии 10 мкг/мл антигена-GST-рецептора Nogo-66.

Фиг. 10 - рецептор Nogo-66 опосредует коллапс конуса роста, происходящий за счет Nogo-66.

(а) представляет собой фотографию куриных отростков DRG E12, подвергавшихся действию Nogo-66 после предварительной обработки PI-PLC или буфером. Показано окрашивание F-актина в аксонах (масштаб 40 мкм). (b) представляет график, суммирующий экспериментальные результаты связывания 3 нМ AP или AP-Nogo с диссоциированными нейронами куриного ганглия дорзального корешка E12. Там, где это отмечено, культуры предварительно обрабатывали PI-PLC или включали 150 нМ GST-Nogo-66 в инкубационную среду с AP-Nogo. (с) представляет график, суммирующий измерения коллапса конуса роста из экспериментов по (а). Культуры куриных DRG E12 обрабатывали PI-PLC или не делали этого перед воздействием 30 нМ GST-Nogo-66 или 100 нМ Sema3A. (d) представляет фотографию отростков клеток ганглия сетчатки E7, инфицированных контрольным вирусом (HSV-PlexinA1) или HSV-Мус-рецептором Nogo-66 и затем инкубированных с Nogo-66 или без него. Показано окрашивание фаллоидином конусов роста аксонов (масштаб 25 мкм). (е) представляет график с количественной оценкой коллапса конусов роста неинфицированных или инфицированных вирусом нейронов сетчатки E17 по (d).

Фиг. 11 - структурно-функциональный анализ рецептора Nogo-66.

(а) представляет схематичную диаграмму различных мутантов с делецией рецептора Nogo-66. В данных мутантах оценивали уровень экспрессии путем иммуноблоттинга и связывание AP-Nogo. Заметьте, что богатые лейцином повторы и богатый лейциновыми повторами С-конец требуются для связывания Nogo, но оставшаяся часть белка не требуется. Второй белок тестировали после очистки и иммунизации. (b) представляет диаграмму с предсказанной трехмерной структурой первых семи богатых лейцином повторов рецептора Nogo-66. Данный результат выведен при компьютерном моделировании, основанном на предсказанной структуре сходных богатых лейцином повторов рецептора лейтропина (Jiang et al., (1995) Structure 3, 1341-1353). Моделирование проводили посредством Swiss-Model на [www.expasy.ch/spdbv](http://www.expasy.ch/spdbv). Также отмечены регионы с бета-листовой и альфа-спиральной вторичной структурой.

Фиг. 12 - растворимый рецептор Nogo блокирует Nogo-66.

Нейроны куриных DRG E13 культивировали в стандартных условиях. При анализе коллапса конуса роста вместе с 100 нМ Nogo-66 добавляли кондиционированную среду от клеток HEK293T, секретирующих фрагмент эктодомена мышинового рецептора Nogo длиной 1-348 аминокислот или контрольную кондиционированную среду. На нижней левой панели данные графика показывают, что индуцируемый Nogo коллапс блокируется растворимым фрагментом рецептора. Для анализа разрастания нейроны культивировали в присутствии контроля или кондиционированной среды с эктодомом рецептора Nogo вместе с Nogo-66 (50 нМ) или миелином центральной нервной системы (13 мкг общего белка/мл). На четырех верхних панелях показаны фотографии, на которых продемонстрировано, что миелин центральной нервной системы ингибирует разрастание и что данный эффект блокируется присутствием белка-эктодомена рецептора Nogo. На графике на нижней правой панели показана количественная оценка разрастания.

### Подробное описание изобретения

#### I. Определения.

Кроме определенных по-другому, все используемые здесь технические и научные термины имеют те же значения, под которыми они обычно понимаются обычным специалистом в области, к которой принадлежит данное изобретение. Хотя в осуществлении и тестировании настоящего изобретения могут использоваться любые способы и материалы, сходные или эквивалентные тем, что здесь описаны, описываются предпочтительные способы и материалы.

Используемый здесь термин «аксон» относится к длинному клеточному выпячиванию нейрона, по которому от тела клетки к клеткам-мишеням проводятся эфферентные (исходящие) потенциалы действия.

Используемый здесь термин «рост аксонов» относится к удлинению длинного отростка или аксона, начинающемуся от тела клетки и происходящему за счет конуса роста.

Используемый здесь термин «нарушение центральной нервной системы» относится к любому патологическому состоянию, ассоциированному с ненормальной функцией центральной нервной системы (ЦНС). Термин включает в качестве неограничивающих примеров измененную функцию ЦНС, возникающую в результате физической травмы ткани головного мозга, вирусной инфекции, аутоиммунного механизма, генной мутации и нейродегенеративных заболеваний или нарушений.

Используемый здесь термин «химерный белок» относится к любому полипептиду, который не полностью гомологичен на аминокислотном уровне его последовательности «дикого типа» или кодируется нуклеиновой кислотой, возникающей из соединения нуклеиновых кислот из двух разных источников. Термин включает в качестве неограничивающих примеров белки слияния и белки, сконструированные таким образом, что они содержат одну или несколько аминокислотных замен, за счет которых их аминокислотная последовательность отличается от последовательностей дикого типа.

Используемый здесь термин «демиелинизирующее заболевание» относится к патологическому нарушению, характеризующемуся деградацией миелиновой оболочки клеточной мембраны олигодендроцитов.

Используемый здесь термин «конус роста» относится к специализированному региону на кончике растущего нейрита, который отвечает за чувствительность к местному окружению и движение аксона по направлению к соответствующей ему синаптической клетке-мишени.

Используемый здесь термин «движение конуса роста» относится к вытяжению или коллапсу конуса роста по направлению к клетке-мишени нейрона.

Используемый здесь термин «нейрит» относится к отростку, растущему от нейрона. Так как в культуре иногда трудно отличить аксон от дендрита, термин «нейрит» используется для них обоих.

Используемый здесь термин «олигодендроцит» относится к клетке нейроглии ЦНС, функцией которой является миелинизация аксонов ЦНС.

Используемый здесь термин «полипептид» относится к пептиду, который при гидролизе дает более двух аминокислот, называемому трипептидами, тетрапептидами и т.д., согласно числу аминокислот, содержащихся в полипептиде. Термин «полипептид» используется по ходу спецификации в качестве синонима термину «белок» или «пептид».

## II. Конкретные осуществления.

### A. Белок-рецептор Nogo и пептидные средства (агенты) для белка-рецептора Nogo.

Настоящее изобретение относится к изолированному белку, аллельным вариантам белка и консервативным аминокислотным заменам в белке. Используемые здесь термины «белок» или «полипептид» относятся к белку-рецептору Nogo, который имеет аминокислотную последовательность человека, описанную SEQ ID NO: 2, или аминокислотную последовательность мыши, описанную SEQ ID NO: 4. «Белок» или «полипептид» также относится к пептидам, идентифицированным как пептидные агенты рецептора Nogo, которые имеют аминокислотные последовательности, описанные SEQ ID NO: 8, 10, 12, 14, 16, 18 и 20. Изобретение также включает встречающиеся в природе аллельные варианты и белки, которые имеют аминокислотную последовательность, слегка отличающую от тех, что специфично перечислены выше. Аллельные варианты, хотя обладают аминокислотной последовательностью, слегка отличающейся от тех, что специфично перечислены выше, тем не менее, имеют ту же или сходную биологическую функцию, ассоциированную с белками-рецепторами Nogo человека и мыши и пептидными агентами рецептора Nogo, описанными SEQ ID NO: 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 и 20.

Используемый здесь термин «семейство белков, родственных белкам-рецепторам Nogo», относится к белкам, которые выделены из организмов в дополнение к людям и мышам. Способы, используемые для идентификации и выделения других членов семейства белков, родственных белкам-рецепторам Nogo, описаны ниже.

Белки и пептидные агенты - рецепторы Nogo - по настоящему изобретению находятся предпочтительно в изолированной форме. При использовании здесь белок или лиганд называют изолированным, когда для отделения белка от клеточных составляющих, которые в норме ассоциированы с белком, привлекают физические, механические и химические способы. Специалист в данной области может легко применить стандартные способы очистки для получения изолированного белка или лиганда.

Белки по настоящему изобретению далее включают консервативные варианты белков и лигандов, описанных здесь. Используемый здесь термин «консервативный вариант» относится к изменениям в аминокислотной последовательности, которые не оказывают неблагоприятного влияния на биологические функции белка. Говорят, что замена, вставка или делеция неблагоприятно влияют на белок, когда у измененной последовательности предотвращена или нарушена функция, ассоциированная с белком. Например, общий заряд, структура или гидрофобно-гидрофильные свойства белка могут изменяться без неблагоприятного влияния на биологическую активность. Соответственно, аминокислотная последовательность может быть изменена, например, для приведения пептида в более гидрофобное или гидрофильное состояние, без неблагоприятного влияния на типы биологической активности белка.

Обычно аллельные варианты, варианты с консервативными заменами и члены белкового семейства обладают аминокислотной последовательностью, имеющей по крайней мере 75%-ную идентичность последовательности с человеческими и мышинными последовательностями, заданными SEQ ID NO: 2, 4, 8,

10, 12, 14, 16, 18 или 20, более предпочтительно по крайней мере 80%-ную, даже более предпочтительно по крайней мере 90%-ную и наиболее предпочтительно 95%-ную идентичность. Идентичность или гомология в отношении таких последовательностей определяется здесь как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые являются идентичными таковым в известных пептидах после выравнивания последовательностей и, если необходимо, введения вставок для достижения максимальной процентной гомологии, и не считая любые консервативные замены частью идентичности последовательности. N-концевые, C-концевые или внутренние расширения, делеции или инсерции в пептидной последовательности считаются не влияющими на гомологию.

Таким образом, белки и пептиды по настоящему изобретению включают молекулы, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 или 20, их фрагменты, имеющие последовательность из следующих друг за другом по крайней мере 3, 4, 5, 6, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или более аминокислотных остатков белков и пептидных агентов - рецепторов Nogo; варианты аминокислотной последовательности таких последовательностей, где по крайней мере один аминокислотный остаток вставлен с N- или C-конца, или внутри описанных последовательностей: варианты аминокислотной последовательности таких последовательностей или их фрагменты, как определено выше, которые замещены другим остатком. Рассмотренные варианты далее включают те, что содержат предварительно определенные мутации, полученные, например, путем гомологичной рекомбинации, сайт-специфического или ПЦР-мутагенеза, и соответствующие белки других видов животных, включая в качестве неограничивающих примеров кроличьи, крысиные, свиные, бычьи, овечьи, лошадиные белки и белки видов приматов, кроме человека, аллели или другие встречающиеся в природе варианты семейства белков; и производные, где белок был ковалентно модифицирован путем замещения химическими, ферментными или другими подходящими средствами группой, отличной от встречающихся в природе аминокислот (например, детектируемой группой, такой как фермент или радиоизотоп).

Как описано ниже, члены семейства белков могут использоваться: (1) для идентификации средств, которые модулируют по крайней мере один тип активности белков; (2) для способов идентификации связывающих партнеров белка; (3) в качестве антигена для получения поликлональных и моноклональных антител и (4) в качестве терапевтического средства.

#### В. Молекулы нуклеиновой кислоты.

Настоящее изобретение далее относится к молекулам нуклеиновой кислоты, которые кодируют белки и пептиды, включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 или 20, и описанные здесь родственные белки, предпочтительно в изолированной форме. Используемый здесь термин «нуклеиновая кислота» включает геномную ДНК, кДНК, мРНК и антисмысловые молекулы, так же, как нуклеиновые кислоты, основанные на альтернативных скелетах или включающие альтернативные основания, выделенные из природных источников или синтезированные.

Гомологию или идентичность определяли посредством анализа BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) с использованием алгоритма, задействованного программами blastp, blastn, blastx, tblastn и tblastx (Karlín et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 2264-2268 and Altschul, (1993) J. Mol. Evol. 36, 290-300, полностью включено в качестве ссылки), которые предназначены для поиска сходства последовательностей. Подход, использованный программой BLAST, представляет собой, во-первых, распознавание сходных сегментов между запрашиваемой последовательностью и последовательностью из базы данных, затем оценку статистической значимости всех совпадающих пар, которые были идентифицированы, и, наконец, суммирование только тех совпадающих пар, которые удовлетворяют предварительно выбранному уровню значимости. Для обсуждения основных вопросов поиска сходства в базах данных последовательностей см. Altschul et al., (1994) Nature Genetics 6, 119-129, которое полностью включено в качестве ссылки. Параметры поиска «histogram», «descriptions», «alignments», «expect» (т.е. уровень статистической значимости для сообщаемых совпадений по отношению к последовательностям базы данных), «cutoff», «matrix» и «filter» совпадали с таковыми по умолчанию. Используемая по умолчанию матрица счета, использованная blastp, blastx, tblastn, и tblastx, представляла собой матрицу BLOSUM62 (Henikoff et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10915-10919, полностью включено в качестве ссылки). Четыре параметра blastn настраивали следующим образом: Q=10 (штраф за создание вставки); R=10 (штраф за продолжение вставки); wink=1 (генерирует словесные сноски в каждой позиции «мерцания» (wink<sup>th</sup>) по запросу); и gapw=16 (устанавливает ширину окна, внутри которого генерируются выравнивания со вставками). Эквивалентные установки параметров Blastp составляли Q=9; R=2; wink=1; и gapw=32. Сравнение последовательностей посредством Bestfit, доступной в пакете GCG, версия 10.0, использует параметры для ДНК, составляющие GAP=50 (штраф за создание вставки) и LEN=3 (штраф за продолжение вставки), и эквивалентные параметры для сравнения белков равны GAP=8 и LEN=2.

Используемый здесь термин «условия высокой жесткости» означает гибридизацию при 42°C в присутствии 50% формамида, с последующей первой отмывкой при 65°C 2xSSC, содержащим 1% SDS, с последующей второй промывкой при 65°C 0,1xSSC.

При использовании здесь говорят, что молекула нуклеиновой кислоты является «изолированной», когда молекула нуклеиновой кислоты, по существу, отделена от контаминантной нуклеиновой кислоты, кодирующей другие полипептиды из источника нуклеиновой кислоты.

Настоящее изобретение далее относится к фрагментам кодирующей молекулы нуклеиновой кислоты. Используемый здесь термин «фрагмент кодирующей молекулы нуклеиновой кислоты» относится к части целой последовательности, кодирующей белок. Размер фрагмента определяется предназначенным способом применения. Например, если фрагмент выбран таким образом, что он должен кодировать активную часть белка, необходимо, чтобы фрагмент был достаточно большим для кодирования функционального региона(-ов) белка. Если фрагмент подлежит использованию в качестве зонда нуклеиновой кислоты или праймера для ПЦР, тогда выбирают длину фрагмента так, чтобы получить относительно малое количество ложноположительных результатов во время зондирования/использования праймера.

Фрагменты кодирующей молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению (т.е. синтетические олигонуклеотиды), которые используются в качестве зондов или специфических праймеров для полимеразной цепной реакции (ПЦР) или для синтеза генных последовательностей, кодирующих белки по изобретению, могут быть легко синтезированы посредством химических технологий, например фосфотриэфирным способом по Matteucci et al., (1981) J. Am. Chem. Soc. 103, 3185-3191, или с использованием способов автоматического синтеза. Кроме того, большие сегменты ДНК могут быть легко получены хорошо известными способами, такими как синтез группы олигонуклеотидов, которые определяют различные модульные сегменты гена, с последующим лигированием олигонуклеотидов для построения полного модифицированного гена.

Кодирующие молекулы нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению могут далее быть модифицированы так, что они будут содержать детектируемую метку для целей диагностики и зондирования. Такие разнообразные метки известны в данной области и могут легко задействоваться с описанными здесь кодирующими молекулами. Подходящие метки включают в качестве неограничивающих примеров биотин, радиоактивно меченные нуклеотиды и т.п. Специалист в данной области может применить любую из известных в данной области меток для получения меченой кодирующей молекулы нуклеиновой кислоты.

Модификации самой первичной структуры путем делеции, дополнения или изменения аминокислот, входящих в состав белковой последовательности во время трансляции, могут проводиться без нарушения активности белка. Такие замены или другие изменения приводят к появлению белков, обладающих аминокислотной последовательностью, кодируемой нуклеиновой кислотой, попадающих в предполагаемые рамки настоящего изобретения.

С. Выделение других родственных молекул нуклеиновой кислоты.

Как описано выше, идентификация молекулы нуклеиновой кислоты человека, обладающей SEQ ID NO: 1, 3, 7, 9, 11, 13, 15, 17 и 19, позволяет специалисту в данной области выделять молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют другие члены семейства белков-рецепторов Nogo в дополнение к описанным здесь последовательностям. Далее, описанные в настоящее время молекулы нуклеиновой кислоты позволяют специалисту в данной области выделять молекулы нуклеиновой кислоты, которые кодируют другие члены семейства белков-рецепторов Nogo и пептидные агенты.

По существу, специалист в данной области может легко использовать аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 и 20 или их содержащие эпитопы фрагменты для получения зондов-антител для скрининга экспрессионных библиотек, полученных из подходящих клеток. Поликлональные антитела из таких млекопитающих, как кролики, иммунизированные очищенным белком (как описано ниже), или моноклональные антитела обычно могут применяться для зондирования кДНК млекопитающих или геномных экспрессионных библиотек, таких как библиотека лямбда gt.11, для получения подходящей кодирующей последовательности других членов семейства белков.

Клонированная последовательность кДНК может экспрессироваться в качестве белка слияния, экспрессироваться непосредственно с использованием его собственных последовательностей контроля или экспрессироваться посредством конструкций, использующих последовательности контроля конкретного хозяина, использованного для экспрессии фермента.

Альтернативно, часть описанной здесь кодирующей последовательности может синтезироваться и применяться в качестве зонда для обнаружения ДНК, кодирующей член белкового семейства, в любом организме млекопитающего. Олигомеры, содержащие, например, примерно 18-20 нуклеотидов (кодирующие отрезок примерно в 6-7 аминокислот), могут быть получены и использованы для скрининга геномной ДНК или библиотек кДНК с получением гибридизации в жестких условиях или условиях с жесткостью, достаточной для элиминации нежелательного уровня ложноположительных результатов.

Кроме того, могут быть получены пары олигонуклеотидных праймеров для применения в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с целью селективного клонирования кодирующей молекулы нуклеиновой кислоты. Цикл ПЦР «денатурация/отжиг/удлинение» для применения таких праймеров ПЦР хорошо известен в данной области и может быть легко адаптирован для применения с целью выделения других кодирующих молекул нуклеиновой кислоты.

D. Молекулы рекомбинантной ДНК, содержащие молекулу нуклеиновой кислоты.

Настоящее изобретение далее относится к молекулам рекомбинантной ДНК (рДНК), которые содержат кодирующую последовательность. Используемый здесь термин «рДНК» представляет молекулу ДНК, которая подвергалась молекулярным манипуляциям. Способы получения молекул рДНК хорошо



известны в данной области, например см. Sambrook et al., (1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press. В предпочтительных молекулах рДНК кодирующая последовательность ДНК функционально связана с последовательностями контроля экспрессии и векторными последовательностями.

Выбор векторных последовательностей и последовательностей контроля экспрессии, с которыми функционально связывается одна из последовательностей, кодирующих белок белкового семейства по настоящему изобретению, зависит, как хорошо известно в данной области, непосредственно от требуемых функциональных свойств (например, экспрессии белка и клетки-хозяина, подлежащей трансформации). Вектор по настоящему изобретению может быть, по крайней мере, способным направлять репликацию или вставку в хромосому хозяина структурного гена, входящего в состав молекулы рДНК, и предпочтительно также его экспрессию.

Элементы контроля экспрессии, которые используются для регуляции экспрессии функционально связанной последовательности, кодирующей белок, известны в данной области и включают в качестве неограничивающих примеров индуцируемые промоторы, конститутивные промоторы, секреторные сигналы и другие регуляторные элементы. Предпочтительно индуцируемый промотор легко контролируется, как отвечающий на наличие питательного вещества в среде для клетки-хозяина.

В одном из осуществлений вектор, содержащий кодирующую молекулу нуклеиновой кислоты, включает прокариотический репликон, т.е. последовательность ДНК, обладающую способностью к направлению автономной репликации и поддержанию молекулы рекомбинантной ДНК внехромосомно в прокариотической клетке-хозяине, такой как прокариотическая клетка-хозяин, трансформированной ею. Такие репликоны хорошо известны в данной области. Кроме того, векторы, которые включают прокариотический репликон, могут также включать ген, экспрессия которого предоставляет детектируемый маркер, такой как лекарственная устойчивость. Обычными генами бактериальной лекарственной устойчивости являются те, что предоставляют устойчивость к ампициллину или тетрациклину.

Векторы, которые включают прокариотический репликон, могут далее включать прокариотический промотор или промотор бактериофага, способный направлять экспрессию (транскрипцию и трансляцию) кодирующих генных последовательностей в бактериальной клетке-хозяине, такой как *E. coli*. Промотор представляет собой элемент контроля экспрессии, образованный последовательностью ДНК, которая обеспечивает связывание РНК-полимеразы и то, что транскрипция происходит. Промоторные последовательности, совместимые с бактериальными хозяевами, обычно обеспечиваются в плазмидных векторах, содержащих удобные сайты рестрикции для вставки сегмента ДНК по настоящему изобретению. Примерами таких векторных плазмид являются pUC8, pUC9, pBR322 и pBR329 (Biorad Laboratories), pPL и pKK223 (Pharmacia). Любой подходящий прокариотический хозяин может использоваться для экспрессии молекулы рекомбинантной ДНК, кодирующей белок по изобретению.

Экспрессирующие векторы, совместимые с эукариотическими клетками, предпочтительно те, что совместимы с клетками позвоночных, также могут использоваться для получения молекул рДНК, которые содержат кодирующие последовательности.

Экспрессирующие векторы эукариотических клеток хорошо известны в данной области и доступны из некоторых коммерческих источников. Обычно такие векторы предоставляются с содержанием удобных сайтов рестрикции для вставки требуемого сегмента ДНК. Примерами таких векторов являются pSVL и pKSV-10 (Pharmacia), pBPV-1, pML2d (International Biotechnologies), pTDT1 (ATCC 31255) и подобные эукариотические экспрессирующие векторы.

Экспрессирующие векторы эукариотических клеток, использованные для конструирования молекул рДНК по настоящему изобретению, могут далее включать избирательный маркер, который эффективен в эукариотической клетке, предпочтительно селективный маркер лекарственной устойчивости. Предпочтительный маркер лекарственной устойчивости представляет собой ген, экспрессия которого приводит к устойчивости к неомицину, например ген неомицинофосфотрансферазы (*neo*) (Southern et al., (1982) *J. Mol. Anal. Genet.* 1, 327-341). Альтернативно, селективный маркер может присутствовать в отдельной плазмиде, два вектора могут вводиться путем совместной трансфекции в клетку-хозяина, и трансфицированные клетки отбираются путем культивирования с подходящим лекарственным средством в качестве селективного маркера.

Е. Клетки-хозяева, содержащие введенную извне кодирующую молекулу нуклеиновой кислоты.

Настоящее изобретение далее относится к клеткам-хозяевам, трансформированным молекулой нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок по настоящему изобретению. Клетка-хозяин может быть как прокариотической, так и эукариотической.

Эукариотические клетки, которые могут использоваться для экспрессии белка по изобретению, не ограничиваются при условии того, что клеточная линия совместима со способами клеточной культуры и совместима с воспроизведением экспрессирующего вектора и экспрессией генного продукта. Предпочтительные эукариотические клетки-хозяева включают в качестве неограничивающих примеров клетки дрожжей, насекомых и млекопитающих предпочтительно клетки позвоночных, такие как клеточные линии мыши, крысы, обезьяны или человека. Примеры применимых эукариотических клеток-хозяев включают клетки яичника китайского хомячка (CHO), доступные от ATCC как CCL61, клетки мышинного эм-

бриона NIH Swiss NIH-3T3, доступные от ATCC как CRL1658, клетки почки новорожденного хомячка (BHK) и подобные клеточные линии культур эукариотических тканей.

Трансформация подходящих клеток-хозяев молекулой рДНК по настоящему изобретению выполняется хорошо известными способами, которые обычно зависят от типа использованного вектора и действующей системы хозяина. В отношении трансформации прокариотической клетки-хозяина могут применяться способы электропорации и солевой обработки (см., например, Sambrook et al., (1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Cohen et al., (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 2110-2114). В отношении трансформации клеток позвоночных векторами, содержащими рДНК, могут применяться способы электропорации, обработки катионными липидами и солевой обработки (см., например, Graham et al., (1973) *Virology* 52, 456-467; Wigler et al., (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 1373-1376).

Успешно трансформированные клетки, т.е. клетки, которые содержат молекулу рДНК по настоящему изобретению, могут быть идентифицированы хорошо известными способами, включающими отбор при помощи селективного маркера. Например, клетки, полученные в результате введения рДНК по настоящему изобретению, могут быть клонированы с получением единичных колоний. Клетки из данных колоний могут отбираться, лизироваться, и содержание их ДНК может проверяться на предмет наличия рДНК с использованием способа, такого как описанный Southern, (1975) *J. Mol. Biol.* 98, 503-517, или белки, продуцированные клетками, могут анализироваться иммунологическим способом.

#### F. Продукция рекомбинантных белков с использованием молекулы рДНК.

Настоящее изобретение далее относится к способам продукции белка по изобретению с использованием описанных здесь молекул нуклеиновой кислоты. В общих терминах продукция рекомбинантной формы белка обычно включает следующие стадии.

Вначале получают молекулу нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок по изобретению, такой как молекула нуклеиновой кислоты, описанная SEQ ID NO: 1, 3, 7, 9, 11, 13, 15, 17 и 19 или нуклеотидами 166-1584 SEQ ID NO: 1 и нуклеотидами 178-1596 SEQ ID NO: 3. Если кодированная последовательность не прерывается интронами, то она непосредственно подходит для экспрессии в любом хозяине.

Тогда молекула нуклеиновой кислоты предпочтительно помещается в функциональной связи с подходящими последовательностями контроля, как описано выше, для получения экспрессионной единицы, содержащей открытую рамку считывания белка. Экспрессионную единицу используют для трансформации подходящего хозяина, а трансформированный хозяин культивируют в условиях, обеспечивающих продукцию рекомбинантного белка. Необязательно, рекомбинантный белок выделяют из среды или из клеток; выделение или очистка белка может в некоторых случаях, когда примеси допустимы, не понадобиться.

Каждая из указанных выше стадий может быть осуществлена множеством способов. Например, желаемые кодирующие последовательности могут быть получены из фрагментов генома и непосредственно использованы в подходящих хозяевах.

Конструирование экспрессирующих векторов, функциональных во множестве хозяев, осуществляют, используя подходящие репликоны и контрольные последовательности, приведенные выше. Контрольные последовательности, экспрессирующие векторы и способы трансформации, зависят от типа клетки-хозяина, применяемой для экспрессии гена, и подробно обсуждались выше. Подходящие сайты рестрикции, если таковые отсутствуют исходно, могут быть добавлены на концы кодирующей последовательности для обеспечения встраивания вырезаемого гена в данные векторы. Квалифицированный специалист может с легкостью приспособить известные в данной области хозяин/экспрессирующую систему для использования с молекулами нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению для продукции рекомбинантного белка.

#### G. Способы идентификации партнеров связывания.

Настоящее изобретение относится к способам использования белков по настоящему изобретению для выделения и идентификации партнеров связывания. В некоторых осуществлениях белок по настоящему изобретению смешивают с потенциальным партнером связывания или экстрактом или фракцией клетки в условиях, обеспечивающих связывание потенциальных партнеров связывания с белком по настоящему изобретению. После смешивания пептиды, полипептиды, белки и другие молекулы, связавшиеся с белком по настоящему изобретению, выделяют из смеси. Партнер связывания, связавшийся с белком по настоящему изобретению, может быть затем отделен и подвергнут дополнительному анализу. Для идентификации и выделения партнера связывания может быть применен полноразмерный белок, например полноразмерный белок рецептора Nogo SEQ ID NO: 2 или 4 либо полноразмерный белок Nogo SEQ ID NO: 6. Альтернативно, может быть использован фрагмент белка. Примером применимого фрагмента белка рецептора Nogo является растворимый полипептид рецептора Nogo, не содержащий трансмембранного домена (фиг. 7).

Используемый здесь термин «клеточный экстракт» относится к препарату или фракции, которые получены из лизированных или разрушенных клеток. Предпочтительным источником клеточных экстрактов являются клетки, выделенные из ткани человеческого головного или спинного мозга, например ткани головного мозга человека. Альтернативно, клеточные экстракты могут быть получены из любого

источника нервной ткани или доступных линий нервных клеток, в частности клеточных линий, происходящих от олигодендроцитов.

Для получения экстракта клетки могут использоваться разнообразные способы. Клетки могут быть разрушены с использованием физических или химических способов разрушения. Примеры физических способов разрушения включают в качестве неограниченных примеров обработку ультразвуком и механическим сдвигом. Примеры химических способов лизиса включают в качестве неограниченных примеров лизис детергентами и ферментативный лизис. Специалист в данной области может легко адаптировать способы подготовки клеточных экстрактов для получения экстрактов для применения по настоящим способам.

Как только получают экстракт клетки, экстракт смешивают с белком по изобретению при условиях, в которых может происходить ассоциация белка со связывающими партнерами. Могут использоваться разнообразные условия, причем наиболее предпочтительными являются условия, которые приближаются к условиям, обнаруженным в цитоплазме клетки человека. Такие свойства, как осмолярность, pH, температура и концентрация используемого клеточного экстракта, могут варьировать для оптимизации ассоциации белка со связывающим партнером.

После смешивания в подходящих условиях связанный комплекс отделяют от смеси. Для разделения смеси могут задействоваться различные способы. Например, для иммунопреципитации комплекса со связывающим партнером могут использоваться антитела, специфичные по отношению к белку по изобретению. Альтернативно, могут применяться стандартные способы химического разделения, такие как хроматография и седиментационное центрифугирование в градиенте плотности.

После удаления неассоциированных клеточных составляющих, находящихся в экстракте, связывающий партнер может диссоциироваться из комплекса с использованием общепринятых способов. Например, диссоциацию могут осуществлять путем изменения концентрации соли или pH смеси.

Для облегчения разделения ассоциированных пар связывающих партнеров в смешанном экстракте белок по изобретению может иммобилизоваться на твердой основе. Например, белок может привязываться к нитроцеллюлозному матриксу или акриловым гранулам. Идентифицированные связывающие партнеры могут представлять собой как отдельный белок, так и комплекс, состоящий из двух или более белков. Альтернативно, связывающие партнеры могут идентифицироваться с использованием анализа на основе слияния с щелочной фосфатазой согласно процедурам по Flanagan & Vanderhaeghen, (1998) *Annu. Rev. Neurosci.* 21, 309-345 или Takahashi et al., (1999) *Cell* 99, 59-69; путем «Дальневосточного» (Far-Western) анализа согласно процедурам по Takayama et al., (1997) *Methods Mol. Biol.* 69, 171-184 или Sauder et al., *J. Gen. Virol.* (1996) 77, 991-996, или идентифицироваться путем применения меченных эпителий белков или белков слияния с GST.

Альтернативно, молекулы нуклеиновой кислоты по изобретению могут использоваться в дрожжевой двухгибридной системе. Дрожжевая двухгибридная система была использована для идентификации других пар белковых партнеров и может быть легко адаптирована для привлечения описанных здесь молекул нуклеиновой кислоты (см. двухгибридную систему Stratagene Hybrizap®).

Н. Способы идентификации средств, модулирующих экспрессию.

Настоящее изобретение относится к способам идентификации средств, модулирующих экспрессию нуклеиновой кислоты, кодирующей белок-рецептор Nogo. Настоящее изобретение также относится к способам идентификации средств, модулирующих экспрессию нуклеиновой кислоты, кодирующей белок Nogo. Такие способы анализа могут задействовать любые доступные средства мониторинга изменений уровня экспрессии нуклеиновых кислот по изобретению. При использовании здесь о средстве говорят как о модулирующем экспрессию нуклеиновой кислоты по изобретению, например нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, обладающий последовательностью SEQ ID NO: 2, 4 или 6, если он способен регулировать повышение или снижение экспрессии нуклеиновой кислоты в клетке.

В одном из форматов анализа могут быть получены клеточные линии, которые содержат слияния с геном-репортером открытой рамки считывания, заданной нуклеотидами 166-1584 из SEQ ID NO: 1, или нуклеотидами 178-1596 из SEQ ID NO: 3, или нуклеотидами 135-3713 из SEQ ID NO: 5, и любой анализируемый партнер для слияния. Многие анализируемые партнеры для слияния известны и легкодоступны, включая ген люциферазы светляка и ген, кодирующий хлорамфениколацетилтрансферазу (Alam et al., (1990) *Anal. Biochem.* 188, 245-254). Клеточные линии, содержащие гены-репортеры, затем подвергаются действию средства, подлежащего тестированию, в подходящих условиях и в течение подходящего времени. Различия в уровне экспрессии гена-репортера между образцами, подвергшимися действию средства, и контрольными образцами приводит к идентификации средства, которое модулирует экспрессию нуклеиновой кислоты, кодирующей белок, обладающий последовательностью SEQ ID NO: 2, 4 или 6.

Дополнительные форматы анализа могут использоваться для мониторинга способности средства модулировать экспрессию нуклеиновой кислоты, кодирующей белок-рецептор Nogo по изобретению, такой как белок, обладающий аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2 или 4, или белок Nogo, обладающий аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6. Например, экспрессия мРНК может отслеживаться непосредственно путем гибридизации с нуклеиновой кислотой по изобретению. Клеточные линии подвергают действию средства, подлежащего тестированию, в подходящих условиях и

в течение подходящего времени и выделяют общую РНК или мРНК путем стандартных процедур, таких как те, что описаны Sambrook et al., (1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Зонды для детекции различий в уровне экспрессии РНК между клетками, подвергшимися действию средства, и контрольными клетками могут быть получены из нуклеиновой кислоты по изобретению. Предпочтительным, но не необходимым, является конструирование зондов, которые гибридизуются только с целевой нуклеиновой кислотой в условиях высокой жесткости. Только высококомплементарные продукты гибридизации нуклеиновых кислот образуются в условиях высокой жесткости. Соответственно, жесткость условий анализа определяет степень комплементарности, которая должна существовать между двумя цепями нуклеиновой кислоты для образования гибридной молекулы. Жесткость должна выбираться так, чтобы максимизировать различие в стабильности продукта гибридизации («зонд - мишень» и потенциального продукта гибридизации «зонд - участок, не являющийся мишенью»).

Зонды могут конструироваться из нуклеиновых кислот по изобретению способами, известными в данной области. Например, содержание G+C в зонде и длина зонда могут влиять на связывание зонда с его целевой последовательностью. Способы оптимизации специфичности зонда обычно доступны по Sambrook et al., (1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, или по Ausubel et al., (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing.

Условия гибридизации модифицируют с использованием известных способов, таких как те, что описаны Sambrook et al., (1989) или Ausubel et al., (1995), как это требуется для каждого зонда. Гибридизацию общей клеточной РНК или РНК с обогащенной фракцией polyA-РНК можно осуществлять в любом доступном формате. Например, общую клеточную РНК или РНК с обогащенной фракцией polyA+РНК можно зафиксировать на твердой основе и подвергать твердую основу воздействию по крайней мере одного зонда, включающего по крайней мере одну или часть одной из последовательностей по изобретению, при условиях, в которых будет происходить специфическая гибридизация зонда.

Альтернативно, фрагменты нуклеиновой кислоты, включающие по крайней мере одну или часть одной из последовательностей по изобретению, могут фиксироваться на твердой основе, такой как пластина на основе силикона или пластина пористого стекла. Пластина затем может подвергаться воздействию общей клеточной РНК или РНК с обогащенной фракцией polyA+РНК из образца в условиях, в которых будет происходить специфическая гибридизация зафиксированной последовательности. Такие пластины и способы гибридизации широко доступны, например те, что описаны Beattie, (1995) WO 9511755. Средства, которые регулируют экспрессию нуклеиновой кислоты, кодирующей белок-рецептор Nogo, обладающий последовательностью SEQ ID NO: 2 или 4, путем повышения или снижения экспрессии, идентифицируют путем оценки способности данного зонда к специфической гибридизации с образцом РНК из необработанной популяции клеток и из популяции клеток, подвергшихся воздействию средства.

Гибридизация с целью качественного или количественного анализа мРНК также может проводиться с использованием анализа защиты от РНКаз (т.е. RPA, см. Ma et al., *Methods* (1996) 10, 273-238). В кратком изложении экспрессионный носитель, содержащий кДНК, кодирующую генный продукт и промотор для фагоспецифической ДНК-зависимой РНК-полимеразы (например, РНК-полимеразы T7, T3 или SP6), линейаризуют с 3'-конца молекулы кДНК, ниже фагового промотора, где такая линейаризованная молекула впоследствии используется в качестве шаблона для синтеза меченого антисмыслового транскрипта кДНК путем транскрипции *in vitro*. Меченый транскрипт затем подвергают гибридизации со смесью изолированной РНК (т.е. общей или фракционированной мРНК) путем инкубации при 45°C в течение ночи в буфере, содержащем 80% формамид, 40 mM Pipes, pH 6,4, 0,4M NaCl и 1 mM ЭДТА. Полученные в результате продукты гибридизации затем расщепляли в буфере, содержащем 40 мкг/мл рибонуклеазы А и 2 мкг/мл рибонуклеазы. После дезактивации и экстракции избыточного белка образцы загружали в полиакриламидный гель с мочевиной для анализа.

В другом формате анализа средств, которые воздействуют на экспрессию конкретного генного продукта, вначале идентифицируют клетки или клеточные линии, которые экспрессируют указанные генные продукты физиологически. Ожидается, что клетки и клеточные линии, идентифицированные таким образом, должны включать необходимый клеточный аппарат, так что будет достигаться правильная модуляция транскрипционного аппарата при экзогенном контакте средства с подходящими механизмами трансдукции с поверхности и цитозольными каскадами. Далее, такие клетки или клеточные линии должны подвергаться трансдукции или трансфекции экспрессирующей несущей конструкцией (например, плазмидой или вирусным вектором), включающей дееспособный нетранслируемый 5'-промотор, содержащей конец структурного гена, кодирующего конкретный генный продукт, слитый с одним или несколькими антигенными фрагментами, являющимися специфическими для конкретных генных продуктов, где указанные фрагменты находятся под транскрипционным контролем указанного промотора и экспрессируются в качестве полипептидов, молекулярная масса которых может отличаться от встречающихся в природе полипептидов и может, кроме того, включать иммунологически отличную метку. Такой способ хорошо известен в данной области (см. Sambrook et al., (1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Клетки или клеточные линии, трансдуцированные или трансфицированные, как описано выше, за-

тем должны контактировать со средствами в подходящих условиях; например, средство включает фармацевтически приемлемый наполнитель и контактирует с клетками в водном физиологическом буфере, таком как фосфатно-солевой буфер (PBS) при физиологическом значении pH, сбалансированный солевой раствор Игла (Eagles; BSS) при физиологическом значении pH, PBS или BSS, включающие сыворотку, или кондиционированные среды, включающие PBS или BSS и сыворотку, с инкубацией при 37°C. Солевые условия могут модулироваться так, как сочтет нужным специалист в данной области. После контакта клеток со средством указанные клетки разрушают и фракционируют полипептиды из продукта разрушения таким образом, что белковую фракцию объединяют и подвергают контакту с антителом, что далее подлежит иммунологическому анализу (например, ELISA, иммунопреципитация или вестерн-блот).

Совокупность белков, выделенных из образца, «контактировавшего со средством», сравнивают с контрольным образцом, где с клетками контактировал только наполнитель, и повышение или снижение иммунологически генерированного сигнала образца, «контактировавшего с средством», по сравнению с контрольным образцом используют для характеристики эффективности средства.

I. Способы идентификации средств, которые модулируют активность.

Настоящее изобретение относится к способам идентификации средств, которые модулируют по крайней мере один тип активности белка-рецептора Nogo. Изобретение также относится к способам идентификации средств, которые модулируют по крайней мере один тип активности белка Nogo. Такие способы анализа могут задействовать любые средства мониторинга или детекции требуемой активности.

В одном из форматов может анализироваться специфическая активность белка-рецептора Nogo или белка Nogo, нормализованная относительно стандартной единицы, в сравнении между клеточной популяцией, подвергшейся воздействию средства, подлежащего тестированию, и не подвергавшейся воздействию контрольной клеточной популяцией. Клеточные линии или популяции подвергаются воздействию средства, подлежащего тестированию, в подходящих условиях и в течение подходящего времени. Из подвергшейся воздействию клеточной линии или популяции и контрольной, не подвергавшейся воздействию клеточной линии или популяции могут быть получены клеточные лизаты. Затем клеточные лизаты анализируют посредством зонда.

Зонды на основе антител могут быть получены путем иммунизации подходящих хозяев-млекопитающих при задействовании подходящих протоколов иммунизации, с использованием белка-рецептора Nogo, белка Nogo, пептидных агентов рецептора Nogo или антигенсодержащих фрагментов любого из перечисленных. Для усиления иммуногенности данные белки или фрагменты могут конъюгироваться с подходящими носителями. Способы получения иммуногенных конъюгатов с такими носителями, как BSA, KLH, или другими носителями хорошо известны в данной области. В некоторых обстоятельствах может быть эффективным прямое конъюгирование с использованием, например, карбодиимидных реагентов; в других случаях может быть желательным применение связывающих реагентов, таких как поставляемые Pierce Chemical Co., для обеспечения доступности гаптена. Гаптенные пептиды могут быть продолжены с N- или C-конца цистеиновым остатком или иметь в промежутках цистеиновые остатки, например, для облегчения связывания носителя. Введение иммуногенов проводится, главным образом, путем инъекции через подходящий период времени и с использованием подходящих адъювантов, как, в основном, принято в данной области. Во время выполнения регламента иммунизации анализируют титры антител для определения адекватности образования антител.

Хотя поликлональные антитела, получаемые таким образом, могут быть удовлетворительными для некоторых применений, для фармацевтических композиций предпочтительным является использование моноклональных препаратов. Линии immortalized клеток, которые секретируют требуемые моноклональные антитела, могут быть получены с использованием стандартных способов, см., например, Kohler & Milstein, (1992) *Biotechnology* 24, 524-526, или модификаций, которые действуют за счет immortalization лимфоцитов или клеток селезенки, как широко известно. Линии immortalized клеток, секретирующие требуемые антитела, могут подвергаться скринингу путем иммунологического анализа, в котором антиген представляет собой пептидный гаптен, полипептид или белок. Когда идентифицируют подходящую культуру immortalized клеток, секретирующую требуемое антитело, клетки могут культивироваться *in vitro* или путем продукции асцитной жидкости.

Требуемые моноклональные антитела могут извлекаться из культурального супернатанта или из асцитного супернатанта. Интактные антитела против Nogo или рецептора Nogo или их фрагментов, содержащих иммунологически значимую часть, могут применяться, например, в качестве антагонистов связывания Nogo (лиганда) с рецептором Nogo. Применение иммунологически реактивных фрагментов, таких как фрагменты Fab, Fab' из F(ab')<sub>2</sub>, часто является предпочтительным, особенно в контексте терапии, поскольку данные фрагменты обычно менее иммуногенны, чем целый иммуноглобулин.

Антитела или фрагменты могут также продуцироваться с использованием современной технологии рекомбинантными средствами. Регионы антитела, которые специфично связываются с требуемыми регионами белка, могут также продуцироваться в контексте химер с многовидовым происхождением.

Регионы антитела, которые специфично связываются с требуемыми регионами белка, могут также продуцироваться в контексте химер с многовидовым происхождением, например гуманизированные антитела. Поэтому антитело может быть гуманизированным антителом или человеческим антителом, как

описано в патенте США 5585089 или Riechmann et al., (1988) 332, 323-327.

Средства, которые анализируют вышеуказанным способом, могут быть выбраны случайным образом или выбраны или сконструированы рационально. При использовании здесь о средстве говорят как о случайным образом выбранном, когда средство выбирают случайно без рассмотрения специфических последовательностей, вовлеченных в ассоциацию одного белка по изобретению или с ассоциированными с ним субстратами, связывающими партнерами и т.д. Примером случайно выбранных средств является применение химической библиотеки, или пептидной комбинаторной библиотеки, или питательного бульона организма.

При использовании здесь о средстве говорят как о выбранном или сконструированном рационально, когда средство выбирают на неслучайной основе, беря в расчет последовательность сайта-мишени или его конформацию в связи с действием средства. Средства могут рационально выбираться или рационально конструироваться путем привлечения белковых последовательностей, которые составляют данные сайты. Например, рационально выбранное пептидное средство может представлять собой пептид, последовательность которого идентична связывающему домену (SEQ ID NO: 20) Nogo, который взаимодействует с рецептором Nogo. Альтернативно, это может быть фрагмент связывающего домена, например SEQ ID NO: 8, 10, 12, 14, 16 или 18.

Средства по настоящему изобретению могут представлять собой, например, пептиды, антитела, фрагменты антител, малые молекулы, производные витаминов, а также углеводы. Пептидные средства по изобретению могут быть получены с использованием стандартных способов твердофазного (или в растворимой фазе) пептидного синтеза, как это известно в данной области. Кроме того, ДНК, кодирующая данные пептиды, может синтезироваться с использованием коммерчески доступного оборудования олигонуклеотидного синтеза и быть получена рекомбинантно с использованием стандартных систем рекомбинантной продукции. Продукция с использованием твердофазного пептидного синтеза является необходимой, если надлежит включить неcodируемые генетически аминокислоты.

Другим классом средств по настоящему изобретению являются антитела или их фрагменты, которые связываются с белком Nogo или белком-рецептором Nogo. Средства на основе антител могут быть получены путем иммунизации подходящих субъектов-млекопитающих пептидами, содержащими антигенные регионы, причем данные части белка предназначены быть мишенями для антител.

J. Высокопроизводительные способы анализа.

Мощность высокопроизводительного скрининга используется для поиска новых соединений, которые способны взаимодействовать с белком-рецептором Nogo. Для общей информации по высокопроизводительному скринингу (например, Devlin, (1998) High Throughput Screening, Marcel Dekker; патент США 5763263). Высокопроизводительные способы анализа включают один или несколько разных технологий анализа.

Иммунодиагностика и иммунологические способы анализа.

Иммунодиагностика и иммунологические способы анализа представляют собой группу способов, используемых для измерения специфических биохимических веществ, обычно в низких концентрациях в сложных смесях, таких как биологические жидкости, которые зависят от специфичности и высокой аффинности, проявляемой подходящим образом полученными и выбранными антителами по отношению к комплементарным им антигенам. Вещество, подлежащее измерению, обязательно должно быть антигенным, или в виде иммуногенной макромолекулы, или гаптенной малой молекулы. К каждому образцу добавляют известное ограниченное количество специфичного антитела, и оценивается связавшаяся с ним доля антигена, часто выражаемая в виде отношения связанный:свободный, с использованием индикатора формы антигена, меченного радиоизотопом (радиоиммунный анализ), флуоресцентной молекулы (иммунофлуоресцентный анализ), стабильного свободного радикала (спиновый иммунологический анализ), фермента (иммуноферментный анализ) или другой легко различимой метки.

Антитела могут быть мечены различными способами, включая сорбционный иммуноферментный анализ (ELISA); радиоиммунный анализ (RIA); иммунофлуоресцентный анализ (FIA); иммунохемилюминесцентный анализ (CLIA); и мечение антитела частицами коллоидного золота (immunogold).

Обычные форматы анализа включают сэндвич-анализ, конкурентный анализ или анализ конкуренции, анализ агглютинации латекса, гомогенный анализ, формат планшетов для микротитрования и анализ, основанный на микрочастицах.

Сорбционный иммуноферментный анализ (ELISA).

ELISA представляет собой иммунохимический способ, который избегает опасности радиоактивных химикатов и дороговизны флуоресцентных систем детекции. Вместо этого, в анализе используются в качестве индикаторов ферменты. ELISA представляет собой форму количественного иммунологического анализа, основанного на применении антител (или антигенов), связанных с поверхностью нерастворимого носителя, который затем используется для «захвата» относящегося к делу антигена (или антитела) в растворе тестирования. Затем комплекс «антиген-антитело» детектируется путем измерения активности соответствующего фермента, который предварительно был ковалентно привязан к антигену (или антителу).

Для информации по способам ELISA см., например, Crowther, (1995) ELISA - Theory and Practice (Methods in Molecular Biology), Humana Press; Challacombe & Kemeny, (1998) ELISA and Other Solid Phase

Immunoassays - Theoretical and Practical Aspects, John Wiley; Kemeny, (1991) A Practical Guide to ELISA, Pergamon Press; Ishikawa, (1991) Ultrasensitive and Rapid Enzyme Immunoassay (Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology) Elsevier.

Колориметрические способы анализа ферментов.

Колориметрия является тем способом количественного химического анализа, в котором концентрация или количество соединения определяется путем сравнения окраски, продуцируемой реакцией реагента со стандартными и тестируемыми количествами соединения с использованием, например, колориметра или спектрофотометра.

Стандартные колориметрические способы анализа бета-галактозидазной ферментной активности хорошо известны специалистам в данной области (см., например, Norton et al., (1985) Mol. Cell. Biol. 5, 281-290). Колориметрический анализ может проводиться на цельноклеточных лизатах с использованием О-нитрофенил-бета-D-галактопиранозида (ONPG, Sigma) в качестве субстрата в стандартном колориметрическом бета-галактозидажном анализе (Sambrook et al., (1989) Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Также доступны способы автоматического колориметрического анализа для детекции бета-галактозидазной активности (см., например, патент США 5733720).

Иммунофлуоресцентные способы анализа.

Иммунофлуоресценция или иммунофлуоресцентная микроскопия является способом, в котором антиген или антитело делают флуоресцентным путем конъюгирования с флуоресцентной меткой и затем им позволяют прореагировать с комплементарным антителом или антигеном на срезе или мазке ткани. Локализация антигена или антитела затем может определяться наблюдением флуоресценции путем микроскопии в ультрафиолетовом свете.

Для общей информации по иммунофлуоресцентным способам см., например, Knapp et al., (1978) Immunofluorescence and Related Staining Techniques, Elsevier; Allan, (1999) Protein Localization by Fluorescent Microscopy - A Practical Approach (The Practical Approach Series) Oxford University Press; Caul, (1993) Immunofluorescence Antigen Detection Techniques in Diagnostic Microbiology, Cambridge University Press. Для детального объяснения иммунофлуоресцентных способов, которые могут применяться по настоящему изобретению, см. патент США 5912176; патент США 5869264; патент США 5866319; и патент США 5861259.

К. Применение средств, модулирующих активность.

Как описано в примерах, белки и нуклеиновые кислоты Nogo и рецептора Nogo, такие как белки, обладающие аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, 4 или 6, экспрессируются в миелине, происходящем из аксона и дендритов. Средства, которые модулируют или регулируют повышение или снижение экспрессии Nogo или белка-рецептора Nogo, или средства, такие как агонисты или антагонисты по крайней мере одного типа активности Nogo или белка-рецептора Nogo, могут использоваться для модулирования биологических и патологических процессов, ассоциированных с функцией и активностью белков. Изобретение, в частности, может использоваться для лечения людей.

Патологические процессы относятся к биологическим процессам, которые имеют вредоносный эффект. Например, экспрессия белка по изобретению может быть ассоциирована с ингибированием регенерации аксонов после черепной, церебральной или спинальной травмы, инсульта или демиелинизирующего заболевания. Такие демиелинизирующие заболевания включают в качестве неограниченных примеров рассеянный склероз, монофазную демиелинизацию, энцефаломиелит, мультифокальную лейкоэнцефалопатию, панэнцефалит, болезнь Маркьяфава-Биньями (Marchiafava-Bignami), миелинолизис моста, аденолейкодистрофию, болезнь Пелицеуса-Мерцбахера (Pelizaeus-Merzbacher), спонгиозную дегенерацию, болезнь Александра (Alexander), болезнь Канавана (Canavan), метахроматическую лейкодистрофию и болезнь Краббе (Krabbe). При использовании здесь о средстве говорят как о модулирующем патологический процесс, когда средство снижает степень или тяжесть процесса. Например, может предотвращаться демиелинизирующее заболевание или модулироваться прогрессирование заболевания путем введения средств, которые снижают, способствуют или модулируют некоторым образом экспрессию по крайней мере одного типа активности белка по изобретению.

В одном из примеров введение пептидных средств (агентов) на основе Nogo, показанных SEQ ID NO: 8, 10, 12, 14, 16, 18 и 20, может применяться для лечения демиелинизирующего заболевания, ассоциированного с Nogo и белком-рецептором Nogo. В другом примере клетки, которые экспрессируют пептидные средства по изобретению, могут трансплантироваться в место повреждения спинного мозга для облегчения роста аксонов через поврежденный участок. Такие трансплантированные клетки представляют собой средство для восстановления функции спинного мозга после повреждения или травмы.

Еще в одном примере введение растворимого белка-рецептора Nogo, который связывается с Nogo, может использоваться для лечения демиелинизирующего заболевания, ассоциированного с Nogo или с белком-рецептором Nogo. Данное средство может использоваться для предотвращения связывания Nogo со связанным с клеткой рецептором Nogo и действует как антагонист Nogo. Растворимые рецепторы использовались для связывания цитокинов и других лигандов для регуляции их функции (Thomson, (1998) Cytokine Handbook, Academic Press). Растворимый рецептор оказывается в растворе или вне мембраны. Растворимые рецепторы могут возникать в результате отсутствия сегмента молекулы, который пронизы-

вает или ассоциируется с мембраной. Данный сегмент обычно обозначается в данной области как транс-мембранный домен гена или мембраносвязывающий сегмент белка. Таким образом, в некоторых осуществлениях изобретения растворимый фрагмент включает фрагмент или аналог мембраносвязанного рецептора. Предпочтительно фрагмент содержит по крайней мере 6, например 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60 или 70 аминокислот, что обеспечивает поддержание его требуемой активности.

В других осуществлениях изобретения модифицируют структуру сегмента, который ассоциирован с мембраной (например, полиморфизм последовательности ДНК или мутация в гене), таким образом, что рецептор не вставляется в мембрану или рецептор вставляется, но не остается внутри мембраны. Таким образом, растворимый рецептор, по контрасту с соответствующей мембраносвязанной формой, отличается одним или несколькими сегментами гена белка-рецептора, которые важны для ассоциации с мембраной.

Средства по настоящему изобретению могут предоставляться по одному, или в комбинации, или в последовательной комбинации с другими средствами, которые модулируют конкретный патологический процесс. Например, средство по настоящему изобретению может вводиться в комбинации с противовоспалительными средствами после инсульта как средство для блокирования дальнейшего повреждения нейронов и ингибирования регенерации аксонов. При использовании здесь говорят, что два средства вводятся в комбинации, когда два средства вводятся одновременно или вводятся независимо таким образом, что средства будут действовать в одно и то же время.

Средства по настоящему изобретению могут вводиться парентеральным, подкожным, внутривенным, внутримышечным, внутрибрюшинным, чрескожным или буккальным путем. Например, средство может вводиться местно в участок повреждения путем микроинфузии. Обычно участки включают в качестве неограниченных примеров поврежденные области спинного мозга, возникшие в результате травмы, или поврежденные участки в головном мозге, возникшие в результате инсульта. Альтернативно или одновременно, введение может происходить пероральным путем.

Вводимая дозировка зависит от возраста, здоровья и массы реципиента, вида одновременного лечения, если таковое проводится, частоты лечения и природы требуемого действия.

Настоящее изобретение далее относится к композициям, содержащим одно или несколько средств, которые модулируют экспрессию по крайней мере одного типа активности белка по изобретению. Когда индивидуальные потребности варьируют, определение оптимальных пределов эффективных количеств каждого компонента зависит от специалиста в данной области. Обычные дозировки включают от 1 пг/кг до 100 мг/кг массы тела. Предпочтительные дозировки для системного введения включают от 100 нг/кг до 100 мг/кг массы тела. Предпочтительные дозировки для непосредственного введения в участок путем микроинфузии включают от 1 нг/кг до 1 мкг/кг массы тела.

В дополнение к фармакологически активному средству композиции по настоящему изобретению могут содержать подходящие фармацевтически приемлемые наполнители и добавки, которые облегчают переработку активных соединений в препараты, которые могут применяться в фармацевтике для доставки к месту действия. Подходящие препараты для парентерального введения включают водные растворы активного соединения в водорастворимой форме, например в виде водорастворимых солей. Кроме того, могут вводиться суспензии активных соединений в виде подходящих масляных суспензий для инъекций. Подходящие липофильные растворители или носители включают жирные масла, например кунжутное масло, или синтетические эфиры жирных кислот, например этилолеат или триглицериды. Водные суспензии для инъекций могут содержать вещества, которые повышают вязкость суспензий, включая, например, карбоксиметилцеллюлозу, сорбит и декстран. Суспензии также могут необязательно содержать стабилизаторы. Для инкапсуляции средства при доставке в клетку также могут использоваться липосомы.

Фармацевтический препарат для системного введения по изобретению может состояться для внутреннего, парентерального или местного введения. В действительности, все три типа препаратов могут использоваться одновременно для достижения системного введения активного ингредиента. Подходящие препараты для перорального введения включают твердые или мягкие желатиновые капсулы, пилюли, таблетки, включая покрытые таблетки, эликсиры, суспензии, сиропы или жидкости для ингаляции и их формы с контролируемым высвобождением.

При осуществлении способов данного изобретения средства по данному изобретению могут использоваться по одному, или в комбинации, или в комбинации с другими терапевтическими или диагностическими средствами. В некоторых предпочтительных осуществлениях соединения по данному изобретению могут вводиться совместно с другими соединениями, обычно предписанными для данных состояний согласно общепринятой медицинской практике, такими как противовоспалительные средства, антикоагулянты, противотромботические средства, включая ингибиторы агрегации тромбоцитов, активаторы тканевого плазминогена, урокиназу, проурокиназу, стрептокиназу, аспирин и гепарин. Соединения по данному изобретению могут применяться *in vivo*, обычно на млекопитающих, таких как люди, овцы, лошади, крупный рогатый скот, свиньи, собаки, кошки и мыши, или *in vitro*.

L. Пептидные миметики.

Данное изобретение также включает пептидные миметики, которые имитируют трехмерную структуру Nogo и блокируют связывание Nogo с рецептором Nogo. Такие пептидные миметики могут обла-



дать значительными преимуществами над встречающимися в природе пептидами, включая, например, более экономичное получение, большую химическую стабильность, улучшенные фармакологические свойства (период полужизни, всасывание, мощность, действенность и т.д.), измененную специфичность (например, более широкий спектр типов биологической активности), сниженную антигенность и др.

В одной из форм миметики представляют собой пептидсодержащие молекулы, которые имитируют элементы вторичной структуры белка (см., например, Johnson et al., (1993) *Peptide Turn Mimetics*, in *Biotechnology and Pharmacy*, Pezzuto et al., (editors) Chapman and Hall). Основным логическим обоснованием применению пептидных миметиков является то, что пептидный остов белков, главным образом, существует с ориентацией аминокислотных боковых групп, способствующей молекулярным взаимодействиям, таким как между антителом и антигеном. Ожидается, что пептидный миметик обеспечивает молекулярное взаимодействие, сходное с таковым природной молекулы.

В другой форме аналоги пептидов обычно используются в фармацевтической промышленности в виде непептидных лекарственных средств со свойствами, аналогичными таковым для эталонных пептидов. Данные типы непептидных соединений также относятся к «пептидным миметикам» или «пептидо-миметикам» ((Fauchere, (1986) *Adv. Drug Res.* 15, 29-69; Veber & Freidinger, (1985) *Trends Neurosci.* 8, 392-396; Evans et al., (1987) *J. Med. Chem.* 30, 1229-1239, которые включены сюда в качестве ссылки) и обычно разрабатываются с помощью компьютеризированного молекулярного моделирования.

Пептидные миметики, которые являются структурно сходными с пептидами, применяемыми в терапии, могут использоваться для получения эквивалентного терапевтического или профилактического эффекта. Как правило, пептидные миметики структурно сходны с эталонным полипептидом (т.е. полипептидом, который обладает биохимическими свойствами или фармакологической активностью), таким как внеклеточный домен Nogo, но имеют одну или несколько пептидных связей, необязательно замещенных связью, выбранной из группы, состоящей из  $-\text{CH}_2\text{NH}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{S}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}-$  (цис- и транс-),  $-\text{COCH}_2-$ ,  $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$  и  $-\text{CH}_2\text{SO}-$ , способами, известными в данной области и описанными далее следующими ссылками: Weinstein, (1983) *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins*, Marcel Dekker; Morley, (1980) *Trends Pharmacol. Sci.* 1, 463-468 (общий обзор); Hudson et al., (1979) *Int. J. Pept. Protein Res.* 14, 177-185 ( $-\text{CH}_2\text{NH}-$ ,  $\text{CH}_2\text{CH}_2-$ ); Spatola et al., (1986) *Life Sci.* 38, 1243-1249 ( $-\text{CH}_2\text{S}-$ ); Hann, (1982) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 1, 307-314 ( $-\text{CH}=\text{CH}-$ , цис- и транс-); Almquist et al., (1980) *J. Med. Chem.* 23, 1392-1398 ( $-\text{COCH}_2-$ ); Jennings-White et al., (1982) *Tetrahedron Lett.* 23, 2533 ( $-\text{COCH}_2-$ ); Holladay et al., (1983) *Tetrahedron Lett.* 24, 4401-4404 ( $-\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2-$ ); и Hruby, (1982) *Life Sci.* 31, 189-199 ( $-\text{CH}_2\text{S}-$ ); каждая из которых включена сюда в качестве ссылки.

Мечение пептидных миметиков часто включает ковалентное пришивание одной или нескольких меток, непосредственно или через спейсер (например, амидную группу), к позиции(-ям) пептидного миметика, не мешающей связыванию, которая предсказывается посредством количественных данных по структуре-активности и молекулярного моделирования. Такие позиции на пептидном миметике, не мешающие связыванию, как правило, представляют собой позиции, которые не образуют прямых контактов с макромолекулой(-ами) (например, не являются точками контакта в комплексах Nogo-рецептор Nogo), с которой связывается пептидный миметик для получения терапевтического эффекта. Дериватизация (например, мечение) пептидных миметиков не должна существенно мешать требуемой биологической или фармакологической активности пептидного миметика.

Пептидные миметики Nogo могут конструироваться посредством конструирования лекарственных средств, основанного на структуре, путем замен аминокислот органическими группами (см., например, Hughes, (1980) *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 290, 387-394; Hodgson, (1991) *Biotechnol.* 9, 19-21; Suckling, (1991) *Sci. Prog.* 75, 323-359).

Применение пептидных миметиков может быть улучшено путем использования комбинаторной химии с целью создания библиотек лекарственных средств. В конструировании пептидных миметиков может помочь идентификация аминокислотных мутаций, которые повышают или снижают связывание Nogo с рецептором Nogo. Подходы, которые могут использоваться, включают дрожжевой двухгибридный метод (см. Chien et al., (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9578-9582) и применение метода фагового дисплея. Посредством двухгибридного метода выявляют белок-белковые взаимодействия у дрожжей (Fields et al., (1989) *Nature* 340, 245-246). Посредством метода фагового дисплея выявляют взаимодействия между иммобилизованным белком и белком, который экспрессирован на поверхности фагов, таких как лямбда и M13 (Amberg et al., (1993) *Strategies* 6, 2-4; Hogrefe et al., (1993) *Gene* 128, 119-126). Данные способы позволяют проводить позитивную и негативную селекцию белок-белковых взаимодействий и идентификацию последовательностей, которые определяют данные взаимодействия.

Для общей информации по пептидному синтезу и пептидным миметикам см., например, Jones, (1992) *Amino Acid and Peptide Synthesis*, Oxford University Press; Jung, (1997) *Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries: A Handbook*, John Wiley; Bodanszky et al., (1993) *Peptide Chemistry - A Practical Textbook*, Springer Verlag.

М. Трансгенные животные.

Используемый здесь термин «животное» включает всех позвоночных животных, кроме человека. Он также включает индивидуальное животное на всех стадиях развития, включая стадии эмбриона и

плода. «Трансгенное животное» представляет собой животное, содержащее одну или несколько клеток, несущих генетическую информацию, полученную, непосредственно или непрямым путем, посредством преднамеренной генетической манипуляции на клеточном уровне, такой как микроинъекция или инфекция рекомбинантным вирусом. Данная введенная молекула ДНК может интегрироваться в хромосому, или она может быть внехромосомно реплицирующейся ДНК. Термин «трансгенное по клеткам зародышевой линии животное» относится к трансгенному животному, в котором генетическая информация введена в линию зародышевых клеток, таким образом оно приобретает способность передавать информацию потомству. Если такое потомство обладает некоторой частью такой информации, то оно тогда также является трансгенными животными. Трансгенные животные, содержащие мутантные гены, «нокаут»-гены, модифицированные гены или генные конструкции для избыточной экспрессии или экспрессии в зависимости от условий гена, соответствующего последовательностям кДНК SEQ ID NO: 1 или 3 или родственным последовательностям, относятся к настоящему изобретению.

Информация может быть чужеродной для вида животного, к которому относится реципиент, чужеродной только для конкретного индивидуального реципиента, или генетическая информация может всегда быть присуща реципиенту. В последнем случае введенный ген может быть по-другому экспрессирован по сравнению с нативным эндогенным геном. Гены могут быть получены путем выделения их из геномных источников, путем получения кДНК из выделенных шаблонных РНК, путем прямого синтеза или путем некоторых комбинаций перечисленного.

Для экспрессии ген должен быть функционально связан с регуляторным регионом. Регуляторные регионы, такие как промоторы, могут использоваться для повышения, снижения, регуляции или приурочивания к конкретным тканям или конкретным стадиям развития экспрессии гена. Промотор не обязательно должен быть встречающимся в природе промотором. «Трансгенные животные, не являющиеся человеком» по изобретению получают путем введения «трансгенов» в зародышевые клеточные линии животных, не являющихся человеком. Способы, позволяющие введение ДНК в клетки, как правило, доступны и хорошо известны в данной области. Могут использоваться различные способы введения трансгенов. Как правило, зигота является лучшей мишенью для микроинъекции. У мыши мужской пронуклеус достигает размеров приблизительно 20 мкм в диаметре, что позволяет проведение воспроизводимой инъекции 1 или 2 пл раствора ДНК. Применение зигот в качестве мишени для генного переноса имеет большое преимущество. В большинстве случаев инъекционная ДНК включается в ген хозяина до первого дробления (Brinster et al., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 4438-4442). Впоследствии примерно все клетки трансгенного животного, не являющегося человеком, будут нести включившийся трансген. Как правило, это также приводит к эффективной передаче трансгена потомству производителя, поскольку 50% зародышевых клеток несут трансген. Микроинъекция зигот является предпочтительным способом введения трансгенов при осуществлении изобретения.

Также для введения трансгена в животное, отличное от человека, может использоваться ретровирусная инфекция. Развивающийся нечеловеческий эмбрион можно культивировать *in vitro* до стадии бластоцисты. В течение этого времени бластомеры могут являться мишенью для ретровирусной инфекции. Эффективное инфицирование бластомеров получают путем ферментной обработки с целью удаления *zona pellucida*. Система вирусных векторов, используемая для введения трансгена, обычно представляет собой дефектный в плане репликации ретровирус, несущий трансген (Jahner et al., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6927-6931; Van der Putten et al., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6148-6152). Трансфекцию легко и эффективно осуществляют путем культивирования бластомеров на монослое продуцирующих вирус клеток (Van der Putten et al., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6148-6152; Stewart et al., (1987) EMBO J. 6, 383-388). Альтернативно, инфицирование можно проводить на более поздней стадии. Вирус или продуцирующие вирус клетки можно инъектировать в бластоцеллу (Jahner et al., (1982) Nature 298, 623-628). Большинство животных-производителей являются мозаичными в плане наличия трансгена, поскольку включение происходит только в отдельные группы клеток, которые образуют трансгенное животное, отличное от человека. Более того, животное-производитель может содержать ретровирусные вставки трансгена в различных позициях генома; они, как правило, разделяются в потомстве. Кроме того, также возможно введение трансгенов в зародышевую линию, хотя с меньшей эффективностью, путем внутриматочного инфицирования эмбриона в середине гестации (Jahner et al., (1982) Nature 298, 623-628).

Третьим типом клетки-мишени для введения трансгена является эмбриональная стволовая клетка (ES). Клетки ES получают из доимплантационных эмбрионов, культивируемых *in vitro* (Evans et al., (1981) Nature 292, 154-156; Bradley et al., (1984) Nature 309, 255-256; Gossler et al., (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 9065-9069). Трансгены могут эффективно вводиться в клетки ES путем трансфекции ДНК или путем ретровирусопосредованной трансдукции. Полученные в результате трансформированные клетки ES могут после этого комбинироваться с бластоцистой животного, не являющегося человеком. Клетки ES колонизируют эмбрион и вносят вклад в зародышевую линию полученного химерного животного.

Способы оценки присутствия введенной ДНК, а также ее экспрессии легко доступны и хорошо известны в данной области. Такие способы включают в качестве неограниченных примеров (саузерн-)гиб-

ридизацию ДНК для выявления экзогенной ДНК, полимеразную цепную реакцию (ПЦР), электрофорез в полиакриламидном геле (PAGE) и вестерн-блоттинг для выявления ДНК, РНК и белка. Способы включают иммунологические и гистохимические подходы для выявления экспрессии гена рецептора Nogo.

Используемый здесь термин «трансен» представляет собой последовательность ДНК, введенную в зародышевую линию животного, не являющегося человеком, путем человеческого вмешательства, таким путем, как описано ниже в примерах. Последовательность нуклеиновой кислоты трансгена, в данном случае формы SEQ ID NO: 1 или 3, может интегрироваться в локус генома, где данная конкретная последовательность нуклеиновой кислоты не обнаружена в норме, или, наоборот, в нормальный локус для трансгена. Трансен может состоять из последовательностей нуклеиновых кислот, происходящих из генома того же вида или других видов по отношению к виду целевого животного. Например, регенерация аксонов у мыши, лишенной Nogo, может сравниваться с таковой у мыши, лишенной MAG или как MAG, так и Nogo. Для определения того, является ли действие антител против Nogo следствием блокады Nogo, эффекты антител могут исследоваться на животных, лишенных экспрессии Nogo.

Как обсуждалось выше, нуклеиновая кислота по изобретению может трансфицировать в клетку-хозяин с использованием вектора. Предпочтительными векторами являются плазмиды и вирусные векторы, такие как ретровирусы. Вирусные векторы могут использоваться для получения трансгенного животного по изобретению. Предпочтительно вирусные векторы являются дефектными в плане репликации, то есть они не могут автономно реплицироваться в клетке-мишени. Как правило, геном вирусных векторов, дефектных в плане репликации, которые используются в рамках настоящего изобретения, не содержит по крайней мере один регион, необходимый для репликации вируса в инфицированной клетке. Данные регионы или могут быть элиминированы (целиком или частично), или сделаны нефункциональными любым способом, известным специалисту в данной области. Данные способы включают полное удаление, замену (другими последовательностями, в частности вставленной нуклеиновой кислотой), частичную делецию или добавление одного или нескольких оснований в существенный (для репликации) регион. Данные способы могут осуществляться *in vitro* (на выделенной ДНК) или *in situ* с использованием способов генетической манипуляции или путем обработки мутагенными агентами.

Предпочтительно вирус, дефектный в плане репликации, сохраняет последовательности его генома, необходимые для упаковывания в капсид вирусных частиц. Ретровирусы являются интегрирующимися вирусами, которые инфицируют делящиеся клетки. Ретровирусный геном включает два LTR, последовательность включения в капсид и три кодирующих региона (*gag*, *pol* и *env*). Описана конструкция рекомбинантных ретровирусных векторов (см., например, Bernstein et al., (1985) Genet. Eng. 7, 235; McCormick, (1985) Biotechnol. 3, 689-691). В рекомбинантных ретровирусных векторах гены *gag*, *pol* и *env*, как правило, подвергнуты делеции, полностью или частично, и замещены интересующей гетерологической последовательностью нуклеиновой кислоты. Данные векторы могут конструироваться из разных типов ретровирусов, таких как ВИЧ, MoMuLV (вирус мышиного лейкоза Молони (Moloney)), MSV (вирус мышиной саркомы Молони), HaSV (вирус саркомы Харви (Harvey)); SNV (вирус некроза селезенки); RSV (вирус саркомы Рауша (Rous)) вирус Френда (Friend).

Как правило, для конструирования рекомбинантных ретровирусов, содержащих последовательность нуклеиновой кислоты, конструируют плазмиду, которая содержит LTR, последовательность включения в капсид и кодирующую последовательность. Данная конструкция используется для трансфицирования в упаковочную клеточную линию, причем клетки данной линии способны возмещать в транс-положении функции ретровируса, которых не хватает в плазмиде. Как правило, упаковочные клеточные линии способны, таким образом, экспрессировать гены *gag*, *pol* и *env*. Такие упаковочные клеточные линии описаны в предшествующих исследованиях, в частности клеточная линия PA317 (патент США 4861719); клеточная линия PsiCRIP (WO 9002806) и клеточная линия GP+envAm-12 (WO 8907150). Кроме того, рекомбинантные ретровирусные векторы могут содержать модификации внутри LTR для подавления транскрипционной активности, а также последовательности интенсивного включения в капсид, которые могут включать часть гена *gag* (Bender et al., (1987) J. Virol. 61, 1639-1646). Рекомбинантные ретровирусные векторы очищают посредством стандартных способов, известных рядовым специалистам в данной области.

В одном из аспектов нуклеиновая кислота кодирует антисмысловую молекулу РНК. В данном осуществлении нуклеиновую кислоту функционально связывают с подходящими регуляторными регионами (обсуждаемыми выше), делающими возможной экспрессию последовательности нуклеиновой кислоты, и вводят в клетку, задействуя, предпочтительно, рекомбинантные векторные конструкции, которые будут экспрессировать антисмысловую нуклеиновую кислоту, как только вектор будет введен в клетку. Примеры подходящих векторов включают плазмиды, аденовирусы, аденоассоциированные вирусы (см., например, патент США 4797368, патент США 5139941), ретровирусы (см. выше) и герпесвирусы. Для доставки терапевтического гена вектор предпочтительно является аденоассоциированным вирусом.

Аденовирусы представляют собой ДНК-вирусы эукариотов, которые могут модифицироваться для эффективной доставки нуклеиновой кислоты по изобретению в различные клеточные типы. Существуют различные серотипы аденовируса. Из этих серотипов предпочтение в рамках настоящего изобретения отдается применению аденовирусам человека второго типа или пятого типа (Ad 2 или Ad 5) или адено-

вирусам животного происхождения (см. WO 9426914). Данные аденовирусы животного происхождения, которые могут применяться в рамках настоящего изобретения, включают аденовирусы, происходящие из лошади, быка, мыши, овцы, свиньи и обезьян.

Рекомбинантные аденовирусы по изобретению, дефектные в плане репликации, могут быть получены любым способом, известным специалисту в данной области. В частности, они могут быть получены путем гомологичной рекомбинации между аденовирусом и плазмидой, которая, среди прочего, несет интересующую последовательность ДНК. Гомологичная рекомбинация происходит после совместной трансфекции указанными аденовирусом и плазмидой подходящей клеточной линии. Клеточная линия, которая задействуется, должна предпочтительно (i) быть способной к трансформации указанными элементами и (ii) содержать последовательности, способные восполнять часть генома дефектного в плане репликации аденовируса, предпочтительно в интегрированной форме во избежание риска рекомбинации. Рекомбинантные аденовирусы выделяют и очищают с использованием стандартных молекулярно-биологических способов, которые хорошо известны рядовому специалисту в данной области.

Было получено некоторое количество рекомбинантных или трансгенных мышей, включая тех, что экспрессировали последовательность активированного онкогена (патент США 4736866); экспрессировали обезьяний Т-антиген SV 40 (патент США 5728915); были лишены экспрессии регуляторного фактора интерферона 1 (IRF-1) (патент США 5731490); проявляли дофаминергическую дисфункцию (патент США 5723719); экспрессировали по крайней мере один ген человека, который участвовал в контроле кровяного давления (патент США 5731489); проявляли большое сходство с состояниями, существующими при встречающейся в природе болезни Альцгеймера (патент США 5720936); обладали сниженной способностью опосредовать клеточную адгезию (патент США 5602307); обладали геном бычьего гормона роста (Clutter et al., (1996) *Genetics* 143, 1753-1760); или были способны генерировать ответ полностью человеческих антител (Zou et al., (1993) *Science* 262, 1271-1274).

Хотя мыши и крысы остаются животными выбора во многих трансгенных экспериментах, в некоторых случаях предпочтительно или даже необходимо использовать альтернативные виды животных. Трансгенные процедуры успешно применяли на различных немывшевидных животных, включая овец, коз, кур, хомяков, кроликов, коров и морских свинок (см. Aigner et al., (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257, 843-850; Castro et al., (1999) *Genet. Anal.* 15, 179-187; Brink et al., (2000) *Theriogenology* 53, 139-148; Colman, (1999) *Genet. Anal.* 15, 167-173; Eyestone, (1999) *Theriogenology* 51, 509-517; Baguisi et al., (1999) *Nat. Biotechnol.* 17, 456-461; Prather et al., (1999) *Theriogenology* 51, 487-498; Pain et al., (1999) *Cells Tissues Organs* 165, 212-219; Fernandez et al., (1999) *Indian J. Exp. Biol.* 37, 1085-1092; патент США 5908969; патент США 5792902; патент США 5892070; патент США 6025540).

#### N. Диагностические способы.

Одно из средств для диагностики демиелинизирующих заболеваний с использованием молекул нуклеиновой кислоты включает получение образца ткани из живых субъектов. Получение образцов ткани из живых источников является проблематичным для таких тканей, как таковые центральной нервной системы. От пациентов, страдающих демиелинизирующим заболеванием, образцы ткани для диагностических способов могут быть получены путем менее инвазивных процедур. Например, образцы могут быть получены из цельной крови и сыворотки.

Применение молекулярно-биологических средств стало рутинным в судебной технологии. Например, для определения экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты, включающей SEQ ID NO: 1, в судебных патологических образцах могут использоваться зонды на основе нуклеиновой кислоты. Кроме того, способы анализа нуклеиновой кислоты могут осуществляться любыми средствами проведения анализа транскрипционного профиля. В дополнение к анализу нуклеиновой кислоты судебные способы по изобретению могут быть нацелены на белок, кодированный SEQ ID NO: 1, для определения регуляции, повышающей или снижающей экспрессию генов (Shiverick et al., (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 393, 124-133).

Способы по изобретению могут включать обработку тканей коллагеназами и другими протеазами для того, чтобы сделать ткань подверженной клеточному лизису (Semenov et al., (1987) *Biull. Eksp. Biol. Med.* 104, 113-116). Кроме того, возможно получение образцов биопсии из разных регионов головного мозга для анализа.

Способы анализа для детекции молекул нуклеиновой кислоты или белка по изобретению могут быть в любом доступном формате. Обычные способы анализа молекул нуклеиновой кислоты включают гибридизацию или форматы, основанные на ПЦР. Обычные способы анализа для детекции белков, полипептидов или пептидов по изобретению включают применение зондов-антител в любом доступном формате, таком как анализ связывания *in situ*, и т.д. См. Harlow & Lane, (1988) *Antibodies - A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press. В предпочтительных осуществлениях анализа проводятся с соответствующими контролями.

Без дальнейшего описания предполагается, что рядовой специалист в данной области может, используя предшествующее описание и последующие иллюстративные примеры, получить и задействовать соединения по настоящему изобретению и осуществить входящие в формулу изобретения способы. Поэтому следующие рабочие примеры специально показывают предпочтительные осуществления настоящего изобретения и не истолковываются как любым образом ограничивающие оставшуюся часть описания.

### Примеры

Пример 1. Идентификация Nogo как члена ретикулонового семейства белков.

Регенерация аксонов взрослых млекопитающих, как правило, успешно проходит на периферии, но, к сожалению, слабо выражена в ЦНС. Однако многие классы аксонов ЦНС могут вытягиваться на большие расстояния при трансплантации на нервную периферию (Benfy & Aguayo (1982) *Nature* 296, 150-152). При сравнении миелина ЦНС и периферической нервной системы (ПНС) выявлено, что белое вещество ЦНС является избирательным ингибитором разрастания аксонов (Schwab & Thoenen (1985) *J. Neurosci.* 5, 2415-2423). Описаны некоторые компоненты белого вещества ЦНС, NI135, NI250 (Nogo) и MAG с ингибиторной активностью по отношению к вытягиванию аксонов (Wang et al., (1999) *Transduction of inhibitory signals by the axonal growth cone*, in *Neurobiology of Spinal Cord Injury*, Kalb & Strittmatter (editors) Humana Press; Caroni & Schwab, (1988) *J. Cell Biol.* 106, 1281-1288; Spillmann et al., (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 19283-19293; McKerracher et al., (1994) *Neuron* 13, 805-811; Mukhopadhyay et al., (1994) *Neuron* 13, 757-767). Антитело IN-1, полученное против NI135 и NI250 (Nogo), приводило, как сообщалось, к умеренной степени регенерации аксонов и восстановления функции после травмы спинного мозга (Bregman et al., (1995) *Nature* 378, 498-501; Thallmair et al., (1998) *Nature Neurosci.* 1, 24-31). По настоящему изобретению Nogo идентифицирован как член белкового семейства ретикулона.

Nogo экспрессируется олигодендроцитами, но не Шванновскими клетками, и первоначально ассоциирован с эндоплазматическим ретикуломом. Люменально-внеклеточный домен Nogo, состоящий из 66 аминокислот (SEQ ID NO: 20), ингибирует вытягивание аксонов и выводит из строя конусы роста ганглиев дорзальных корешков. Другие ретикулоновые белки не экспрессируются олигодендроцитами, и люменально-внеклеточный 66-аминокислотный домен других ретикулоновых белков не ингибирует регенерацию аксонов. Эти данные обеспечивают молекулярную основу причастности Nogo к отсутствию регенерации аксонов в ЦНС взрослых.

Для экспрессии и белковой очистки рекомбинантного Nogo-A полноразмерная последовательность (KIAA0886) была любезно предоставлена Kazusa DNA Research Institute. Полноразмерную кодирующую последовательность амплифицировали посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) и лигировали в вектор pCDNA3.1-MycHis (Invitrogen) с получением плазмиды, кодирующей Nogo-A, слитый с С-концом эпитопа Мус (Nogo-A-Мус). Альтернативно, кодирующую последовательность амплифицировали с использованием праймеров, которые кодируют в рамке эпитоп Мус сразу с N-конца от первого остатка и стоп-кодон с С-конца (Мус-Nogo-A). Экспрессирующие векторы Nogo-C-MycHis и Rtn1C-MycHis были получены в той же манере, кроме того, что в качестве шаблона для реакции ПЦР использовали библиотеку кДНК головного мозга взрослой крысы, с праймерами, основанными на последовательностях Nogo-C или Rtn1C (Van de Velde et al., (1994) *J. Cell. Sci.* 107, 2403-2416). Данными плазмидами трансфицировали COS-7 или HEK293T посредством Lipofectamine (Gibco-BRL) или по способу FuGENE 6 (Boehringer Mannheim).

Часть Nogo-A, кодирующую 66-аминокислотный люменально-внеклеточный фрагмент Nogo-A, амплифицировали посредством ПЦР и лигировали в плазмиду pGEX-2T с получением прокариотического экспрессирующего вектора для белка слияния GST-Nogo. Сходные регионы Rtn1, Rtn2 и Rtn3 амплифицировали путем вложенной ПЦР с использованием в качестве шаблона библиотеки кДНК головного мозга взрослой крысы и лигировали в pGEX-2T. *E. coli*, трансформированную данными плазмидами, индуцировали IPTG. Растворимые, нативные белки слияния с GST очищали с использованием глутатионовой смолы, и они содержали приблизительно 75% GST и 25% полноразмерных белков GST-Nogo или GST-Rtn. Большая часть белка GST-Nogo не подлежала экстракции при неденатурирующих условиях, но экстракт с 8М мочевиной, диализованный против PBS, содержал свыше 98% чистого GST-Nogo.

Иммунореактивность Мус выявляли с продуктом очевидного размера в области 225 кДа в восстановительных условиях (данные не показаны). Таким образом, кДНК направляет экспрессию белка с подходящей электрофоретической подвижностью и аминокислотной последовательностью, относящейся к Nogo, который был назван человеческим Nogo-A (hNogo-A).

Консервативный С-конец белков семейства Rtn содержал два гидрофобных домена, разделенных гидрофильным сегментом длиной 66 аминокислотных остатков. Ни одна из этих последовательностей не содержит сигнального пептида. Предсказанная для данных белков топология такова, что N- и С-конец должны находиться в цитозоле, а консервативный регион должен быть ассоциирован с липидным бислоем. Для Rtn1A имеется экспериментальное доказательство, демонстрирующее, что полипептид ведет себя как интегральный мембранный белок и что гидрофобные сегменты консервативного домена ответственны за это проявление (Van de Velde et al., (1994) *J. Cell. Sci.* 107, 2403-2416). Меченный Мус Nogo также ассоциирован с конкретными фракциями и экстрагируется детергентом, но не посредством высокой ионной силы (данные не показаны).

При повышенной экспрессии в клетках почки белок Rtn1 первоначально локализуется в эндоплазматическом ретикулуме (ER) в мелкогранулированном виде, отсюда термин Reticulon (Van de Velde et al., (1994) *J. Cell. Sci.* 107, 2403-2416). На С-конце Nogo и большинства белков Rtn имеется дилизинный мотив задержки в ER (Van de Velde et al., (1994) *J. Cell. Sci.* 107, 2403-2416; Jackson et al., (1991) *EMBO J.* 9, 3153-3162). В нейронах Rtn1 экспрессируется на протяжении отростков и сконцентрирован в конусах

роста (Senden et al., (1996) *Eur. J. Cell. Biol.* 69, 197-213). Исследование его локализации в трансфицированных клетках почки привело к тому предположению, что Rtn1 может регулировать сортировку белков или другие аспекты функции ER (Van de Velde et al., (1994) *J. Cell. Sci.* 107, 2403-2416). Формы сплайсинга Nogo A и C характеризуются распределением в ретикулуме при экспрессии в клетках COS-7, сходным с таковым Rtn1C.

Пример 2. Поликлональные антитела против Nogo.

Предсказанная внутримембранная топология двух гидрофобных доменов Nogo указывает, что 66 аминокислотных остатков между данными сегментами локализованы на люменальной/внутриклеточной поверхности мембраны. Для дальнейшего выяснения этого получали антисыворотки, направленные против 66-аминокислотного домена.

Для продукции антител и иммуногистологии получали иммуноблоты и иммуногистологию против Мус с антителом 9E10, как описано Takahashi et al., (1998) *Nature Neurosci.* 1, 487-493 & Takahashi et al., (1999) *Cell*, 99, 59-69. Белок слияния GST-Nogo использовали в качестве иммуногена для получения кроличьей антисыворотки против Nogo. Антитело аффинно очищали и использовали в концентрации 3 мкг/мл для иммуногистологии и 1 мкг/мл для иммуноблотов. Для оценки специфичности антисыворотки проводили окрашивание в присутствии белка GST-Nogo в концентрации 0,1 мг/мл. Для окрашивания живых клеток клетки инкубировали в разведениях первичного антитела при 4°C в течение 1 ч в сбалансированном солевом растворе Хэнкса (Hanks) с 0,05% BSA и 20 mM Na-Hepes (pH 7,3). После фиксации связанное антитело выявляли путем инкубации с флуоресцентно меченными вторичными антителами.

Посредством антитела выявлен низкий уровень поверхностной экспрессии данного эпитопа, тогда как эпитоп Мус на С-конце экспрессированного Nogo не выявляли до тех пор, пока клетки не делали проницаемыми. Поверхностное окрашивание указывало на то, что с поверхностью ассоциирована меньшая часть белка Nogo по сравнению с мембраной ER. Эти данные служат подтверждением топографической модели, на которой N- и С-концы белка находятся в цитоплазме и 66 аминокислот белка выступают на люменально-внутриклеточную сторону ER или плазматической мембраны.

Пример 3. Экспрессия Nogo в центральной нервной системе.

Если Nogo вносит основной вклад в ингибиторные характеристики разрастания аксонов (Caroni & Schwab, (1988) *J. Cell Biol.* 106, 1281-1288; Spillmann et al., (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 19283-19293; Bregman et al., (1995) *Nature* 378, 498-501), то Nogo должен экспрессироваться в миелине ЦНС взрослых, но не в миелине ПНС. Анализ экспрессии Nogo посредством нозерн-блота проводили с использованием зондов, происходящих из 5'-концевого Nogo-A/B-специфического региона и из 3'-концевого общего региона кДНК Nogo. Единственная полоса размером около 4,1 тыс. нуклеотидов была выявлена с 5'-концевым зондом в образцах общей РНК зрительного нерва взрослой крысы, но не в образцах из седалищного нерва. Результаты указывают на то, что клон Nogo-A представляет полноразмерную кДНК, и согласуются с ролью Nogo как специфического для миелина ЦНС ингибитора разрастания аксонов. При помощи анализа нозерн-блота с 3'-концевым зондом выявлено, что зрительный нерв экспрессирует большие количества мРНК Nogo-A и значительно меньшие количества Nogo-B и Nogo-C. Целый головной мозг экспрессирует как Nogo-A, так и Nogo-C, но некоторое количество периферических тканей (включая седалищный нерв) экспрессируют малое количество или не экспрессируют Nogo. Продemonстрировано, что экспрессия Nogo-C/Rtn4C происходит в скелетной мышце и адипоцитах, так же, как в головном мозге (Morris et al., (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1450, 68-76). Из семейства Rtn в зрительном нерве происходит селективная экспрессия Nogo в отсутствие выявляемой экспрессии Rtn1 или Rtn3. Rtn2 не определяли.

Посредством гибридизации *in situ* мРНК Nogo выявлена в клетках с морфологией олигодендроцитов в зрительном нерве и пирамидном пути взрослой крысы. В некоторых популяциях нейронов в головном мозге также выявлена экспрессия Nogo. В отличие от Nogo, Rtn1 или Rtn3 не экспрессируются в зрительном нерве, но мРНК выявляют в некоторых популяциях нейронов. Локализацию белка Nogo анализировали в клеточных культурах спинного мозга, обработанных PDGF и разбавленной сывороткой для индукции дифференцировки олигодендроцитов, с использованием антител против Nogo и специфичных для олигодендроцитов моноклональных антител O4. В живых клетках на поверхности олигодендроцитов были обнаружены как люменально-внутриклеточная 66-аминокислотная петля Nogo, так и антиген O4. Приблизительно половина O4-положительных клеток в данных культурах характеризовались поверхностным окрашиванием на Nogo.

Пример 4. Опосредованный Nogo коллапс конусов роста.

Для всех экспериментов с привлечением клеточных культур использовали следующие способы. Способы с использованием культур выростов и диссоциированных нейронов ганглиев эмбриональных куриных дорзальных корешков E10 и E12 описаны для культур ганглия дорзального корешка E7 (Takahashi et al., (1998) *Nature Neurosci.* 1, 487-493; Takahashi et al., (1999) *Cell* 99, 59-69; Goshima et al., (1995) *Nature* 376, 509-514; Jin & Strittmatter, (1997) *J. Neurosci.* 17, 6256-6263). NGF-дифференцированные клетки PC12 культивировали, как описано (Strittmatter et al., (1994) *J. Neurosci.* 14, 2327-2338). Выросты эмбрионального спинного мозга (E10 крысы или E5 цыпленка) культивировали в течение 7-14 дней в присутствии PDGF-AA для индукции дифференцировки некоторых клеток в зрелые олигодендроциты (Vartanian et al., (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 731-735). Процедура анализа коллапса конусов роста идентична тако-

вой для анализа Sema3A-индуцированного коллапса конусов роста (Takahashi et al., (1998) *Nature Neurosci.* 1, 487-493; Takahashi et al., (1999) *Cell* 99, 59-69; Goshima et al., (1995) *Nature* 376, 509-514; Jin & Strittmatter, (1997) *J. Neurosci.* 17, 6256-6263). Способ анализа общего разрастания нейритов также был описан (Goshima et al., (1995) *Nature* 376, 509-514; Jin & Strittmatter, (1997) *J. Neurosci.* 17, 6256-6263; Strittmatter et al., (1994) *J. Neurosci.* 14, 2327-2338). При анализе разрастания белки и пептиды добавляли через 1 ч после помещения на чашки для минимизации любого действия на общее количество прилипающих клеток. Для тестирования действия связанного с субстратом GST или GST-Nogo белковые растворы высушивали на покрытом поли-L-лизинном стекле, отмывали и затем покрывали ламинином. Для культур E12 идентичность клеток нейронам проверяли путем окрашивания антителами против нейрофиламентов (2H3, Developmental Studies Hybridoma Bank) и следы нейритов отмечали при наблюдении окрашивания родаминфаллоидином F-актина в отростках.

Экспрессия рекомбинантного Nogo в клетках HEK293T позволяет проводить точное тестирование того, оказывает ли данный белок ингибирующее действие на разрастание аксонов. Отмытые мембранные фракции из трансфицированных вектором или hNogo-A-Мус клеток HEK293T добавляли к культурам выростов ганглиев куриных дорзальных корешков E12. Морфологию конусов роста оценивали после 30-минутной инкубации при 37°C путем фиксации и окрашивания родаминфаллоидином.

Контрольные мембраны HEK не оказывали детектируемого действия на морфологию конусов роста. Мембраны, содержащие Nogo-A, индуцировали коллапс большей части конусов роста ганглиев дорзальных корешков. Данный коллапс конусов роста является индикатором ингибирующей активности в отношении разрастания аксонов, и также показано ингибирование Nogo вытягивания аксонов (см. ниже). Форма Nogo-C также проявляет активность в отношении коллапса, и это означает то, что общий C-конец белка, включающий гидрофобные сегменты и 66-аминокислотный люменально-внеклеточный домен, содержит функционально важные остатки. Наличие дополнительной ингибиторной активности N-концевого региона Nogo-A не исключается данными исследованиями. Чувствительность более незрелых культур выростов из куриных эмбрионов E10 или из крысиных эмбрионов E15 (данные не показаны) является существенно меньшей. Регуляция чувствительности по ходу развития согласуется с экспериментами, в которых используют частично очищенный Nogo (Bandtlow et al., (1997) *Eur. J. Neurosci.* 9, 2743-2752).

В приводящем к коллапсу конуса роста белка Nogo-C гидрофильный 66-аминокислотный люменально-внеклеточный домен кажется более вероятным кандидатом на взаимодействие с поверхностью нейронов ганглиев дорзального корешка, чем погруженные в мембрану гидрофобные домены. Для проверки данной гипотезы 66-аминокислотный регион hNogo экспрессировали в *E. coli* и очищали. Большая часть белка слияния GST-Nogo скапливалась в тельцах включения, но может быть выделена путем экстракции мочевиной. Данный ограниченный регион Nogo проявляет сильную ( $EC_{50}=50$  нМ) активность, приводящую к коллапсу конусов роста в нейронах ганглиев дорзального корешка E12 (данные не показаны). Препарат экстрагированного мочевиной белка, вероятно, представляет только малую фракцию последовательности Nogo в активной конформации. Поэтому 10% GST-Nogo, который растворим в *E. coli*, очищали посредством смолы глутатионсефарозы. Данный препарат является даже более сильным, чем экстрагированный мочевиной белок, фактором коллапса, резко изменяя морфологию конуса роста в таких низких концентрациях, как 1 нМ.

Действие в наномолярных концентрациях является стандартом для большинства известных физиологических регуляторов, управляющих аксонами. Разрастание аксонов нейронов ганглиев дорзального корешка и NGF-дифференцированных клеток PC12 также блокируется данным растворимым белком GST-Nogo в нМ концентрациях (данные не показаны). Когда GST-Nogo связан с поверхностями субстрата, разрастание аксонов нейронов ганглиев дорзального корешка или клеток PC12 снижается до недетектируемого уровня. Имеет место селективное действие на разрастание аксонов, но не на выживание клеток, поскольку GST-Nogo не снижает число нейрофиламент-положительных прилипающих клеток ( $137 \pm 24\%$  для обработанных GST культур) и не изменяет значимо число апоптотических ядер, идентифицированных путем окрашивания DAPI ( $4,0 \pm 1,7\%$  в контрольных культурах и  $5,2 \pm 1,1\%$  в образцах, обработанных GST-Nogo).

Оказывается, что олигодендроциты избирательно экспрессируют Nogo из белков Rtn. Для выяснения избирательности роли Nogo в регенерации аксонов рассматривали активность, ингибирующую разрастание аксонов, других белков Rtn. Предсказанные люменально-внеклеточные 66-аминокислотные фрагменты Rtn1, Rtn2 и Rtn3 экспрессировали в виде белков слияния с GST и очищали в нативной форме. В концентрациях, в которых фрагмент Nogo приводит к коллапсу большей части конусов роста ганглиев дорзальных корешков E12, другие белки Rtn не изменяли морфологии конусов роста (данные не показаны). Таким образом, активность, ингибирующая регенерацию аксонов, является в семействе Rtn специфичной для Nogo.

Пример 5. Пептидные агенты рецептора Nogo.

Для дальнейшего определения активного домена Nogo синтезировали пептиды длиной 25 аминокислотных остатков, соответствующие сегменту 6,6-аминокислотной последовательности. Пептид, соответствующий остаткам 31-55 внеклеточного фрагмента Nogo, вызывает коллапс конусов роста (фиг. 2) и проявляет виды активности, ингибирующие разрастание (данные не показаны), в концентрации, равной 4 мкМ.

В то время, как данная последовательность может относиться к центральной части (core) ингибиторного домена, 66-аминокислотный фрагмент явно требуется для полной силы действия. Интересно, что этот регион внутри 66-аминокислотного домена проявляет наименьшее сходство с другими белками Rtn, и это согласуется с тем, что другие члены семейства не активны в качестве ингибиторов регенерации аксонов. Действительно, люменально-внеклеточный пептид из 31-55 аминокислот Rtn1 не проявляет активности, вызывающей коллапс конусов роста (данные не показаны).

Вышеуказанные экспериментальные данные определяют Nogo как олигодендроцитспецифический член семейства Rtn и демонстрируют, что дискретный домен Nogo может ингибировать разрастание аксонов. Другие белки Rtn не обладают данной активностью. Поэтому экспрессия Nogo в олигодендроцитах, но не в Шванновских клетках, способствует отсутствию регенерации аксонов в ЦНС взрослых млекопитающих по сравнению с ПНС взрослых. Относительный вклад Nogo по сравнению с другими компонентами в тормозящую природу белого вещества ЦНС может теперь быть охарактеризован на молекулярном уровне.

В то время, как настоящие экспериментальные данные согласуются с ролью Nogo в блокировании регенерации аксонов в ЦНС взрослых после патологического повреждения, это также может относиться к физиологической роли Nogo в непатологических состояниях. Основываясь на исследованиях локализации, полагают, что другие белки Rtn играют роль в функционировании ER (Van de Velde et al., (1994) J. Cell. Sci. 107, 2403-2416). Большая часть Nogo распределена в ретикулярной системе в клетках COS-7, и лишь меньшая часть представляется доступной на клеточной поверхности.

#### Пример 6. Ингибирование активности Nogo.

Предыдущие примеры показали, что 66-аминокислотный регион вблизи С-конца Nogo ингибирует разрастание аксонов и экспрессируется на клеточной поверхности. Более короткие сегменты данного домена длиной 25 аминокислот или являются инертными в качестве ингибиторов разрастания, или проявляют гораздо меньшую силу действия (GrandPre et al., (2000) Nature 403, 439-444). Область 31-55 из данного 66-аминокислотного сегмента обладает слабой активностью, вызывающей коллапс конусов роста и ингибирующей разрастание аксонов. Для блокирования действия Nogo *in vivo* мог бы очень потребоваться конкурентный антагонист Nogo, который связывается с тем же рецептором, но, в свою очередь, не оказывает биологического эффекта. Различные фрагменты 66-аминокислотной области тестировали в качестве блокаторов опосредованного Nogo ингибирования роста аксонов. Для этой цели применяли два способа анализа. Первый представлял собой анализ коллапса конусов роста, а второй представлял анализ связывания.

При анализе коллапса конусов роста измеряли реакцию на Nogo в присутствии различных пептидов-потенциальных антагонистов. Три из пептидов длиной 25 аминокислот (1-25, 11-35 и 21-45) из 66-аминокислотного региона обладают блокирующей активностью в мкМ концентрациях (фиг. 2). Комбинация всех трех пептидов не изменяла морфологию конусов роста при базовых условиях, но полностью предотвращала коллапс за счет 15 нМ GST-Nogo. Та же смесь пептидов также была способна блокировать коллапс конусов роста, индуцированный низкой дозой миелина ЦНС. Наличие данной блокады поддерживало гипотезу о том, что Nogo представляет первичный ингибиторный компонент миелина ЦНС. Более того, блокада обладала свойствами, ожидаемыми для конкурентного антагонизма, будучи неэффективной при больших дозах миелина ЦНС.

Для разработки антагониста с более высокой специфичностью и силой действия тестировали более длинный фрагмент Nogo. Предпочтительно, чтобы такой пептид сам по себе не обладал ингибирующей разрастание аксонов активностью, при этом конкурентно блокируя действие Nogo. Фрагмент 2-41 Nogo ацетилирован на С-конце, и амидирован на N-конце, и является наиболее мощным блокатором Nogo, определенным к настоящему моменту. Пер2-41 препятствует GST-Nogo-индуцированному коллапсу конусов роста и обладает при анализе связывания кажущейся  $K_i$ , равной 150 нМ (фиг. 3). Фрагмент 2-41 также блокирует способность очищенного белка Nogo-66 и грубого миелина ЦНС ингибировать разрастание нейритов в культивируемых нейронах (фиг. 4).

#### Пример 7. Идентификация рецептора Nogo.

Разработан анализ связывания Nogo, который задействует способ, широко используемый для определения функции управления аксонами семафорина и эфрина (Flanagan & Vanderhaeghen, (1998) Annu. Rev. Neurosci. 21, 309-345; Takahashi et al., (1999) Cell 99, 59-69). Он включает слияние части секретрируемой плацентарной щелочной фосфатазы (AP) с лигандом для получения биологически активного средства, связывающего рецептор, который может детектироваться путем исключительно чувствительного колориметрического анализа. В случае Nogo создали экспрессирующий вектор, кодирующий сигнальный пептид, метку His6 для очистки, AP и 66-аминокислотный активный домен Nogo. Белок слияния может очищаться из кондиционированной среды трансфицированных клеток в миллиграммовых количествах (фиг. 5). Данный белок является биологически активным в качестве средства, приводящего к коллапсу конусов роста с  $EC_{50}$ , равной 1 нМ. AP-Nogo действует лишь ненамного сильнее, чем GST-Nogo, возможно, из-за того, что данный белок синтезируется в эукариотической, а не прокариотической клетке. Первоначальные исследования выявили на аксонах насыщаемые сайты с высокой аффинностью. Связывание блокируется GST-Nogo и антагонистическими пептидами длиной 25 аминокислот, что соответст-



вует конкурентному связыванию с рецепторным сайтом нейрона. Поскольку кажущаяся  $K_d$  (3 нМ) для данных сайтов близка  $EC_{50}$  AP-Nogo в анализе коллапса, сайты, вероятно, представляют собой необходимые физиологически рецепторы Nogo.

Данный анализ задействовали для экспрессионного клонирования рецептора Nogo. Порциями экспрессионной библиотеки кДНК головного мозга взрослой мыши, представляющей собой 250000 независимых клонов, трансфицировали клетки COS-7 ненейронного происхождения. Нетрансфицированные клетки COS-7 не связывали AP-Nogo, но трансфекция двумя порциями из 5000 клонов приводила к появлению небольшого числа клеток с сильным связыванием AP-Nogo. Отдельные клоны кДНК, кодирующие сайт связывания Nogo, выделяли путем *sib*-селекции из каждой из двух позитивных порций. Два независимо выделенных клон были идентичны один другому, кроме расширения длиной 100 п.осн. 5'-концевого нетранслируемого региона в одном из клонов. Трансфекция клеток COS-7 приводила к образованию сайта связывания с аффинностью для AP-Nogo, идентичной таковой, наблюдаемой в нейронах ганглиев спинного корешка E13;  $K_d$  связывания составляет примерно 3 нМ (фиг. 6). Сама по себе AP не связывается с какой-либо детектируемой аффинностью с данными трансфицируемыми клетками, и это означает, что аффинность является следствием наличия 66 аминокислот, происходящих из Nogo. Более того, GST-Nogo вытесняет AP-Nogo из данных сайтов.

Данная кДНК кодирует новый белок длиной 473 аминокислот. О кДНК со значительной гомологией не сообщалось в GenBank. Предсказанный белок содержит сигнальный пептид, за которым следуют восемь регионов богатых лейцином повторов, уникальный домен и предсказанный сайт закоривания GPI (фиг. 7). Идентифицирован человеческий гомолог мышинной кДНК, характеризующийся 89% аминокислотной идентичностью. Существование данной кДНК предсказано на основе структуры мышинной кДНК и анализа последовательности генома человека, хранящейся в GenBank как часть Human Sequencing Project. Экзоны человеческой кДНК распространены на 35 тыс. нуклеотидов, и кДНК ранее не была распознана в геномной последовательности. Структура белка соответствовала белку клеточной поверхности, способной связывать Nogo. По связанной с GPI природе белка предполагается, что может существовать вторая субъединица рецептора, которая пронизывает плазматическую мембрану и опосредует трансдукцию сигнала от Nogo.

Пример 8. Распределение рецептора Nogo в тканях.

Распределение мРНК для данного рецептора Nogo соответствует роли данного белка в регуляции регенерации и пластичности аксонов в ЦНС взрослых. Путем нозерн-анализа в головном мозге выявлена единственная полоса размером 2,3 тыс. оснований, что указывает на то, что выделенный клон рецептора Nogo является полноразмерным (фиг. 8). Малые количества данной мРНК наблюдаются в сердце и почке, но не в других периферийных тканях. В головном мозге экспрессия является широко распространенной, и области, наиболее богатые серым веществом, экспрессируют наибольшие количества мРНК.

Пример 9. Биологические эффекты разных доменов Nogo.

Способы анализа функции Nogo-A включали коллапс конусов роста, разрастание нейритов и распластывание фибробластов со связанными с субстратом и растворимыми препаратами белка (Caroni & Schwab, (1988) J. Cell Biol. 106, 1281-1288; GrandPre et al., (2000) Nature 403, 439-444; Chen et al., (2000) Nature 403, 434-439; Prinjha et al., (2000) Nature 403, 483-484). При анализе морфологии фибробласт 3T3, связанный с субстратом Nogo-66, не ингибировал распластывание (фиг. 1b, e). Поскольку препараты NI250 и полноразмерный Nogo-A являются тормозящими факторами в отношении распластывания 3T3, необходимо рассмотреть, могут ли разные домены Nogo способствовать этому при активности *in vitro*. Для облегчения сравнения различных доменов Nogo-A кислый N-концевой фрагмент длиной 1040 аминокислот (Amino-Nogo) экспрессировали в виде меченного Мус-his белка в клетках HEK293T (фиг. 1d). Белок Nogo присутствует в цитозольных фракциях. Поверхности, покрытые очищенным белком Amino-Nogo, не поддерживали распластывание фибробласта 3T3 (фиг. 1b, e). Сходные результаты наблюдали на происходящей из почки клеточной линии COS-7 (фиг. 1f). Поэтому оказывается, что N-концевой домен имеет значение для действия полноразмерного Nogo-A на фибробласты. Домен Nogo-66 является специфичным для нейронов; он не влияет на клетки ненейронного происхождения.

Культуры ганглиев дорзальных корешков также подвергали воздействию белка Amino-Nogo (фиг. 1c, g-i). Как и 3T3, фибробластоподобные клетки в культурах ганглиев дорзальных корешков не распластываются по данному субстрату. Более того, разрастание аксонов на покрытых Amino-Nogo поверхностях снижается до низкого уровня. Таким образом, в то время, как действие Nogo-66 является специфичным в отношении нейронов, ингибиторное действие домена Amino-Nogo является более генерализованным. При наличии в растворимой форме в концентрации 100 нМ полипептид Nogo-66 приводит к коллапсу конусов роста куриных ганглиев дорзальных корешков E12 и почти отменяет вытяжение аксонов, как описано ранее (GrandPre et al., (2000) Nature 403, 439-444). По заметному контрасту с этим растворимый белок Amino-Nogo оказывается неактивным и значимо не модулирует морфологию конусов роста ганглиев дорзальных корешков, или вытяжение аксонов ганглиев дорзальных корешков, или распластывание ненейронных клеток (фиг. 1c, g-i).

В экспериментах Walsh и коллег (Prinjha et al., (2000) Nature 403, 483-484) исследованы гранулярные нейроны мозжечка, и растворимый Amino-Nogo присутствовал в виде белка слияния Fc, возможно, в

димерной форме. Поэтому необходимо уяснить, может ли данными различиями объясняться неактивность растворимого Amino-Nogo. Гранулярные нейроны мозжечка мыши P4 реагируют на препараты Nogo в манере, неотличимой от реакции нейронов куриных ганглиев дорзальных корешков E13 (фиг. 1i). Amino-Nogo, димеризованный с антителом против Мус, ингибирует распластывание 3Т3 и COS-7 (фиг. 1e, f) и имеет тенденцию к снижению разрастания аксонов мозжечка (фиг. 1i). При дальнейшей агрегации путем добавления антитела против мышинных IgG Amino-Nogo значительно снижает разрастание аксонов ганглиев дорзальных корешков и мозжечка (фиг. 1h, i). Хотя белок Amino-Nogo является довольно кислым, электростатический заряд сам по себе не имеет значения для его ингибиторного действия, поскольку поли-Asp не изменяет распластывание клеток или разрастание аксонов (фиг. 1e, f, h). Таким образом, домен Nogo-66 является сильным и специфичным для нейронов ингибитором, тогда как внутриклеточный домен Amino-Nogo ингибирует многие клеточные типы и оказывается функциональным только в агрегированном состоянии.

#### Пример 10. Локализация рецептора Nogo.

Для дальнейшей характеристики экспрессии белка-рецептора Nogo-66 получали антисыворотку к белку слияния GST-рецептор Nogo. Данной антисывороткой селективно выявляется 85 кДа белок в экспрессирующих рецептор Nogo-66 клетках НЕК293Т (фиг. 9a) и специфично окрашиваются клетки COS-7, экспрессирующие рецептор Nogo-66 (фиг. 9b). Иммуногистологическое окрашивание культур спинного мозга куриного эмбриона локализует белок в аксонах, что согласуется с опосредованием ингибирования разрастания аксонов, индуцированного Nogo-66. Экспрессия рецептора Nogo-66 не обнаружена в О4-положительных олигодендроцитах, которые экспрессируют Nogo-66. Иммунореактивный 85 кДа белок экспрессируется в препаратах нейронов из куриных ганглиев дорзальных корешков E13, отвечающих на Nogo-66, но в гораздо меньшей степени в слабо отвечающей ткани куриных ганглиев дорзальных корешков E7 и куриной сетчатке E7 (фиг. 9a).

В общем, характер экспрессии рецептора Nogo-66 соответствует белку, опосредующему ингибирование аксонов за счет Nogo-66.

Данное антитело также является эффективным при локализации белка-рецептора Nogo-66 в секциях тканей (фиг. 9c). В то время, как из гибридизации *in situ* ясно, что белок экспрессируется во многих классах нейронов, путем иммуногистологии белок выявляется в больших количествах в белом веществе ЦНС, в профилях, соответствующих аксонам. В небольших количествах белок выявляется в телах нейронов и нейропиле. Эти данные предоставляют дальнейшее подтверждение предполагаемого функционирования данного белка при опосредовании взаимодействий с олигодендроцитами.

#### Пример 11. Рецептор Nogo опосредует ответы на Nogo-66.

Белок-рецептор Nogo-66 необходим для действия Nogo-66 и не является просто участком связывания с функцией, не относящейся к ингибированию разрастания аксонов. Первым предсказанием этого является то, что обработка фосфоинозитолспецифичной фосфолипазой C (PI-PLC) для удаления с поверхности нейронов, связанных с гликофосфатидилинозитолом (GPI) белков, делает нейроны нечувствительными к Nogo. Данное предсказание остается в силе по отношению к нейронам куриных ганглиев дорзальных корешков E13; обработка PI-PLC отменяет как связывание AP-Nogo, так и индуцированный GST-Nogo-66 коллапс конусов роста (фиг. 10a-c). В качестве контроля в параллельных культурах обработка PI-PLC не изменяла ответ на Sema3A. Конечно, ожидается, что обработка PI-PLC удаляет некоторое количество белков с поверхности аксонов, так что данный результат оставляет возможность того, что другие связанные с GPI белки опосредуют ответ на Nogo-66 в необработанных культурах.

Для демонстрации того, что рецептор Nogo-66 способен опосредовать ингибирование разрастания аксонов за счет Nogo-66, белок экспрессировали в нейронах, лишенных реакции на Nogo-66. Испытывали нейроны ганглиев дорзального корешка и сетчатки из куриных эмбрионов E7. Реакции на Nogo в нейронах ганглиев дорзального корешка с данной стадии развития являются слабыми, но в некоторых культурах можно выявить незначительный ответ (данные не показаны). Конусы роста клеток ганглиев сетчатки E7 одинаково нечувствительны к индуцированному Nogo-66 коллапсу конусов роста (фиг. 10e), не связывают AP-Nogo (данные не показаны), и в них не проявляется 85 кДа белок, иммунореактивный с антителами против рецептора Nogo-66 (фиг. 9a). Экспрессия в данных нейронах NgR путем инфекции рекомбинантными препаратами HSV приводит к появлению у конусов роста клеток ганглиев сетчатки чувствительности к индуцированному Nogo-66 коллапсу. Инфекция контрольным препаратом HSV, экспрессирующим плексин A1, не изменяет реакции на Nogo. Совместно эти данные означают, что идентифицированный здесь рецептор Nogo участвует в опосредованном Nogo-66 ингибировании реакции аксонов.

#### Пример 12. Структурный анализ рецептора Nogo-66.

Структуру рецептора Nogo-66 оценивали путем определения, какой регион опосредует связывание Nogo-66. Данный белок легко разделяется на регион повторов, богатых лейцином, и не содержащий их регион. Анализ делеций ясно показывает, что богатые лейцином повторы требуются для связывания Nogo-66, но оставшаяся часть белка не является необходимой для этого (фиг. 11). В домене богатых лейцином повторов отдельно подвергали делеции два домена. Предсказано, что должна поддерживаться вся структура домена богатых лейцином повторов, и сходный подход применяли для рецептора лейтропина. Очевидно, что связывание Nogo-66 требует наличия всех восьми богатых лейцином повторов, и предпо-

лагается, что значительный сегмент плоской поверхности формируется линейными бета-листами богатых лейцином повторов. Находящиеся с N- и C-конца от богатых лейцином повторов консервативные богатые цистеином регионы с каждого конца от богатых лейцином повторов также требуются для связывания Nogo-66, по-видимому, они необходимы для формирования подходящей конформации богатого лейцином повтора.

Пример 13. Блокада Nogo растворимым белком-эктодоменом рецептора Nogo.

Одним из способов блокирования каскада трансдукции сигнала, инициируемого связыванием Nogo-66 с рецептором Nogo, является получение избытка растворимого эктодомена рецептора. Секретируемый фрагмент белка-рецептора Nogo продуцировали в клетках HEK293T. кДНК, кодирующую аминокислотные остатки 1-348 мышинового рецептора Nogo, лигировали в эукариотический экспрессионный вектор и данной ДНК трансфицировали клетки HEK293T. Кондиционированная среда от данных клеток содержит высокие концентрации данного фрагмента рецептора Nogo (NgR-экто), что продемонстрировано путем иммуноблотов с антителом против NgR. Кондиционированная среда содержит примерно 1 мг/л белка NgR-экто. При анализе связывания AP-Nogo добавление кондиционированной среды с NgR-экто к клеткам COS-7, экспрессирующим полноразмерный рецептор Nogo, или к нейронам ганглиев дорзального корешка снижает связывание 0,5 нМ AP-Nogo-66 на 80%. Формирование комплексов между растворимым NgR-экто и Nogo-66 предотвращает связывание с рецепторами клеточной поверхности.

В некоторых рецепторных системах такие растворимые комплексы «лиганд-рецептор» могут блокировать сигнал путем образования неэффективных взаимодействий. Например, растворимый эктодомен Trk служит для блокирования сигнала нейротрофина и широко используется с данной целью (Shelton et al., (1995) *J. Neurosci.* 15, 477-491). Альтернативно, растворимый комплекс Nogo-66/NgR-экто может связываться и стимулировать предполагаемую вторую трансмембранную субъединицу рецептора Nogo. Имеется предшествующий пример данного типа действия из исследований рецепторов семейства GDNF (Casalano et al., (1998) *Neuron* 21, 53-62). Комплекс Nogo-66/NgR-экто не вызывает коллапс конусов роста в тех нейронах (куриные клетки ганглиев сетчатки E7), которые не имеют рецептора Nogo-66, но содержат другие компоненты сигнального пути Nogo. Это означает, что NgR-экто функционирует как блокатор сигнала Nogo-66.

В прямых тестах белок NgR-экто защищает аксоны от ингибиторных эффектов Nogo-66. NgR-экто предотвращает индуцированный Nogo-66 коллапс конусов роста и блокирует индуцированное Nogo-66 ингибирование разрастания нейритов в куриных нейронах DRG E13 (фиг. 12). Более того, наличие белка NgR-экто блокирует способность миелина ЦНС ингибировать разрастание аксонов *in vitro* (фиг. 12). Эти данные демонстрируют, что белок NgR-экто может опосредовать регенерацию аксонов *in vivo*.

Хотя настоящее изобретение описано детально со ссылкой на вышеуказанные примеры, понятно, что могут быть выполнены различные модификации без отклонения от духа изобретения. Соответственно, изобретение ограничено только следующими пунктами. Все цитированные патенты и публикации, на которые ссылается данная заявка, включены сюда в качестве ссылки во всей их целостности. Результаты части описанных здесь экспериментов были опубликованы (GrandPre et al., (2000) *Nature* 403, 439-444) после даты подачи U.S. Provisional Application 60/175707, с которой данная заявка предъявляет право на приоритет, причем данная публикация включена сюда в качестве ссылки во всей целостности.

## Список последовательностей

&lt;110&gt; Strittmatter, Stephen M.

&lt;120&gt; Опосредованная рецептором NOGO блокада роста аксонов

&lt;130&gt; 44574-5073-WO

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; US 60/175,707

&lt;151&gt; 2000-01-12

&lt;150&gt; US 60/207,366

&lt;151&gt; 2000-05-26

&lt;150&gt; US 60/236,378

&lt;151&gt; 2000-09-29

&lt;160&gt; 20

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1719

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (166) .. (1584)

&lt;223&gt; Предсказанный ген человеческого рецептора Nogo

&lt;400&gt; 1

```

agcccagcca gagccggggcg gagcggagcg cgccgagcct cgtcccgcgg ccggggccggg 60
gccggggccgt agcggcgggcg cctggatgcg gacccgggccg cggggagacg ggcgcccgcc 120
ccgaaacgac tttcagtccc cgacgcgccc cgcccaaccc ctacg atg aag agg gcg 177
                                         Met Lys Arg Ala
                                         1

tcc gct gga ggg agc cgg ctg ctg gca tgg gtg ctg tgg ctg cag gcc 225
Ser Ala Gly Gly Ser Arg Leu Leu Ala Trp Val Leu Trp Leu Gln Ala
   5              10              15              20

tgg cag gtg gca gcc cca tgc cca ggt gcc tgc gta tgc tac aat gag 273
Trp Gln Val Ala Ala Pro Cys Pro Gly Ala Cys Val Cys Tyr Asn Glu
              25              30              35

ccc aag gtg acg aca agc tgc ccc cag cag ggc ctg cag gct gtg ccc 321
Pro Lys Val Thr Thr Ser Cys Pro Gln Gln Gly Leu Gln Ala Val Pro
              40              45              50

gtg ggc atc cct gct gcc agc cag cgc atc ttc ctg cac ggc aac cgc 369

```

|   |      |
|---|------|
| Val Gly Ile Pro Ala Ala Ser Gln Arg Ile Phe Leu His Gly Asn Arg |      |
| 55 60 65  |      |
| atc tcg cat gtg cca gct gcc agc ttc cgt gcc tgc cgc aac ctc acc | 417  |
| Ile Ser His Val Pro Ala Ala Ser Phe Arg Ala Cys Arg Asn Leu Thr |      |
| 70 75 80  |      |
| atc ctg tgg ctg cac tcg aat gtg ctg gcc cga att gat gcg gct gcc | 465  |
| Ile Leu Trp Leu His Ser Asn Val Leu Ala Arg Ile Asp Ala Ala Ala |      |
| 85 90 95 100  |      |
| ttc act ggc ctg gcc ctc ctg gag cag ctg gac ctc agc gat aat gca | 513  |
| Phe Thr Gly Leu Ala Leu Leu Glu Gln Leu Asp Leu Ser Asp Asn Ala |      |
| 105 110 115   |      |
| cag ctc cgg tct gtg gac cct gcc aca ttc cac ggc ctg ggc cgc cta | 561  |
| Gln Leu Arg Ser Val Asp Pro Ala Thr Phe His Gly Leu Gly Arg Leu |      |
| 120 125 130   |      |
| cac acg ctg cac ctg gac cgc tgc ggc ctg cag gag ctg ggc ccg ggg | 609  |
| His Thr Leu His Leu Asp Arg Cys Gly Leu Gln Glu Leu Gly Pro Gly |      |
| 135 140 145   |      |
| ctg ttc cgc ggc ctg gct gcc ctg cag tac ctc tac ctg cag gac aac | 657  |
| Leu Phe Arg Gly Leu Ala Ala Leu Gln Tyr Leu Tyr Leu Gln Asp Asn |      |
| 150 155 160   |      |
| gcg ctg cag gca ctg cct gat gac acc ttc cgc gac ctg ggc aac ctc | 705  |
| Ala Leu Gln Ala Leu Pro Asp Asp Thr Phe Arg Asp Leu Gly Asn Leu |      |
| 165 170 175 180   |      |
| aca cac ctc ttc ctg cac ggc aac cgc atc tcc agc gtg ccc gag cgc | 753  |
| Thr His Leu Phe Leu His Gly Asn Arg Ile Ser Ser Val Pro Glu Arg |      |
| 185 190 195   |      |
| gcc ttc cgt ggg ctg cac agc ctc gac cgt ctc cta ctg cac cag aac | 801  |
| Ala Phe Arg Gly Leu His Ser Leu Asp Arg Leu Leu Leu His Gln Asn |      |
| 200 205 210   |      |
| cgc gtg gcc cat gtg cac ccg cat gcc ttc cgt gac ctt ggc cgc ctc | 849  |
| Arg Val Ala His Val His Pro His Ala Phe Arg Asp Leu Gly Arg Leu |      |
| 215 220 225   |      |
| atg aca ctc tat ctg ttt gcc aac aat cta tca gcg ctg ccc act gag | 897  |
| Met Thr Leu Tyr Leu Phe Ala Asn Asn Leu Ser Ala Leu Pro Thr Glu |      |
| 230 235 240   |      |
| gcc ctg gcc ccc ctg cgt gcc ctg cag tac ctg agg ctc aac gac aac | 945  |
| Ala Leu Ala Pro Leu Arg Ala Leu Gln Tyr Leu Arg Leu Asn Asp Asn |      |
| 245 250 255 260   |      |
| ccc tgg gtg tgt gac tgc cgg gca cgc cca ctc tgg gcc tgg ctg cag | 993  |
| Pro Trp Val Cys Asp Cys Arg Ala Arg Pro Leu Trp Ala Trp Leu Gln |      |
| 265 270 275   |      |
| aag ttc cgc ggc tcc tcc tcc gag gtg ccc tgc agc ctc ccg caa cgc | 1041 |

|            |             |            |            |            |            |             |            |            |     |     |     |     |     |     |     |      |      |
|------------|-------------|------------|------------|------------|------------|-------------|------------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|
| Lys        | Phe         | Arg        | Gly        | Ser        | Ser        | Ser         | Glu        | Val        | Pro | Cys | Ser | Leu | Pro | Gln | Arg |      |      |
|            |             |            | 280        |            |            |             |            | 285        |     |     |     |     | 290 |     |     |      |      |
| ctg        | gct         | ggc        | cgt        | gac        | ctc        | aaa         | cgc        | cta        | gct | gcc | aat | gac | ctg | cag | ggc | 1089 |      |
| Leu        | Ala         | Gly        | Arg        | Asp        | Leu        | Lys         | Arg        | Leu        | Ala | Ala | Asn | Asp | Leu | Gln | Gly |      |      |
|            |             | 295        |            |            |            |             | 300        |            |     |     |     | 305 |     |     |     |      |      |
| tgc        | gct         | gtg        | gcc        | acc        | ggc        | cct         | tac        | cat        | ccc | atc | tgg | acc | ggc | agg | gcc | 1137 |      |
| Cys        | Ala         | Val        | Ala        | Thr        | Gly        | Pro         | Tyr        | His        | Pro | Ile | Trp | Thr | Gly | Arg | Ala |      |      |
|            |             | 310        |            |            |            |             | 315        |            |     |     | 320 |     |     |     |     |      |      |
| acc        | gat         | gag        | gag        | ccg        | ctg        | ggg         | ctt        | ccc        | aag | tgc | tgc | cag | cca | gat | gcc | 1185 |      |
| Thr        | Asp         | Glu        | Glu        | Pro        | Leu        | Gly         | Leu        | Pro        | Lys | Cys | Cys | Gln | Pro | Asp | Ala |      |      |
|            |             | 325        |            |            |            | 330         |            |            |     | 335 |     |     |     |     | 340 |      |      |
| gct        | gac         | aag        | gcc        | tca        | gta        | ctg         | gag        | cct        | gga | aga | cca | gct | tgc | gca | ggc | 1233 |      |
| Ala        | Asp         | Lys        | Ala        | Ser        | Val        | Leu         | Glu        | Pro        | Gly | Arg | Pro | Ala | Ser | Ala | Gly |      |      |
|            |             |            |            | 345        |            |             |            |            | 350 |     |     |     |     | 355 |     |      |      |
| aat        | gcg         | ctg        | aag        | gga        | cgc        | gtg         | ccg        | ccc        | ggc | gac | agc | ccg | ccg | ggc | aac | 1281 |      |
| Asn        | Ala         | Leu        | Lys        | Gly        | Arg        | Val         | Pro        | Pro        | Gly | Asp | Ser | Pro | Pro | Gly | Asn |      |      |
|            |             |            | 360        |            |            |             |            | 365        |     |     |     |     |     | 370 |     |      |      |
| ggc        | tct         | ggc        | cca        | cgg        | cac        | atc         | aat        | gac        | tca | ccc | ttt | ggg | act | ctg | cct | 1329 |      |
| Gly        | Ser         | Gly        | Pro        | Arg        | His        | Ile         | Asn        | Asp        | Ser | Pro | Phe | Gly | Thr | Leu | Pro |      |      |
|            |             | 375        |            |            |            |             | 380        |            |     |     |     | 385 |     |     |     |      |      |
| ggc        | tct         | gct        | gag        | ccc        | ccg        | ctc         | act        | gca        | gtg | cgg | ccc | gag | ggc | tcc | gag | 1377 |      |
| Gly        | Ser         | Ala        | Glu        | Pro        | Pro        | Leu         | Thr        | Ala        | Val | Arg | Pro | Glu | Gly | Ser | Glu |      |      |
|            |             | 390        |            |            |            | 395         |            |            |     |     | 400 |     |     |     |     |      |      |
| cca        | cca         | ggg        | ttc        | ccc        | acc        | tgc         | ggc        | cct        | cgc | cgg | agg | cca | ggc | tgt | tca | 1425 |      |
| Pro        | Pro         | Gly        | Phe        | Pro        | Thr        | Ser         | Gly        | Pro        | Arg | Arg | Arg | Pro | Gly | Cys | Ser |      |      |
|            |             | 405        |            |            |            | 410         |            |            |     | 415 |     |     |     | 420 |     |      |      |
| cgc        | aag         | aac        | cgc        | acc        | cgc        | agc         | cac        | tgc        | cgt | ctg | ggc | cag | gca | ggc | agc | 1473 |      |
| Arg        | Lys         | Asn        | Arg        | Thr        | Arg        | Ser         | His        | Cys        | Arg | Leu | Gly | Gln | Ala | Gly | Ser |      |      |
|            |             |            |            | 425        |            |             |            |            | 430 |     |     |     |     | 435 |     |      |      |
| ggg        | ggt         | ggc        | ggg        | act        | ggt        | gac         | tca        | gaa        | ggc | tca | ggt | gcc | cta | ccc | agc | 1521 |      |
| Gly        | Gly         | Gly        | Gly        | Thr        | Gly        | Asp         | Ser        | Glu        | Gly | Ser | Gly | Ala | Leu | Pro | Ser |      |      |
|            |             |            | 440        |            |            |             |            | 445        |     |     |     | 450 |     |     |     |      |      |
| ctc        | acc         | tgc        | agc        | ctc        | acc        | ccc         | ctg        | ggc        | ctg | gcg | ctg | gtg | ctg | tgg | aca | 1569 |      |
| Leu        | Thr         | Cys        | Ser        | Leu        | Thr        | Pro         | Leu        | Gly        | Leu | Ala | Leu | Val | Leu | Trp | Thr |      |      |
|            |             | 455        |            |            |            |             | 460        |            |     |     |     | 465 |     |     |     |      |      |
| gtg        | ctt         | ggg        | ccc        | tgc        | tgacccccag | cgacacacaag | agcgtgctca | gcagccaggt |     |     |     |     |     |     |     | 1624 |      |
| Val        | Leu         | Gly        | Pro        | Cys        |            |             |            |            |     |     |     |     |     |     |     |      |      |
|            |             | 470        |            |            |            |             |            |            |     |     |     |     |     |     |     |      |      |
| gtgtgtacat | acgggggtctc | tctccacgcc | gccaagccag | ccgggaggcc | gacccgtggg |             |            |            |     |     |     |     |     |     |     | 1684 |      |
| gcaggccagg | ccaggtcctc  | cctgatggac | gcctg      |            |            |             |            |            |     |     |     |     |     |     |     |      |      |
|            |             |            |            |            |            |             |            |            |     |     |     |     |     |     |     |      | 1719 |

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 473

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

```

Met Lys Arg Ala Ser Ala Gly Gly Ser Arg Leu Leu Ala Trp Val Leu
 1           5           10           15

Trp Leu Gln Ala Trp Gln Val Ala Ala Pro Cys Pro Gly Ala Cys Val
          20           25           30

Cys Tyr Asn Glu Pro Lys Val Thr Thr Ser Cys Pro Gln Gln Gly Leu
          35           40           45

Gln Ala Val Pro Val Gly Ile Pro Ala Ala Ser Gln Arg Ile Phe Leu
          50           55           60

His Gly Asn Arg Ile Ser His Val Pro Ala Ala Ser Phe Arg Ala Cys
          65           70           75           80

Arg Asn Leu Thr Ile Leu Trp Leu His Ser Asn Val Leu Ala Arg Ile
          85           90           95

Asp Ala Ala Ala Phe Thr Gly Leu Ala Leu Leu Glu Gln Leu Asp Leu
          100          105          110

Ser Asp Asn Ala Gln Leu Arg Ser Val Asp Pro Ala Thr Phe His Gly
          115          120          125

Leu Gly Arg Leu His Thr Leu His Leu Asp Arg Cys Gly Leu Gln Glu
          130          135          140

Leu Gly Pro Gly Leu Phe Arg Gly Leu Ala Ala Leu Gln Tyr Leu Tyr
          145          150          155          160

Leu Gln Asp Asn Ala Leu Gln Ala Leu Pro Asp Asp Thr Phe Arg Asp
          165          170          175

Leu Gly Asn Leu Thr His Leu Phe Leu His Gly Asn Arg Ile Ser Ser
          180          185          190

Val Pro Glu Arg Ala Phe Arg Gly Leu His Ser Leu Asp Arg Leu Leu
          195          200          205

Leu His Gln Asn Arg Val Ala His Val His Pro His Ala Phe Arg Asp
          210          215          220

Leu Gly Arg Leu Met Thr Leu Tyr Leu Phe Ala Asn Asn Leu Ser Ala
          225          230          235          240

Leu Pro Thr Glu Ala Leu Ala Pro Leu Arg Ala Leu Gln Tyr Leu Arg
          245          250          255

Leu Asn Asp Asn Pro Trp Val Cys Asp Cys Arg Ala Arg Pro Leu Trp
          260          265          270

```

Ala Trp Leu Gln Lys Phe Arg Gly Ser Ser Ser Glu Val Pro Cys Ser  
 275 280 285

Leu Pro Gln Arg Leu Ala Gly Arg Asp Leu Lys Arg Leu Ala Ala Asn  
 290 295 300

Asp Leu Gln Gly Cys Ala Val Ala Thr Gly Pro Tyr His Pro Ile Trp  
 305 310 315 320

Thr Gly Arg Ala Thr Asp Glu Glu Pro Leu Gly Leu Pro Lys Cys Cys  
 325 330 335

Gln Pro Asp Ala Ala Asp Lys Ala Ser Val Leu Glu Pro Gly Arg Pro  
 340 345 350

Ala Ser Ala Gly Asn Ala Leu Lys Gly Arg Val Pro Pro Gly Asp Ser  
 355 360 365

Pro Pro Gly Asn Gly Ser Gly Pro Arg His Ile Asn Asp Ser Pro Phe  
 370 375 380

Gly Thr Leu Pro Gly Ser Ala Glu Pro Pro Leu Thr Ala Val Arg Pro  
 385 390 395 400

Glu Gly Ser Glu Pro Pro Gly Phe Pro Thr Ser Gly Pro Arg Arg Arg  
 405 410 415

Pro Gly Cys Ser Arg Lys Asn Arg Thr Arg Ser His Cys Arg Leu Gly  
 420 425 430

Gln Ala Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Asp Ser Glu Gly Ser Gly  
 435 440 445

Ala Leu Pro Ser Leu Thr Cys Ser Leu Thr Pro Leu Gly Leu Ala Leu  
 450 455 460

Val Leu Trp Thr Val Leu Gly Pro Cys  
 465 470

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1866

&lt;212&gt; ДНК

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (178) .. (1596)

&lt;223&gt; кДНК мышинного рецептора Nogo

&lt;400&gt; 3

agccgcagcc cgcgagccca gcccgcccg gtagagcgga gcgcgggagc ctcgtcccg 60

ggccggggccg ggaccggggcc ggagcagcgg cgcctggatg cggacccggc cgcgcgcaga 120



|  |     |
|--|-----|
| cgggcgccccg ccccggaagcc gcttccagtg cccgacgcgc cccgctcgac cccgaag | 177 |
| atg aag agg gcg tcc tcc gga gga agc agg ctg ctg gca tgg gtg tta  | 225 |
| Met Lys Arg Ala Ser Ser Gly Gly Ser Arg Leu Leu Ala Trp Val Leu  |     |
| 1 5 10 15  |     |
| tgg cta cag gcc tgg agg gta gca aca cca tgc cct ggt gct tgt gtg  | 273 |
| Trp Leu Gln Ala Trp Arg Val Ala Thr Pro Cys Pro Gly Ala Cys Val  |     |
| 20 25 30   |     |
| tgc tac aat gag ccc aag gta aca aca agc tgc ccc cag cag ggt ctg  | 321 |
| Cys Tyr Asn Glu Pro Lys Val Thr Thr Ser Cys Pro Gln Gln Gly Leu  |     |
| 35 40 45   |     |
| cag gct gtg ccc act ggc atc cca gcc tct agc cag cga atc ttc ctg  | 369 |
| Gln Ala Val Pro Thr Gly Ile Pro Ala Ser Ser Gln Arg Ile Phe Leu  |     |
| 50 55 60   |     |
| cat ggc aac cga atc tct cac gtg cca gct gcg agc ttc cag tca tgc  | 417 |
| His Gly Asn Arg Ile Ser His Val Pro Ala Ala Ser Phe Gln Ser Cys  |     |
| 65 70 75 80  |     |
| cga aat ctc act atc ctg tgg ctg cac tct aat gcg ctg gct cgg atc  | 465 |
| Arg Asn Leu Thr Ile Leu Trp Leu His Ser Asn Ala Leu Ala Arg Ile  |     |
| 85 90 95   |     |
| gat gct gct gcc ttc act ggt ctg acc ctc ctg gag caa cta gat ctt  | 513 |
| Asp Ala Ala Ala Phe Thr Gly Leu Thr Leu Leu Glu Gln Leu Asp Leu  |     |
| 100 105 110  |     |
| agt gat aat gca cag ctt cat gtc gtg gac cct acc acg ttc cac ggc  | 561 |
| Ser Asp Asn Ala Gln Leu His Val Val Asp Pro Thr Thr Phe His Gly  |     |
| 115 120 125  |     |
| ctg ggc cac ctg cac aca ctg cac cta gac cga tgt ggc ctg cgg gag  | 609 |
| Leu Gly His Leu His Thr Leu His Leu Asp Arg Cys Gly Leu Arg Glu  |     |
| 130 135 140  |     |
| ctg ggt ccc ggc cta ttc cgt gga cta gca gct ctg cag tac ctc tac  | 657 |
| Leu Gly Pro Gly Leu Phe Arg Gly Leu Ala Ala Leu Gln Tyr Leu Tyr  |     |
| 145 150 155 160  |     |
| cta caa gac aac aat ctg cag gca ctc cct gac aac acc ttt cga gac  | 705 |
| Leu Gln Asp Asn Asn Leu Gln Ala Leu Pro Asp Asn Thr Phe Arg Asp  |     |
| 165 170 175  |     |
| ctg ggc aac ctc acg cat ctc ttt ctg cat ggc aac cgt atc ccc agt  | 753 |
| Leu Gly Asn Leu Thr His Leu Phe Leu His Gly Asn Arg Ile Pro Ser  |     |
| 180 185 190  |     |
| gtg cct gag cac gct ttc cgt ggc ctg cac agt ctt gac cgc ctc ctc  | 801 |
| Val Pro Glu His Ala Phe Arg Gly Leu His Ser Leu Asp Arg Leu Leu  |     |
| 195 200 205  |     |
| ttg cac cag aac cat gtg gct cgt gtg cac cca cat gcc ttc cgg gac  | 849 |
| Leu His Gln Asn His Val Ala Arg Val His Pro His Ala Phe Arg Asp  |     |

| 210   | 215 | 220 |      |
|---|-----|-----|------|
| ctt ggc cgc ctc atg acc ctc tac ctg ttt gcc aac aac ctc tcc atg<br>Leu Gly Arg Leu Met Thr Leu Tyr Leu Phe Ala Asn Asn Leu Ser Met<br>225 230 235 240 |     |     | 897  |
| ctg cct gca gag gtc cta atg ccc ctg agg tct ctg cag tac ctg cga<br>Leu Pro Ala Glu Val Leu Met Pro Leu Arg Ser Leu Gln Tyr Leu Arg<br>245 250 255     |     |     | 945  |
| ctc aat gac aac ccc tgg gtc tgt gac tgc cgg gca cgt cca ctc tgg<br>Leu Asn Asp Asn Pro Trp Val Cys Asp Cys Arg Ala Arg Pro Leu Trp<br>260 265 270     |     |     | 993  |
| gcc tgg ctg cag aag ttc cga ggt tcc tca tca gag gtg ccc tgc aac<br>Ala Trp Leu Gln Lys Phe Arg Gly Ser Ser Ser Glu Val Pro Cys Asn<br>275 280 285     |     |     | 1041 |
| ctg ccc caa cgc ctg gca gac cgt gat ctt aag cgc ctc gct gcc agt<br>Leu Pro Gln Arg Leu Ala Asp Arg Asp Leu Lys Arg Leu Ala Ala Ser<br>290 295 300     |     |     | 1089 |
| gac cta gag ggc tgt gct gtc gct tca gga ccc ttc cgt ccc atc cag<br>Asp Leu Glu Gly Cys Ala Val Ala Ser Gly Pro Phe Arg Pro Ile Gln<br>305 310 315 320 |     |     | 1137 |
| acc agt cag ctc act gat gag gag ctg ctg agc ctc ccc aag tgc tgc<br>Thr Ser Gln Leu Thr Asp Glu Glu Leu Leu Ser Leu Pro Lys Cys Cys<br>325 330 335     |     |     | 1185 |
| cag cca gat gct gca gac aaa gcc tca gta ctg gaa ccc ggg agg cca<br>Gln Pro Asp Ala Ala Asp Lys Ala Ser Val Leu Glu Pro Gly Arg Pro<br>340 345 350     |     |     | 1233 |
| gct tct gcc gga aac gcc ctc aag gga cgt gtg cct ccc ggt gac act<br>Ala Ser Ala Gly Asn Ala Leu Lys Gly Arg Val Pro Pro Gly Asp Thr<br>355 360 365     |     |     | 1281 |
| cca cca ggc aat ggc tca ggc cct cgg cac atc aat gac tct cca ttt<br>Pro Pro Gly Asn Gly Ser Gly Pro Arg His Ile Asn Asp Ser Pro Phe<br>370 375 380     |     |     | 1329 |
| gga act ttg ccc agc tct gca gag ccc cca ctg act gcc ctg cgg cct<br>Gly Thr Leu Pro Ser Ser Ala Glu Pro Pro Leu Thr Ala Leu Arg Pro<br>385 390 395 400 |     |     | 1377 |
| ggg ggt tcc gag cca cca gga ctt ccc acc act ggt ccc cgc agg agg<br>Gly Gly Ser Glu Pro Pro Gly Leu Pro Thr Thr Gly Pro Arg Arg Arg<br>405 410 415     |     |     | 1425 |
| cca ggt tgt tcc cgg aag aat cgc acc cgc agc cac tgc cgt ctg ggc<br>Pro Gly Cys Ser Arg Lys Asn Arg Thr Arg Ser His Cys Arg Leu Gly<br>420 425 430     |     |     | 1473 |
| cag ggc gga agt ggg gcc agt gga aca ggg gac gca gag ggt tca ggg<br>Gln Ala Gly Ser Gly Ala Ser Gly Thr Gly Asp Ala Glu Gly Ser Gly<br>435 440 445 450 |     |     | 1521 |

| 435  | 440 | 445 |      |
|--|-----|-----|------|
| gct ctg cct gct ctg gcc tgc agc ctt gct cct ctg ggc ctt gca ctg    |     |     | 1569 |
| Ala Leu Pro Ala Leu Ala Cys Ser Leu Ala Pro Leu Gly Leu Ala Leu    |     |     |      |
| 450  | 455 | 460 |      |
| gta ctt tgg aca gtg ctt ggg ccc tgc tgaccagcca ccagccacca          |     |     | 1616 |
| Val Leu Trp Thr Val Leu Gly Pro Cys                                |     |     |      |
| 465  | 470 |     |      |
| ggtgtgtgta catatgggggt ctccctccac gccgccagcc agagccaggg acaggctctg |     |     | 1676 |
| aggggagggc caggccctcc ctgacagatg cctccccacc agcccacccc catctccacc  |     |     | 1736 |
| ccatcatgtt tacaggggttc cgggggtggc ggttggttca caacccaac ttccaccgg   |     |     | 1796 |
| atcgcgcat atagacatat gaaatttatt ttacttgcgt aaaatatcg atgacgtgga    |     |     | 1856 |
| ataaacagct   |     |     | 1866 |
|  |     |     |      |
| <210> 4  |     |     |      |
| <211> 473  |     |     |      |
| <212> Белок  |     |     |      |
| <213> Mus musculus   |     |     |      |
|  |     |     |      |
| <400> 4  |     |     |      |
| Met Lys Arg Ala Ser Ser Gly Gly Ser Arg Leu Leu Ala Trp Val Leu    |     |     |      |
| 1  | 5   | 10  | 15   |
| Trp Leu Gln Ala Trp Arg Val Ala Thr Pro Cys Pro Gly Ala Cys Val    |     |     |      |
| 20   | 25  | 30  |      |
| Cys Tyr Asn Glu Pro Lys Val Thr Thr Ser Cys Pro Gln Gln Gly Leu    |     |     |      |
| 35   | 40  | 45  |      |
| Gln Ala Val Pro Thr Gly Ile Pro Ala Ser Ser Gln Arg Ile Phe Leu    |     |     |      |
| 50   | 55  | 60  |      |
| His Gly Asn Arg Ile Ser His Val Pro Ala Ala Ser Phe Gln Ser Cys    |     |     |      |
| 65   | 70  | 75  | 80   |
| Arg Asn Leu Thr Ile Leu Trp Leu His Ser Asn Ala Leu Ala Arg Ile    |     |     |      |
| 85   | 90  | 95  |      |
| Asp Ala Ala Ala Phe Thr Gly Leu Thr Leu Leu Glu Gln Leu Asp Leu    |     |     |      |
| 100  | 105 | 110 |      |
| Ser Asp Asn Ala Gln Leu His Val Val Asp Pro Thr Thr Phe His Gly    |     |     |      |
| 115  | 120 | 125 |      |
| Leu Gly His Leu His Thr Leu His Leu Asp Arg Cys Gly Leu Arg Glu    |     |     |      |
| 130  | 135 | 140 |      |
| Leu Gly Pro Gly Leu Phe Arg Gly Leu Ala Ala Leu Gln Tyr Leu Tyr    |     |     |      |
| 145  | 150 | 155 | 160  |

Leu Gln Asp Asn Asn Leu Gln Ala Leu Pro Asp Asn Thr Phe Arg Asp  
 165 170 175  
 Leu Gly Asn Leu Thr His Leu Phe Leu His Gly Asn Arg Ile Pro Ser  
 180 185 190  
 Val Pro Glu His Ala Phe Arg Gly Leu His Ser Leu Asp Arg Leu Leu  
 195 200 205  
 Leu His Gln Asn His Val Ala Arg Val His Pro His Ala Phe Arg Asp  
 210 215 220  
 Leu Gly Arg Leu Met Thr Leu Tyr Leu Phe Ala Asn Asn Leu Ser Met  
 225 230 235 240  
 Leu Pro Ala Glu Val Leu Met Pro Leu Arg Ser Leu Gln Tyr Leu Arg  
 245 250 255  
 Leu Asn Asp Asn Pro Trp Val Cys Asp Cys Arg Ala Arg Pro Leu Trp  
 260 265 270  
 Ala Trp Leu Gln Lys Phe Arg Gly Ser Ser Ser Glu Val Pro Cys Asn  
 275 280 285  
 Leu Pro Gln Arg Leu Ala Asp Arg Asp Leu Lys Arg Leu Ala Ala Ser  
 290 295 300  
 Asp Leu Glu Gly Cys Ala Val Ala Ser Gly Pro Phe Arg Pro Ile Gln  
 305 310 315 320  
 Thr Ser Gln Leu Thr Asp Glu Glu Leu Leu Ser Leu Pro Lys Cys Cys  
 325 330 335  
 Gln Pro Asp Ala Ala Asp Lys Ala Ser Val Leu Glu Pro Gly Arg Pro  
 340 345 350  
 Ala Ser Ala Gly Asn Ala Leu Lys Gly Arg Val Pro Pro Gly Asp Thr  
 355 360 365  
 Pro Pro Gly Asn Gly Ser Gly Pro Arg His Ile Asn Asp Ser Pro Phe  
 370 375 380  
 Gly Thr Leu Pro Ser Ser Ala Glu Pro Pro Leu Thr Ala Leu Arg Pro  
 385 390 395 400  
 Gly Gly Ser Glu Pro Pro Gly Leu Pro Thr Thr Gly Pro Arg Arg Arg  
 405 410 415  
 Pro Gly Cys Ser Arg Lys Asn Arg Thr Arg Ser His Cys Arg Leu Gly  
 420 425 430  
 Gln Ala Gly Ser Gly Ala Ser Gly Thr Gly Asp Ala Glu Gly Ser Gly  
 435 440 445  
 Ala Leu Pro Ala Leu Ala Cys Ser Leu Ala Pro Leu Gly Leu Ala Leu  
 450 455 460

Val Leu Trp Thr Val Leu Gly Pro Cys  
465 470

<210> 5

<211> 4053

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (135)..(3710)

<223> Человеческая мРНК белка Nogo (K1AA0886, GenBank  
Accession No. AB020693)

<400> 5

```

caccacagta ggtccctcgg ctcagtcggc ccagccctc tcagtcctcc ccaacccccca 60
caaccgcccc cggtcttgag acgcggcccc ggcgggcgcg gcagcagctg cagcatcatc 120
tccaccctcc agcc atg gaa gac ctg gac cag tct cct ctg gtc tcg tcc 170
      Met Glu Asp Leu Asp Gln Ser Pro Leu Val Ser Ser
      1              5              10

tcg gac agc cca ccc cgg ccg cag ccc gcg ttc aag tac cag ttc gtg 218
Ser Asp Ser Pro Pro Arg Pro Gln Pro Ala Phe Lys Tyr Gln Phe Val
      15              20              25

agg gag ccc gag gac gag gag gaa gaa gag gag gag gaa gag gag gac 266
Arg Glu Pro Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp
      30              35              40

gag gac gaa gac ctg gag gag ctg gag gtg ctg gag agg aag ccc gcc 314
Glu Asp Glu Asp Leu Glu Glu Leu Glu Val Leu Glu Arg Lys Pro Ala
      45              50              55              60

gcc ggg ctg tcc gcg gcc cca gtg ccc acc gcc cct gcc gcc ggc gcg 362
Ala Gly Leu Ser Ala Ala Pro Val Pro Thr Ala Pro Ala Ala Gly Ala
      65              70              75

ccc ctg atg gac ttc gga aat gac ttc gtg ccg ccg gcg ccc cgg gga 410
Pro Leu Met Asp Phe Gly Asn Asp Phe Val Pro Pro Ala Pro Arg Gly
      80              85              90

ccc ctg ccg gcc gct ccc ccc gtc gcc ccg gag cgg cag ccg tct tgg 458
Pro Leu Pro Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Glu Arg Gln Pro Ser Trp
      95              100              105

gac ccg agc ccg gtg tcg tcg acc gtg ccc gcg cca tcc ccg ctg tct 506
Asp Pro Ser Pro Val Ser Ser Thr Val Pro Ala Pro Ser Pro Leu Ser
      110              115              120

gct gcc gca gtc tcg ccc tcc aag ctc cct gag gac gac gag cct ccg 554
Ala Ala Ala Val Ser Pro Ser Lys Leu Pro Glu Asp Asp Glu Pro Pro
      125              130              135              140

```

|   |      |
|---|------|
| gcc cgg cct ccc cct cct ccc ccg gcc agc gtg agc ccc cag gca gag | 602  |
| Ala Arg Pro Pro Pro Pro Pro Pro Ala Ser Val Ser Pro Gln Ala Glu |      |
| 145 150 155   |      |
| ccc gtg tgg acc ccg cca gcc ccg gct ccc gcc gcg ccc ccc tcc acc | 650  |
| Pro Val Trp Thr Pro Pro Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro Pro Ser Thr |      |
| 160 165 170   |      |
| ccg gcc gcg ccc aag cgc agg ggc tcc tcg ggc tca gtg gat gag acc | 698  |
| Pro Ala Ala Pro Lys Arg Arg Gly Ser Ser Gly Ser Val Asp Glu Thr |      |
| 175 180 185   |      |
| ctt ttt gct ctt cct gct gca tct gag cct gtg ata cgc tcc tct gca | 746  |
| Leu Phe Ala Leu Pro Ala Ala Ser Glu Pro Val Ile Arg Ser Ser Ala |      |
| 190 195 200   |      |
| gaa aat atg gac ttg aag gag cag cca ggt aac act att tcg gct ggt | 794  |
| Glu Asn Met Asp Leu Lys Glu Gln Pro Gly Asn Thr Ile Ser Ala Gly |      |
| 205 210 215 220   |      |
| caa gag gat ttc cca tct gtc ctg ctt gaa act gct gct tct ctt cct | 842  |
| Gln Glu Asp Phe Pro Ser Val Leu Leu Glu Thr Ala Ala Ser Leu Pro |      |
| 225 230 235   |      |
| tct ctg tct cct ctc tca gcc gct tct ttc aaa gaa cat gaa tac ctt | 890  |
| Ser Leu Ser Pro Leu Ser Ala Ala Ser Phe Lys Glu His Glu Tyr Leu |      |
| 240 245 250   |      |
| ggt aat ttg tca aca gta tta ccc act gaa gga aca ctt caa gaa aat | 938  |
| Gly Asn Leu Ser Thr Val Leu Pro Thr Glu Gly Thr Leu Gln Glu Asn |      |
| 255 260 265   |      |
| gtc agt gaa gct tct aaa gag gtc tca gag aag gca aaa act cta ctc | 986  |
| Val Ser Glu Ala Ser Lys Glu Val Ser Glu Lys Ala Lys Thr Leu Leu |      |
| 270 275 280   |      |
| ata gat aga gat tta aca gag ttt tca gaa tta gaa tac tca gaa atg | 1034 |
| Ile Asp Arg Asp Leu Thr Glu Phe Ser Glu Leu Glu Tyr Ser Glu Met |      |
| 285 290 295 300   |      |
| gga tca tcg ttc agt gtc tct cca aaa gca gaa tct gcc gta ata gta | 1082 |
| Gly Ser Ser Phe Ser Val Ser Pro Lys Ala Glu Ser Ala Val Ile Val |      |
| 305 310 315   |      |
| gca aat cct agg gaa gaa ata atc gtg aaa aat aaa gat gaa gaa gag | 1130 |
| Ala Asn Pro Arg Glu Glu Ile Ile Val Lys Asn Lys Asp Glu Glu Glu |      |
| 320 325 330   |      |
| aag tta gtt agt aat aac atc ctt cat aat caa caa gag tta cct aca | 1178 |
| Lys Leu Val Ser Asn Asn Ile Leu His Asn Gln Gln Glu Leu Pro Thr |      |
| 335 340 345   |      |
| gct ctt act aaa ttg gtt aaa gag gat gaa gtt gtg tct tca gaa aaa | 1226 |
| Ala Leu Thr Lys Leu Val Lys Glu Asp Glu Val Val Ser Ser Glu Lys |      |
| 350 355 360   |      |

|   |      |
|---|------|
| gca aaa gac agt ttt aat gaa aag aga gtt gca gtg gaa gct cct atg | 1274 |
| Ala Lys Asp Ser Phe Asn Glu Lys Arg Val Ala Val Glu Ala Pro Met |      |
| 365 370 375 380   |      |
| agg gag gaa tat gca gac ttc aaa cca ttt gag cga gta tgg gaa gtg | 1322 |
| Arg Glu Glu Tyr Ala Asp Phe Lys Pro Phe Glu Arg Val Trp Glu Val |      |
| 385 390 395   |      |
| aaa gat agt aag gaa gat agt gat atg ttg gct gct gga ggt aaa atc | 1370 |
| Lys Asp Ser Lys Glu Asp Ser Asp Met Leu Ala Ala Gly Gly Lys Ile |      |
| 400 405 410   |      |
| gag agc aac ttg gaa agt aaa gtg gat aaa aaa tgt ttt gca gat agc | 1418 |
| Glu Ser Asn Leu Glu Ser Lys Val Asp Lys Lys Cys Phe Ala Asp Ser |      |
| 415 420 425   |      |
| ctt gag caa act aat cac gaa aaa gat agt gag agt agt aat gat gat | 1466 |
| Leu Glu Gln Thr Asn His Glu Lys Asp Ser Glu Ser Ser Asn Asp Asp |      |
| 430 435 440   |      |
| act tct ttc ccc agt acg cca gaa ggt ata aag gat cgt tca gga gca | 1514 |
| Thr Ser Phe Pro Ser Thr Pro Glu Gly Ile Lys Asp Arg Ser Gly Ala |      |
| 445 450 455 460   |      |
| tat atc aca tgt gct ccc ttt aac cca gca gca act gag agc att gca | 1562 |
| Tyr Ile Thr Cys Ala Pro Phe Asn Pro Ala Ala Thr Glu Ser Ile Ala |      |
| 465 470 475   |      |
| aca aac att ttt cct ttg tta gga gat cct act tca gaa aat aag acc | 1610 |
| Thr Asn Ile Phe Pro Leu Leu Gly Asp Pro Thr Ser Glu Asn Lys Thr |      |
| 480 485 490   |      |
| gat gaa aaa aaa ata gaa gaa aag aag gcc caa ata gta aca gag aag | 1658 |
| Asp Glu Lys Lys Ile Glu Glu Lys Lys Ala Gln Ile Val Thr Glu Lys |      |
| 495 500 505   |      |
| aat act agc acc aaa aca tca aac cct ttt ctt gta gca gca cag gat | 1706 |
| Asn Thr Ser Thr Lys Thr Ser Asn Pro Phe Leu Val Ala Ala Gln Asp |      |
| 510 515 520   |      |
| tct gag aca gat tat gtc aca aca gat aat tta aca aag gtg act gag | 1754 |
| Ser Glu Thr Asp Tyr Val Thr Thr Asp Asn Leu Thr Lys Val Thr Glu |      |
| 525 530 535 540   |      |
| gaa gtc gtg gca aac atg cct gaa ggc ctg act cca gat tta gta cag | 1802 |
| Glu Val Val Ala Asn Met Pro Glu Gly Leu Thr Pro Asp Leu Val Gln |      |
| 545 550 555   |      |
| gaa gca tgt gaa agt gaa ttg aat gaa gtt act ggt aca aag att gct | 1850 |
| Glu Ala Cys Glu Ser Glu Leu Asn Glu Val Thr Gly Thr Lys Ile Ala |      |
| 560 565 570   |      |
| tat gaa aca aaa atg gac ttg gtt caa aca tca gaa gtt atg caa gag | 1898 |
| Tyr Glu Thr Lys Met Asp Leu Val Gln Thr Ser Glu Val Met Gln Glu |      |
| 575 580 585   |      |



|   |      |
|---|------|
| tca ctc tat cct gca gca cag ctt tgc cca tca ttt gaa gag tca gaa | 1946 |
| Ser Leu Tyr Pro Ala Ala Gln Leu Cys Pro Ser Phe Glu Glu Ser Glu |      |
| 590 595 600   |      |
| gct act cct tca cca gtt ttg cct gac att gtt atg gaa gca cca ttg | 1994 |
| Ala Thr Pro Ser Pro Val Leu Pro Asp Ile Val Met Glu Ala Pro Leu |      |
| 605 610 615 620   |      |
| aat tct gca gtt cct agt gct ggt gct tcc gtg ata cag ccc agc tca | 2042 |
| Asn Ser Ala Val Pro Ser Ala Gly Ala Ser Val Ile Gln Pro Ser Ser |      |
| 625 630 635   |      |
| tca cca tta gaa gct tct tca gtt aat tat gaa agc ata aaa cat gag | 2090 |
| Ser Pro Leu Glu Ala Ser Ser Val Asn Tyr Glu Ser Ile Lys His Glu |      |
| 640 645 650   |      |
| cct gaa aac ccc cca cca tat gaa gag gcc atg agt gta tca cta aaa | 2138 |
| Pro Glu Asn Pro Pro Pro Tyr Glu Glu Ala Met Ser Val Ser Leu Lys |      |
| 655 660 665   |      |
| aaa gta tca gga ata aag gaa gaa att aaa gag cct gaa aat att aat | 2186 |
| Lys Val Ser Gly Ile Lys Glu Glu Ile Lys Glu Pro Glu Asn Ile Asn |      |
| 670 675 680   |      |
| gca gct ctt caa gaa aca gaa gct cct tat ata tct att gca tgt gat | 2234 |
| Ala Ala Leu Gln Glu Thr Glu Ala Pro Tyr Ile Ser Ile Ala Cys Asp |      |
| 685 690 695 700   |      |
| tta att aaa gaa aca aag ctt tct gct gaa cca gct ccg gat ttc tct | 2282 |
| Leu Ile Lys Glu Thr Lys Leu Ser Ala Glu Pro Ala Pro Asp Phe Ser |      |
| 705 710 715   |      |
| gat tat tca gaa atg gca aaa gtt gaa cag cca gtg cct gat cat tct | 2330 |
| Asp Tyr Ser Glu Met Ala Lys Val Glu Gln Pro Val Pro Asp His Ser |      |
| 720 725 730   |      |
| gag cta gtt gaa gat tcc tca cct gat tct gaa cca gtt gac tta ttt | 2378 |
| Glu Leu Val Glu Asp Ser Ser Pro Asp Ser Glu Pro Val Asp Leu Phe |      |
| 735 740 745   |      |
| agt gat gat tca ata cct gac gtt cca caa aaa caa gat gaa act gtg | 2426 |
| Ser Asp Asp Ser Ile Pro Asp Val Pro Gln Lys Gln Asp Glu Thr Val |      |
| 750 755 760   |      |
| atg ctt gtg aaa gaa agt ctc act gag act tca ttt gag tca atg ata | 2474 |
| Met Leu Val Lys Glu Ser Leu Thr Glu Thr Ser Phe Glu Ser Met Ile |      |
| 765 770 775 780   |      |
| gaa tat gaa aat aag gaa aaa ctc agt gct ttg cca cct gag gga gga | 2522 |
| Glu Tyr Glu Asn Lys Glu Lys Leu Ser Ala Leu Pro Pro Glu Gly Gly |      |
| 785 790 795   |      |
| aag cca tat ttg gaa tct ttt aag ctc agt tta gat aac aca aaa gat | 2570 |
| Lys Pro Tyr Leu Glu Ser Phe Lys Leu Ser Leu Asp Asn Thr Lys Asp |      |
| 800 805 810   |      |



|   |      |
|---|------|
| acc ctg tta cct gat gaa gtt tca aca ttg agc aaa aag gag aaa att | 2618 |
| Thr Leu Leu Pro Asp Glu Val Ser Thr Leu Ser Lys Lys Glu Lys Ile |      |
| 815 820 825   |      |
| cct ttg cag atg gag gag ctc agt act gca gtt tat tca aat gat gac | 2666 |
| Pro Leu Gln Met Glu Glu Leu Ser Thr Ala Val Tyr Ser Asn Asp Asp |      |
| 830 835 840   |      |
| tta ttt att tct aag gaa gca cag ata aga gaa act gaa acg ttt tca | 2714 |
| Leu Phe Ile Ser Lys Glu Ala Gln Ile Arg Glu Thr Glu Thr Phe Ser |      |
| 845 850 855 860   |      |
| gat tca tct cca att gaa att ata gat gag ttc cct aca ttg atc agt | 2762 |
| Asp Ser Ser Pro Ile Glu Ile Ile Asp Glu Phe Pro Thr Leu Ile Ser |      |
| 865 870 875   |      |
| tct aaa act gat tca ttt tct aaa tta gcc agg gaa tat act gac cta | 2810 |
| Ser Lys Thr Asp Ser Phe Ser Lys Leu Ala Arg Glu Tyr Thr Asp Leu |      |
| 880 885 890   |      |
| gaa gta tcc cac aaa agt gaa att gct aat gcc ccg gat gga gct ggg | 2858 |
| Glu Val Ser His Lys Ser Glu Ile Ala Asn Ala Pro Asp Gly Ala Gly |      |
| 895 900 905   |      |
| tca ttg cct tgc aca gaa ttg ccc cat gac ctt tct ttg aag aac ata | 2906 |
| Ser Leu Pro Cys Thr Glu Leu Pro His Asp Leu Ser Leu Lys Asn Ile |      |
| 910 915 920   |      |
| caa ccc aaa gtt gaa gag aaa atc agt ttc tca gat gac ttt tct aaa | 2954 |
| Gln Pro Lys Val Glu Glu Lys Ile Ser Phe Ser Asp Asp Phe Ser Lys |      |
| 925 930 935 940   |      |
| aat ggg tct gct aca tca aag gtg ctc tta ttg cct cca gat gtt tct | 3002 |
| Asn Gly Ser Ala Thr Ser Lys Val Leu Leu Leu Pro Pro Asp Val Ser |      |
| 945 950 955   |      |
| gct ttg gcc act caa gca gag ata gag agc ata gtt aaa ccc aaa gtt | 3050 |
| Ala Leu Ala Thr Gln Ala Glu Ile Glu Ser Ile Val Lys Pro Lys Val |      |
| 960 965 970   |      |
| ctt gtg aaa gaa gct gag aaa aaa ctt cct tcc gat aca gaa aaa gag | 3098 |
| Leu Val Lys Glu Ala Glu Lys Lys Leu Pro Ser Asp Thr Glu Lys Glu |      |
| 975 980 985   |      |
| gac aga tca cca tct gct ata ttt tca gca gag ctg agt aaa act tca | 3146 |
| Asp Arg Ser Pro Ser Ala Ile Phe Ser Ala Glu Leu Ser Lys Thr Ser |      |
| 990 995 1000  |      |
| gtt gtt gac ctc ctg tac tgg aga gac att aag aag act gga gtg gtg | 3194 |
| Val Val Asp Leu Leu Tyr Trp Arg Asp Ile Lys Lys Thr Gly Val Val |      |
| 1005 1010 1015 1020   |      |
| ttt ggt gcc agc cta ttc ctg ctg ctt tca ttg aca gta ttc agc att | 3242 |
| Phe Gly Ala Ser Leu Phe Leu Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe Ser Ile |      |
| 1025 1030 1035  |      |

gtg agc gta aca gcc tac att gcc ttg gcc ctg ctc tct gtg acc atc 3290  
Val Ser Val Thr Ala Tyr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Ser Val Thr Ile  
1040 1045 1050

agc ttt agg ata tac aag ggt gtg atc caa gct atc cag aaa tca gat 3338  
Ser Phe Arg Ile Tyr Lys Gly Val Ile Gln Ala Ile Gln Lys Ser Asp  
1055 1060 1065

gaa ggc cac cca ttc agg gca tat ctg gaa tct gaa gtt gct ata tct 3386  
Glu Gly His Pro Phe Arg Ala Tyr Leu Glu Ser Glu Val Ala Ile Ser  
1070 1075 1080

gag gag ttg gtt cag aag tac agt aat tct gct ctt ggt cat gtg aac 3434  
Glu Glu Leu Val Gln Lys Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Gly His Val Asn  
1085 1090 1095 1100

tgc acg ata aag gaa ctc agg cgc ctc ttc tta gtt gat gat tta gtt 3482  
Cys Thr Ile Lys Glu Leu Arg Arg Leu Phe Leu Val Asp Asp Leu Val  
1105 1110 1115

gat tct ctg aag ttt gca gtg ttg atg tgg gta ttt acc tat gtt ggt 3530  
Asp Ser Leu Lys Phe Ala Val Leu Met Trp Val Phe Thr Tyr Val Gly  
1120 1125 1130

gcc ttg ttt aat ggt ctg aca cta ctg att ttg gct ctc att tca ctc 3578  
Ala Leu Phe Asn Gly Leu Thr Leu Leu Ile Leu Ala Leu Ile Ser Leu  
1135 1140 1145

ttc agt gtt cct gtt att tat gaa cgg cat cag gca cag ata gat cat 3626  
Phe Ser Val Pro Val Ile Tyr Glu Arg His Gln Ala Gln Ile Asp His  
1150 1155 1160

tat cta gga ctt gca aat aag aat gtt aaa gat gct atg gct aaa atc 3674  
Tyr Leu Gly Leu Ala Asn Lys Asn Val Lys Asp Ala Met Ala Lys Ile  
1165 1170 1175 1180

caa gca aaa atc cct gga ttg aag cgc aaa gct gaa tgaaaacgcc 3720  
Gln Ala Lys Ile Pro Gly Leu Lys Arg Lys Ala Glu  
1185 1190

caaaataatt agtaggagtt catctttaaa ggggatattc atttgattat acgggggagg 3780

gtcaggggaag aacgaacctt gacgttgacg tgcagtttca cagatcggtg ttagatcttt 3840

atcttttagcc atgcactggt gtgaggaaaa attacctgtc ttgactgccca tgtgttcac 3900

atcttaagta ttgtaagctg ctatgtatgg atttaaaccg taatcatatc tttttcctat 3960

ctgagggcact ggtggaataa aaaacctgta tattttactt tgttgcagat agtcttgccg 4020

catcttggca agttgcagag atggtggagc tag 4053

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 1192

&lt;212&gt; Белок

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 6

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 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  |     |
| Asp | Glu | 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  |     |
| 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  |     |
| 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 | Ala | Val | 115 | 120 | 125 |     |
| Ser | Pro | Ser | Lys | Leu | Pro | Glu | Asp | Asp | Glu | Pro | Pro | Ala | Arg | Pro | Pro | 130 | 135 | 140 |     |
| 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 |     |
| Lys | Arg | Arg | Gly | Ser | Ser | Gly | Ser | Val | Asp | Glu | Thr | Leu | Phe | Ala | Leu | 180 | 185 | 190 |     |
| 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 |     |
| 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 |     |
| Thr | Val | Leu | Pro | Thr | Glu | Gly | Thr | Leu | Gln | Glu | Asn | Val | Ser | Glu | Ala | 260 | 265 | 270 |     |
| 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  
 Ser Val Ser Pro Lys Ala Glu Ser Ala Val Ile Val Ala Asn Pro Arg  
 305 310 315 320  
 Glu Glu Ile Ile Val Lys Asn Lys Asp Glu 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  
 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  
 Ala Asp Phe Lys Pro Phe Glu Arg Val Trp Glu Val Lys Asp Ser Lys  
 385 390 395 400  
 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  
 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 Ser Gly Ala Tyr Ile Thr Cys  
 450 455 460  
 Ala Pro Phe Asn Pro Ala Ala Thr Glu Ser Ile Ala Thr Asn Ile Phe  
 465 470 475 480  
 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  
 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  
 Asn Met Pro Glu Gly Leu Thr Pro Asp Leu Val Gln Glu Ala Cys Glu  
 545 550 555 560  
 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

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

Pro Ser Ala Gly Ala Ser Val Ile Gln Pro Ser Ser Ser Pro Leu Glu  
 625                                  630                                  635                                  640

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

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

Thr Lys Leu Ser Ala Glu Pro Ala Pro Asp Phe Ser Asp Tyr Ser Glu  
 705                                  710                                  715                                  720

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

Ile Pro Asp Val Pro Gln Lys Gln Asp Glu Thr Val Met Leu Val Lys  
           755                                  760                                  765

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

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

Glu Glu Leu Ser Thr Ala Val Tyr Ser Asn Asp Asp Leu Phe Ile Ser  
           835                                  840                                  845

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

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

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  
                   930                                  935                                  940

Thr Ser Lys Val Leu Leu Leu Pro Pro Asp Val Ser Ala Leu Ala Thr  
 945                                  950                                  955                                  960

Gln Ala Glu Ile Glu Ser Ile Val Lys Pro Lys Val Leu Val Lys Glu  
                                   965                                  970                                  975

Ala Glu Lys Lys Leu Pro Ser Asp Thr Glu Lys Glu Asp Arg Ser Pro  
                                   980                                  985                                  990

Ser Ala Ile Phe Ser Ala Glu Leu Ser Lys Thr Ser Val Val Asp Leu  
                   995                                  1000                                  1005

Leu Tyr Trp Arg Asp Ile Lys Lys Thr Gly Val Val Phe Gly Ala Ser  
 1010                                  1015                                  1020

Leu Phe Leu Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe Ser Ile Val Ser Val Thr  
 1025                                  1030                                  1035                                  1040

Ala Tyr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Ser Val Thr Ile Ser Phe Arg Ile  
                                   1045                                  1050                                  1055

Tyr Lys Gly Val Ile Gln Ala Ile Gln Lys Ser Asp Glu Gly His Pro  
                   1060                                  1065                                  1070

Phe Arg Ala Tyr Leu Glu Ser Glu Val Ala Ile Ser Glu Glu Leu Val  
                   1075                                  1080                                  1085

Gln Lys Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Gly His Val Asn Cys Thr Ile Lys  
 1090                                  1095                                  1100

Glu Leu Arg Arg Leu Phe Leu Val Asp Asp Leu Val Asp Ser Leu Lys  
 1105                                  1110                                  1115                                  1120

Phe Ala Val Leu Met Trp Val Phe Thr Tyr Val Gly Ala Leu Phe Asn  
                                   1125                                  1130                                  1135

Gly Leu Thr Leu Leu Ile Leu Ala Leu Ile Ser Leu Phe Ser Val Pro  
                   1140                                  1145                                  1150

Val Ile Tyr Glu Arg His Gln Ala Gln Ile Asp His Tyr Leu Gly Leu  
                   1155                                  1160                                  1165

Ala Asn Lys Asn Val Lys Asp Ala Met Ala Lys Ile Gln Ala Lys Ile  
                   1170                                  1175                                  1180

Pro Gly Leu Lys Arg Lys Ala Glu  
 1185                                  1190

<210> 7  
 <211> 75  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: кДНК, кодирующая ингибитор связывания рецептора Per1

<400> 7  
 tttaggatat acaagggtgt gatccaagct atccagaaat cagatgaagg ccacccattc 60  
 agggcatatc tggaa 75

<210> 8  
 <211> 40  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Per1 - ингибитор белка Nogo

<400> 8  
 Arg Ile Tyr Lys Gly Val Ile Gln Ala Ile Gln Lys Ser Asp Glu Gly  
 1 5 10 15  
 His Pro Phe Arg Ala Tyr Leu Glu Ser Glu Val Ala Ile Ser Glu Glu  
 20 25 30  
 Leu Val Gln Lys Tyr Ser Asn Ser  
 35 40

<210> 9  
 <211> 75  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: кДНК, кодирующая ингибитор связывания рецептора Per2

<400> 9  
 atccagaaat cagatgaagg ccacccattc agggcatatc tggaaatctga agttgctata 60  
 tctgaggagt tgggt 75

<210> 10  
 <211> 25  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Пер2 - ингибитор белка Nogo

<400> 10

Ile Gln Lys Ser Asp Glu Gly His Pro Phe Arg Ala Tyr Leu Glu Ser  
1 5 10 15

Glu Val Ala Ile Ser Glu Glu Leu Val  
20 25

<210> 11

<211> 75

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: кДНК, кодирующая ингибитор связывания рецептора Пер3

<400> 11

Ala Gly Gly Gly Cys Ala Thr Ala Thr Cys Thr Gly Gly Ala Ala Thr  
1 5 10 15

Cys Thr Gly Ala Ala Gly Thr Thr Gly Cys Thr Ala Thr Ala Thr Cys  
20 25 30

Thr Gly Ala Gly Gly Ala Gly Thr Thr Gly Gly Thr Thr Cys Ala Gly  
35 40 45

Ala Ala Gly Thr Ala Cys Ala Gly Thr Ala Ala Thr Thr Cys Thr Gly  
50 55 60

Cys Thr Cys Thr Thr Gly Gly Thr Cys Ala Thr  
65 70 75

<210> 12

<211> 25

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Пер3 - ингибитор белка Nogo

<400> 12

Arg Ala Tyr Leu Glu Ser Glu Val Ala Ile Ser Glu Glu Leu Val Gln  
1 5 10 15

Lys Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Gly His  
20 25

<210> 13

<211> 75



<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: κДНК, кодирующая ингибитор связывания рецептора Рер4

<400> 13

tctgaggagt tggttcagaa gtacagtaat tctgctcttg gtcatgtgaa ctgcacgata 60  
aaggaactca ggcgc 75

<210> 14

<211> 25

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Рер4 - ингибитор белка Nogo

<400> 14

Ser Glu Glu Leu Val Gln Lys Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Gly His Val  
1 5 10 15

Asn Cys Thr Ile Lys Glu Leu Arg Arg  
20 25

<210> 15

<211> 75

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: κДНК, кодирующая ингибитор связывания рецептора Рер5

<400> 15

gctcttggtc atgtgaactg caccgataaag gaactcaggc gcctcttctt agttgatgat 60  
ttagttgatt ctctg 75

<210> 16

<211> 25

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Рер5 - ингибитор белка Nogo

<400> 16

Ala Leu Gly His Val Asn Cys Thr Ile Lys Glu Leu Arg Arg Leu Phe  
1 5 10 15

Leu Val Asp Asp Leu Val Asp Ser Leu  
                   20                  25

<210> 17  
 <211> 120  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: кДНК, кодирующая ингибитор  
 связывания рецептора Pep2-41

<400> 17  
 aggatataca aggggtgtgat ccaagctatc cagaaatcag atgaaggcca ccatttcagg 60  
 gcatatctgg aatctgaagt tgctatatct gaggagtgg ttcagaagta cagtaattct 120

<210> 18  
 <211> 40  
 <212> Белок  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Pep2-41 - ингибитор белка Nogo

<400> 18  
 Arg Ile Tyr Lys Gly Val Ile Gln Ala Ile Gln Lys Ser Asp Glu Gly  
   1                  5                  10                  15  
 His Pro Phe Arg Ala Tyr Leu Glu Ser Glu Val Ala Ile Ser Glu Glu  
                   20                  25                  30

Leu Val Gln Lys Tyr Ser Asn Ser  
                   35                  40

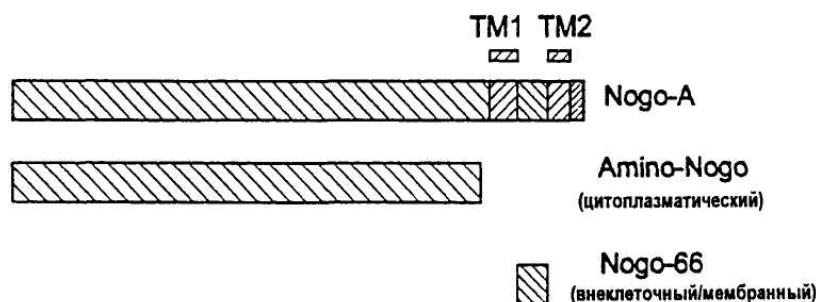
<210> 19  
 <211> 198  
 <212> ДНК  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(198)  
 <223> Полный связывающий рецептор региона гена Nogo

<400> 19  
 ttt agg ata tac aag ggt gtg atc caa gct atc cag aaa tca gat gaa 48  
 Phe Arg Ile Tyr Lys Gly Val Ile Gln Ala Ile Gln Lys Ser Asp Glu  
   1                  5                  10                  15  
 ggc cac cca ttc agg gca tat ctg gaa tct gaa gtt gct ata tct gag 96  
 Gly His Pro Phe Arg Ala Tyr Leu Glu Ser Glu Val Ala Ile Ser Glu  
                   20                  25                  30



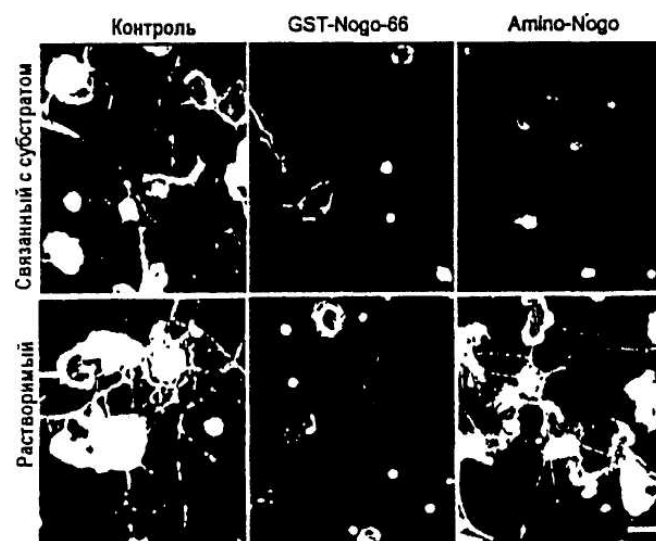
11. Полинуклеотид по п.10, который кодирует полипептид, содержащий по меньшей мере 70 смежных аминокислот из аминокислот 1-348 SEQ ID NO: 2 человека или SEQ ID NO: 4 мыши.
12. Полинуклеотид по пп.9, 10 или 11, который кодирует полипептид, содержащий области LRR NgR, область LRRNT NgR и область LRRCT NgR.
13. Полинуклеотид по любому из пп.1-12, который функционально присоединен к одному или нескольким контролирующим экспрессию элементам.
14. Вектор, содержащий полинуклеотид по любому из пп.1-13.
15. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по любому из пп.1-13 или вектор по п.14.
16. Клетка-хозяин по п.15, которая представляет собой эукариотическую клетку.
17. Полипептид рецептора NOGO, уменьшающий опосредованное рецептором NOGO ингибирование роста аксонов, экспрессируемый клеткой-хозяином по п.15 или 16.
18. Выделенный полипептид рецептора NOGO, уменьшающий опосредованное этим рецептором ингибирование роста аксонов, по меньшей мере на 80% идентичный полипептиду, содержащему аминокислоты 1-348 SEQ ID NO: 2 человека или SEQ ID NO: 4 мыши.
19. Полипептид по п.18, который по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотам 1-348 SEQ ID NO: 2 человека или SEQ ID NO: 4 мыши.
20. Полипептид по п.19, который по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотам 1-348 SEQ ID NO: 2 человека или SEQ ID NO: 4 мыши.
21. Полипептид по п.20, который содержит аминокислоты 1-348 SEQ ID NO: 2 человека и SEQ ID NO: 4 мыши.
22. Выделенный фрагмент полипептида рецептора NOGO (NgR), уменьшающий опосредованное этим рецептором ингибирование роста аксонов, содержащий область LRRNT NgR, области LRR NgR и область LRRCT NgR в пределах аминокислот 1-309 SEQ ID NO: 2 человека или SEQ ID NO: 4 мыши.
23. Фрагмент полипептида по п.22, который относится к NgR человека.
24. Фрагмент полипептида по п.22, который относится к NgR мыши.
25. Выделенный полипептид рецептора NOGO, уменьшающий опосредованное этим рецептором ингибирование роста аксонов, содержащий аминокислоты 1-348 SEQ ID NO: 2 человека или SEQ ID NO: 4 мыши, слитый с гетерологичным полипептидом.
26. Выделенный растворимый фрагмент полипептида рецептора NOGO, уменьшающий опосредованное этим рецептором ингибирование роста аксонов, содержащий по меньшей мере 50 смежных аминокислот из последовательностей 1-348 SEQ ID NO: 2 человека или SEQ ID NO: 4 мыши.
27. Полипептид по п.26, который содержит по меньшей мере 60 смежных аминокислот из аминокислот 1-348 SEQ ID NO: 2 человека или SEQ ID NO: 4 мыши.
28. Полипептид по п.27, который содержит по меньшей мере 70 смежных аминокислот из аминокислот 1-348 SEQ ID NO: 2 человека или SEQ ID NO: 4 мыши.
29. Полипептид по пп.26, 27 или 28, который содержит области LRR NgR, область LRRNT NgR и область LRRCT NgR.
30. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, специфично связывающиеся с полипептидом или полипептидным фрагментом по любому из пп.18-29.
31. Антитело или его фрагмент по п.30, которое представляет собой поликлональное антитело.
32. Антитело или его фрагмент по п.30, которое представляет собой моноклональное антитело.
33. Антитело или его фрагмент по любому из пп.31-32, которое представляет собой гуманизованное антитело.
34. Антитело или его фрагмент по любому из пп.31-32, которое представляет собой человеческое антитело.
35. Фармацевтическая композиция, содержащая в качестве активного начала полинуклеотид по любому из пп.1-13, или клетку-хозяина по любому из пп.15 и 16, или полипептид по любому из пп.17-29, или антитело по любому из пп.30-34 и подходящий носитель.



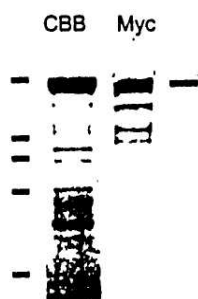
Фиг. 1a



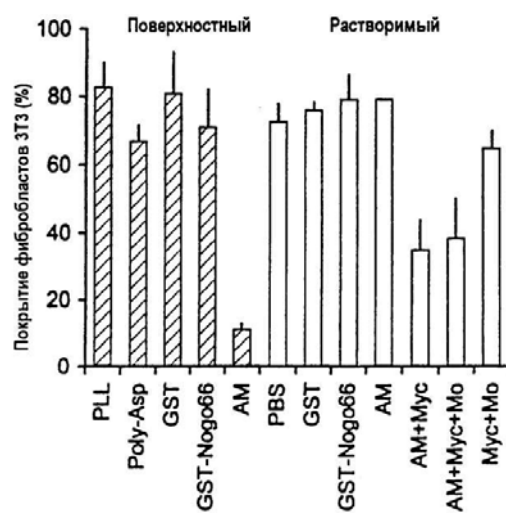
Фиг. 1b



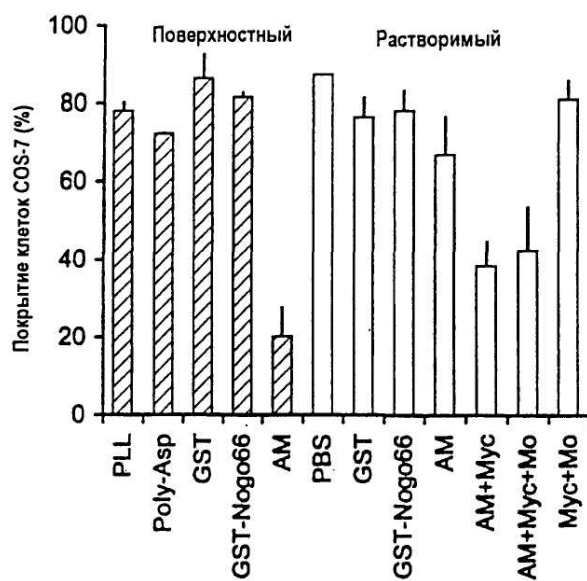
Фиг. 1c



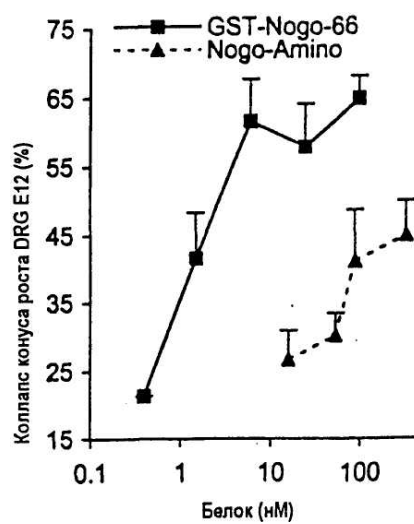
Фиг. 1d



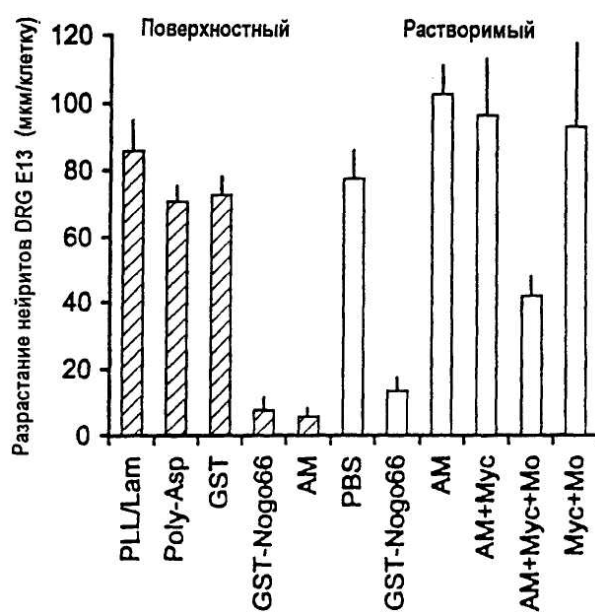
Фиг. 1e



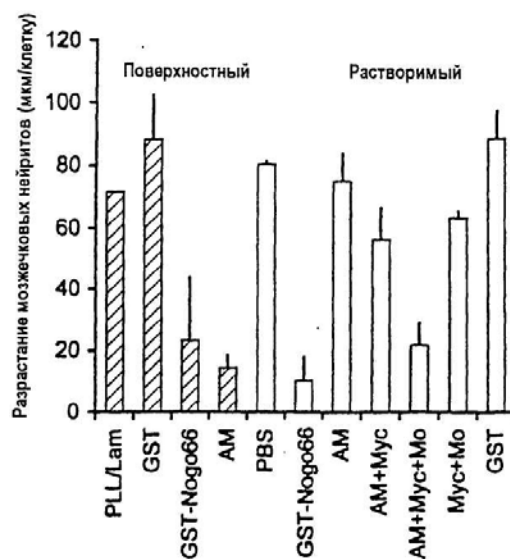
Фиг. 1f



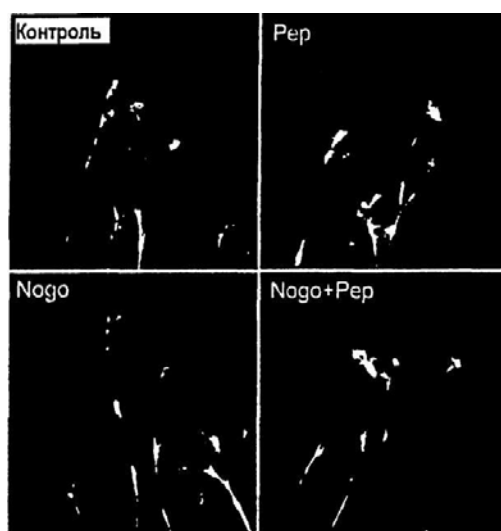
Фиг. 1g



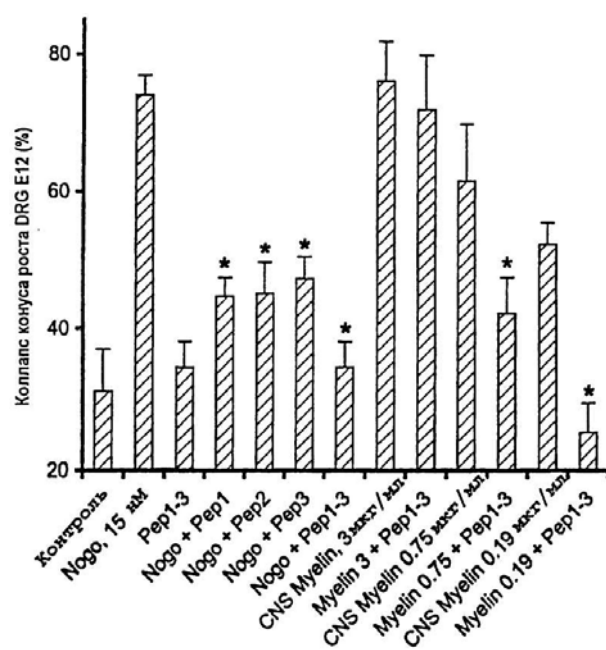
Фиг. 1h



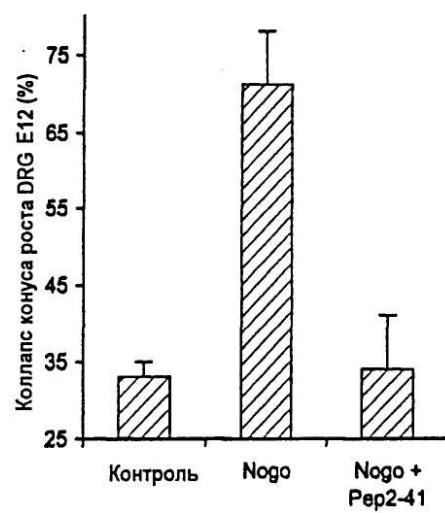
Фиг. 1i



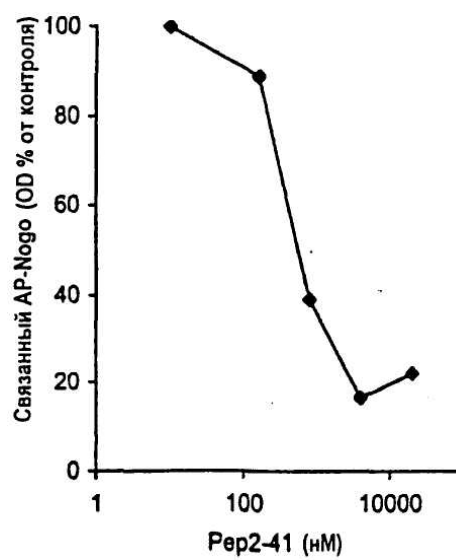
Фиг. 2a



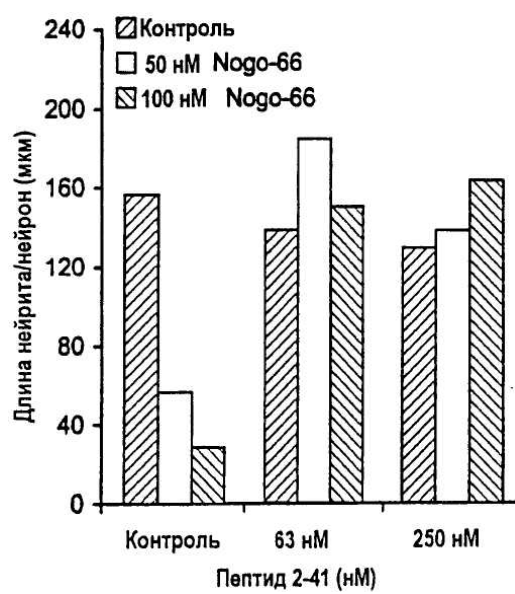
Фиг. 2b



Фиг. 3а

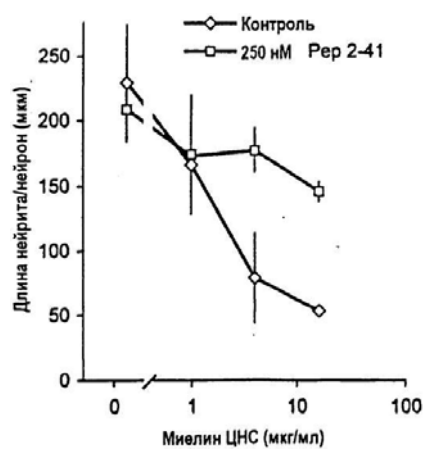


Фиг. 3b

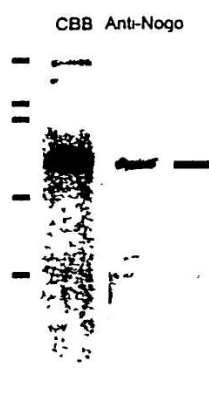


Фиг. 4а

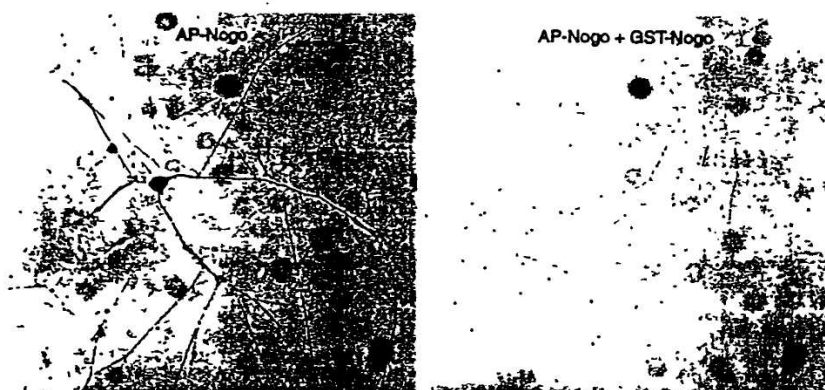




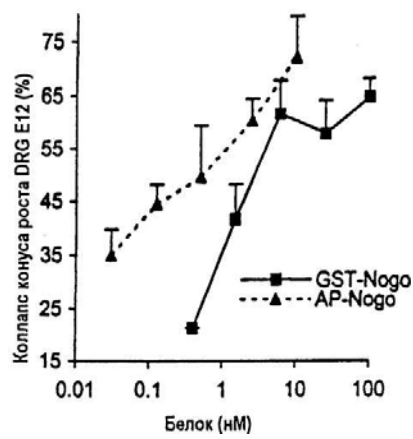
Фиг. 4b



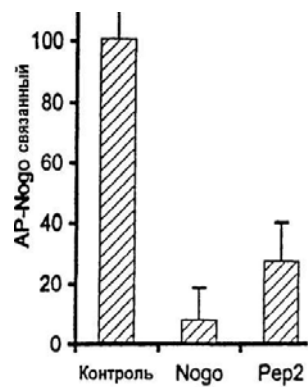
Фиг. 5a



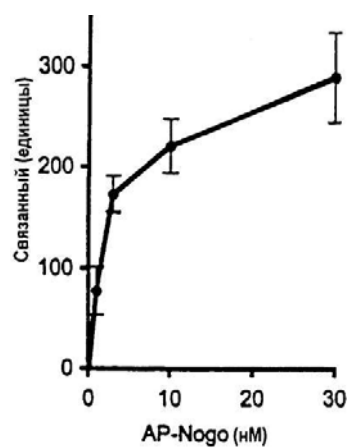
Фиг. 5b



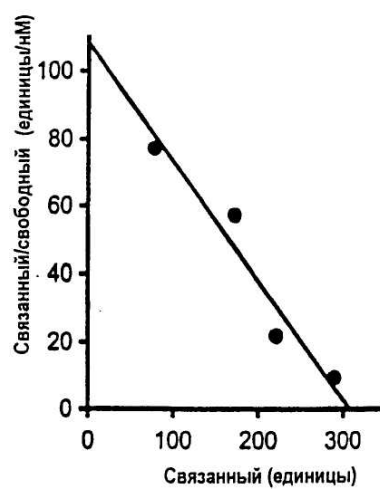
Фиг. 5c



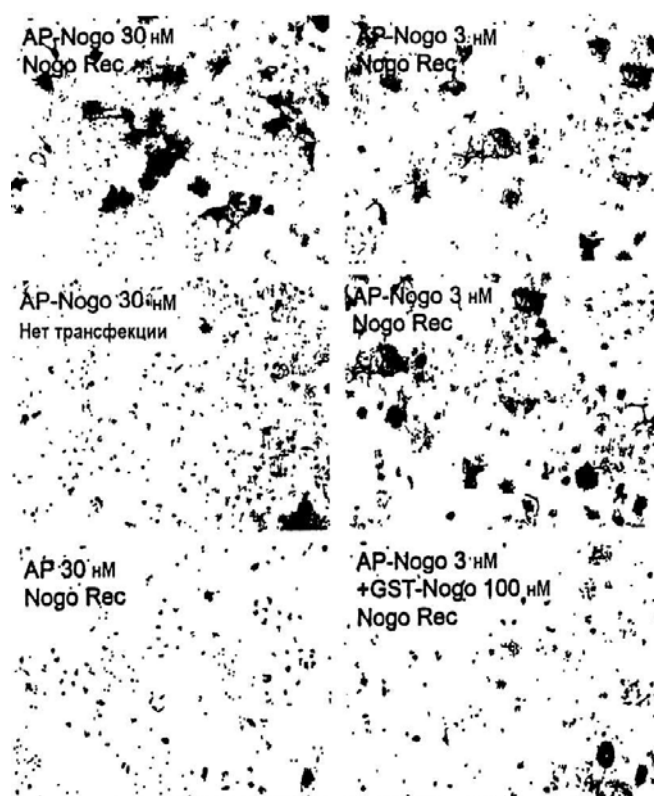
Фиг. 5d



Фиг. 5e



Фиг. 5f



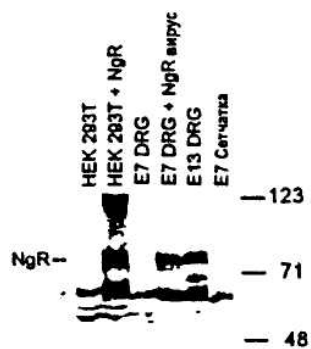
Фиг. 6



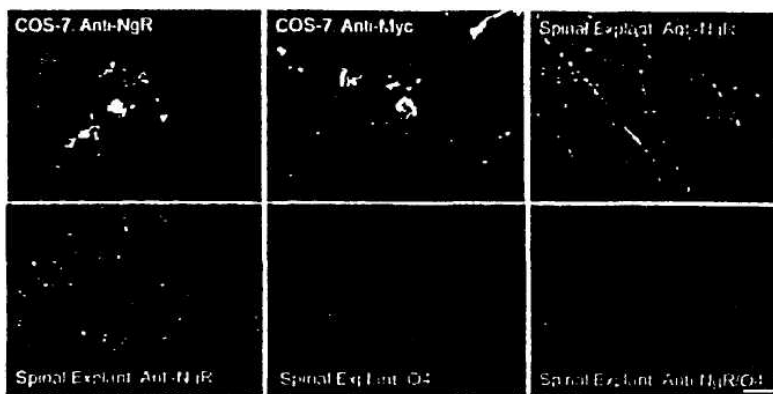
Фиг. 7



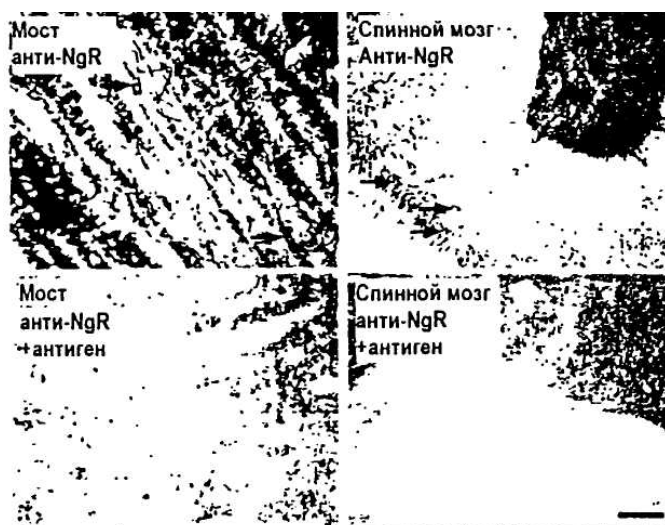
Фиг. 8



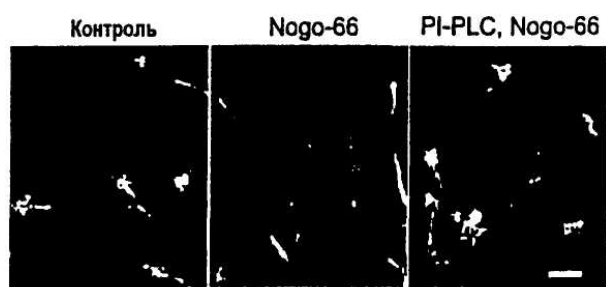
Фиг. 9а



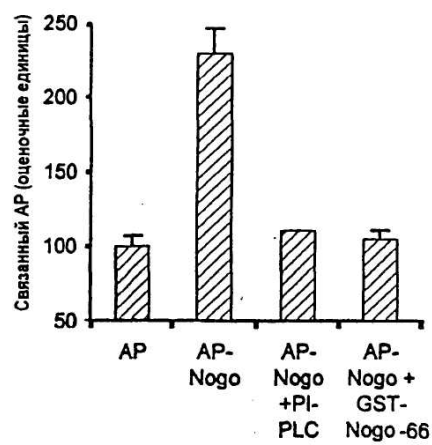
Фиг. 9b



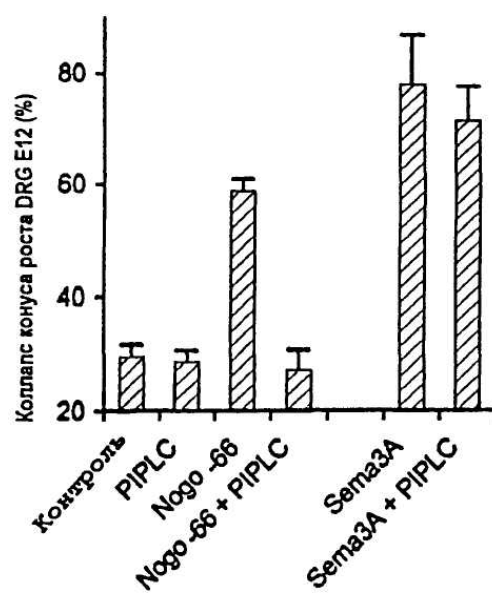
Фиг. 9c



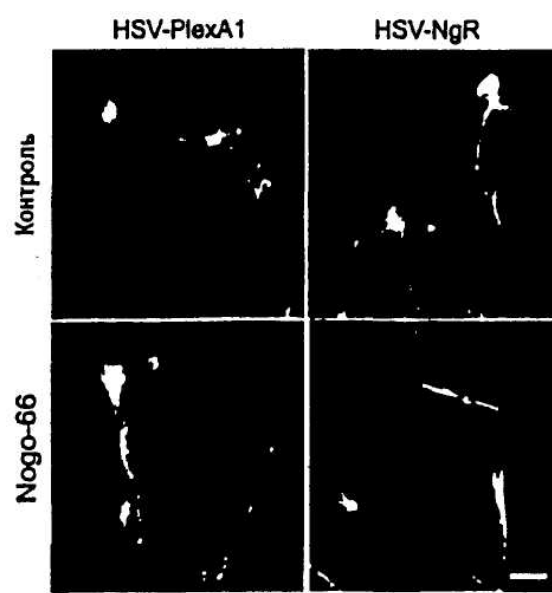
Фиг. 10a



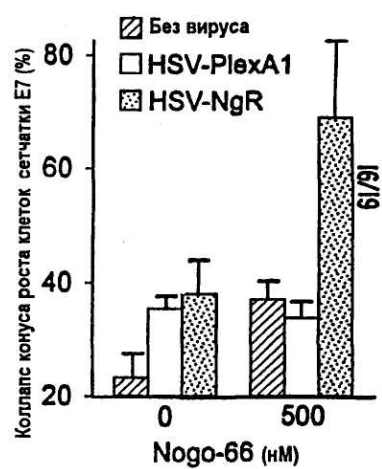
Фиг. 10b



Фиг. 10с



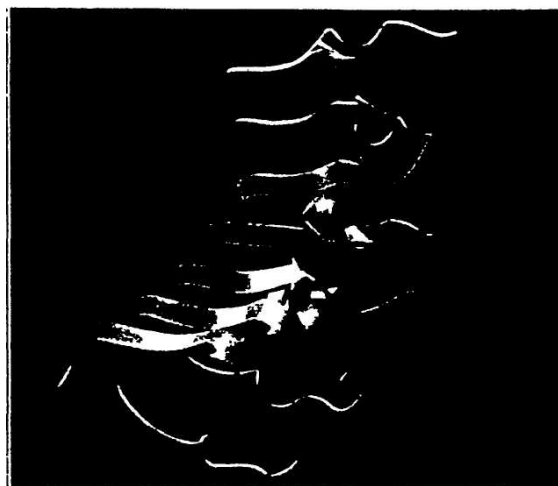
Фиг. 10d



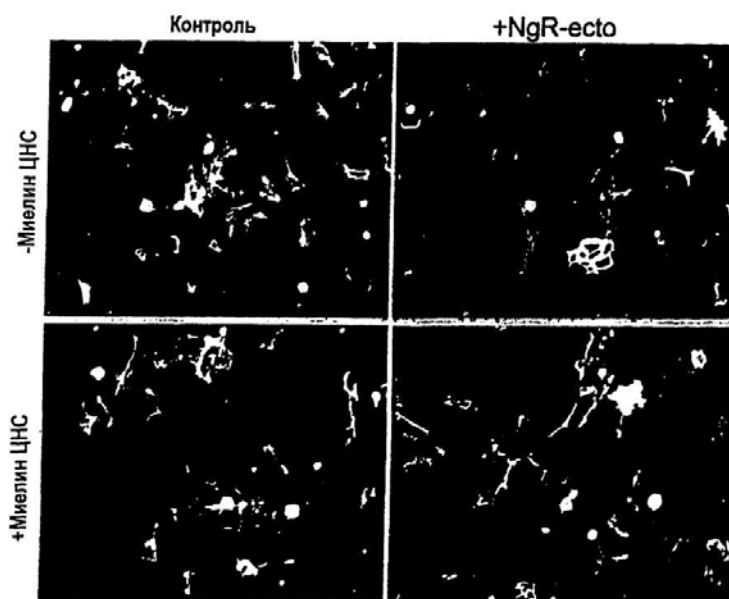
Фиг. 10е

| Сигнал | Повторы,<br>богатые Leu | LRRCT | TM/GPI | Уровень<br>экспрессии | Связывание<br>Nogo |
|--------|-------------------------|-------|--------|-----------------------|--------------------|
|        | 1 2 3 4 5 6 7 8         |       |        | ++                    | ++                 |
|        | 1 2 3 4 5 6 7 8         |       |        | ++                    | ++                 |
|        | 1 2 3 4 5 6 7 8         |       |        | ++                    | ++                 |
|        | 3 4 5 6 7 8             |       |        | ++                    | -                  |
|        | 5 6 7 8                 |       |        | ++                    | -                  |
|        | 1 2 3 4 5 6             |       |        | ++                    | -                  |
|        | 1 2 3 4 5 6 7 8         |       |        | ++                    | -                  |
|        | 1 2 3 4 5 6 7 8         |       |        | ++                    | -                  |

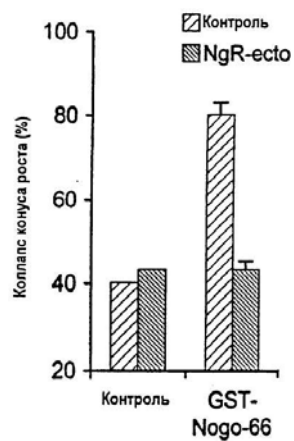
Фиг. 11a



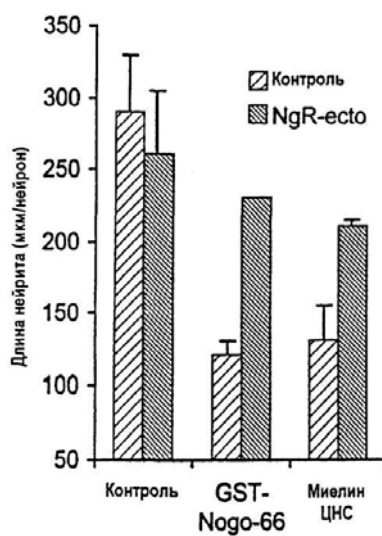
Фиг. 11b



Фиг. 12a



Фиг. 12b



Фиг. 12с

