

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

(19) BG

(11) 106907 A  
7(51) C 07 K 14/705



ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ  
ЗА  
ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

<p>(21) Регистров № 106907 (22) Заявено на 05.07.2002 (24) Начало на действие на патента от:</p> <p>Приоритетни данни</p> <p>(31) 175707 (32) 12.01.2000 (33) US 207366 26.05.2000 US 236378 29.09.2000 US</p> <p>(41) Публикувана заявка в бюлетин № 5 на 30.05.2003 (45) Отпечатано на (46) Публикувано в бюлетин № на (56) Информационни източници:</p> <p>(62) Разделена заявка от рег. №</p>	<p>(71) Заявител(и): YALE UNIVERSITY NEW HAVEN, CT (US)</p> <p>(72) Изобретател(и): Stephen M. Strittmatter New Haven, CT (US)</p> <p>(74) Представител по индустриална собственост: Румяна Стефанова Слабова, 1124 София, ул. "Леонардо да Винчи" 3</p> <p>(86) № и дата на PCT заявка: PCT/US01/01041, 12.01.2001</p> <p>(87) № и дата на PCT публикация: WO01/51520, 19.07.2001</p>
---	--

(54) NOGO РЕЦЕПТОР-МЕДИИРАНА БЛОКАДА НА АКСОНАЛНИЯ РАСТЕЖ

(57) Изобретението се отнася до препарати и методи, приложими при лечение на черепни и мозъчни травми, увреждания на гръбначния мозък, инсулт или демиелинизиращо заболяване. Изобретението се отнася също до Nogo рецепторни белтъци и биологично активни Nogo (лиганд) белтъчни фрагменти, до препарати и методи за моделиране експресията или активността на Nogo и Nogo рецепторния белтък, както и до пептиди, които блокират Nogo-медирано инхибиране на аксоналното нарастване.

74 претенции, 19 фигури

BG 106907 A

## **NOGO РЕЦЕПТОР-МЕДИИРАНА БЛОКАДА НА АКСОНАЛНИЯ РАСТЕЖ**

2241/02-PC

**АВТОР**

Stephen M. Strittmatter

### **ПРЕПРАТКА КЪМ СВЪРЗАНИ ЗАЯВКИ**

Настоящата заявка е свързана с U.S. Provisional Patent Application 60/175,707, представена на 12 януари 2000 г.; 60/207,366, представена на 26 май 2000 г. и 60/236,378, представена на 29 септември 2000 г., които тук са включени чрез цитат в тяхната цялост.

### **ПОДКРЕПА ОТ ПРАВИТЕЛСТВОТО НА САЩ**

Настоящото изобретение е изпълнено отчасти с правителствена подкрепа от Националния Институт за здраве гранд 5-R01-NS33020 (National Institute of Health Grant 5-R01-NS33020).

### **ОБЛАСТ НА ТЕХНИКАТА**

Изобретението е специфично свързано с нови човешки и миши гени, които кодират рецептор за Nogo белтък, този рецептор е способен да регулира аксоналния растеж. Тези Nogo рецепторни гени селективно се експресират в аксоните и дендритите на нервните клетки на централната нервна система при аксоналния растеж. Изобретението е свързано също с комбинация от методи за селективната блокада на Nogo рецептор-медирано инхибиране на аксоналния растеж, чрез блокиране взаимодействието на Nogo с Nogo рецептора. Блокадата на взаимодействието на Nogo с неговия рецептор води до блокада на инхибиторните ефекти на Nogo върху аксоналния растеж, като предизвиква последващо увеличение на аксоналния растеж.

## ПРЕДШЕСТВУВАЩО СЪСТОЯНИЕ НА ТЕХНИКАТА

Аксо̀ни и дендрити са дълги клетъчни израстъци на невроните. В дисталния край на един удължаващ се аксон или неврит има една специализирана област, известна като растежен конус. Растежните конуси са отговорни за усещане на локалната заобикаляща среда и придвижването към клетката, която е прицелна за неврона. Растежните конуси имат формата на ръчичка, с няколко дълги филоподии, които диференцирано прилепват към повърхностите на ембриона. Растежните конуси могат да бъдат чувствителни към няколко насочващи знаци, например повърхностно прилепване, растежни фактори, невротрансмитери и електрични полета. Напътването на растежа при конуса зависи от различни класове молекули на прилепване, междуклетъчни сигнали, както и фактори, които стимулират и инхибират растежните конуси. Растежният конус локализиран на края на растящият неврит напредва в различна степен, но обикновено със скорост от един до два милиметра дневно. Конусът се състои от обширно плоско разширение, с многобройни дълги микро шипчета или филоподии, които се изтеглят като острия. Тези филоподии са непрекъснато активни. Докато някои филоподии се ретрахира̀т обратно в растежния конус, други продължават да се източват през слоя. Удълженията между различни филоподии образуват ламелиподии.

Растежният конус може да изследва зоната, която е пред него от двете страни с неговите ламелиподии и филоподии. Когато едно удължение дойде в контакт с благоприятна повърхност, то продължава да се източва и може да манипулира растежния конус, който се движи в това направление. Така, растежният конус може да бъде управляван от малки промени в свойствата на повърхността на

субстрата. Когато растежният конус достигне съответна прицелна клетка се създава синаптичен контакт.

Увредени неврони не регенерират в централната нервна система (ЦНС) след нараняване дължащо се на травма и заболяване. Отсъствието на аксонална регенерация след увреждане може да бъде приписана на наличието на инхибитори на аксоналния растеж. Тези инхибитори преимуществено са свързани с миелина и съставляват важна бариера за регенерация. Инхибитори на аксоналния растеж присъствуват в миелин от централната нервна система и плазмената мембрана на олигодендроцитите, които синтезират миелин в ЦНС (Schwab et al., (1993) *Amm.Rev.Neurosci.* 16, 565-595).

Миелинът на ЦНС е удължение на клетъчната мембрана на олигодендроцита. Един олигодендроцит миелинизира до тридесет различни аксонални сегменти на ЦНС. Мембранните източвания на олигодендроцита обвиват аксоните концентрично за образуване на миелинова обвивка. Плътното прилепналият зрял миелин се състои от паралелни слоеве на бимолекулни липиди разположени към слоеве от хидратиран белтък. Активна миелинова синтеза започва *in utero* и продължава през първите две години от живота. По-бавна синтеза продължава по време на детството и юношеството, като обмяна на зрелия миелин продължава в бавна степен по време на зрелия живот. Развиващите се и зрелите форми на миелин са податливи на увреждане от заболяване или физическа травма, което води до деградиране на миелина обвиващ аксона.

Изглежда, че свързани с миелин инхибитори първично допирнасят за отслабване аксоналната регенерация на ЦНС *in vivo*, след прекъсване цялостта на аксона, докато други инхибитори на не-миелин свързан аксонален растеж в ЦНС, могат да имат по-малка

роля. Тези инхибитори блокират аксоналната регенерация след невронално увреждане от травма, инсулт или вирусна инфекция.

Многобройни инхибитори на миелин-производен аксонален растеж, са характеризирани (виж, за обзор David et al., (1999) WO995394547; Bandman et al., (1999) U.S. Patent 5,858,708; Schwab, (1996) *Neurochem.Res.* 21, 755-761). Описани са няколко компоненти на бялото вещество на ЦНС, N135, N1250 (Nogo) и миелин-свързан гликопротеин (MAG), които имат инхибиторна активност при аксоналното удължаване (Schwab et al., (1990) WO9005191] Schwab et al., (1997) U.S. Patent 5,684,133). В частност, Nogo е 250 kDa миелин-свързан инхибитор на аксоналния растеж, който е клониран и характеризирани (Nagase et al., (1998) *DNA Res.* 5, 355-364; Schwab, (1990) *Exp.Neurol.* 109, 2-5). Nogo кДНК за пръв път е идентифицирана чрез случаен анализ на мозъчна кДНК и е нямала предполагаема функция (Nagase et al., (1998) *DNA Res.* 5, 355-364).

Schwab и колеги са публикували последователността на шест пептиди, случайни производни от протеолитична хидролиза на предполагаем говежди N1250 (Nogo) белтък (Spillmann et al., (1998) *J.Biol.Chem.* 273, 19283-19293). Наскоро бе депозирана в GenBank предполагаема пълноверижна кДНК последователност за този белтък. Този 4.1 килобаза човешки кДНК клон, KIAA0886, произхожда от усилието на Kazusa DNA Research Institute да секвенира произволна високомолекулна мозъчна кДНК (Nagase et al., (1998) *DNA Res.* 31, 355-364). Този нов кДНК клон кодира 135 kDa белтък, който включва всичките шест пептидни последователности, произхождащи от говежди Nogo.

Човешката Nogo-A последователност споделя висока хомология върху нейната карбоксилна трета с Reticulon (Rtn) белтъчното семейство. Rtn 1 също е наречен невро-ендокринен специфичен белтък (NSP) поради това, че той се експресира

изключително в невро-ендокринни клетки (Van de Velde et al., (1994) J.Cell.Sci. 107, 2403-2416). Всички Rtn белтъци споделят една област от 200 аминокиселинни остатъци на последователността при карбоксилния край на белтъка (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). Разпознати са сродни последователности в геномите на мухата и червея (Moreira et al., (1999) Genomics 58, 73-81). Тази област е приблизително 70% идентична с Rtn семейството. Амино крайните области не са свързани една с друга и произхождат от различни алтернативни РНК снаждащи процеси.

Предсказани са три форми на Nogo белтък от анализи на последователности депозирани в GenBank и по хомология с публикуваните Rtn 1 изоформи (Nogo-A, Nogo-B, Nogo-C). Nogo-B от 37 kDa е възможно да съответствува на N135 и обяснява антигенната свързаност на инхибиторната активност върху N135 и N1250 (Nogo-A) аксоналното нарастване. Nogo-C-Мус показва електрофоретична подвижност съответна на 25 kDa при SDS-PAGE и е описан по-рано като Rtn4 и vp2015. Способността на Nogo-A белтъкът да инхибира аксоналната регенерация е призната наскоро (GrandPre et al., (2000) Nature 403, 439-444; Chen et al., (2000) Nature 403, 434-439; Prinjha et al., (2000) Nature 403, 483-484).

Отсъствието на отново удължаване на аксона през лезии на ЦНС, след увреждане е прието като причина за постоянните вредни ефекти свързани с травма, инсулт и демиелинизираци заболявания. Описана е модулация на N1250 като средство за лечение регенерация на неврони, увредени от травма, инфаркт и дегенеративни заболявания на ЦНС (Schwab et al., (1994) WO9417831; Tatagiba et al., (1997) Neurosurgery 40, 541-546) както и злокачествени тумори в

ЦНС, като глиобластома (Schwab et al., (1993) U.S.Patent 5,250,414; Schwab et al., (2000) U.S.Patent 6,025,333).

Съобщено е, че антитела, които разпознават NI250 са полезни при диагнозата и лечението на нервни увреди в резултат на травма, инфаркт и дегенеративни заболявания на ЦНС (Schnell & Schwab, (1990) Nature 343, 269-272; Schwab et al., (1997) U.S.Patent 5,684,133). При аксони, които стават миелинизирани, има корелация между развитието на миелин и появата на Nogo. След блокиране на Nogo с антитела, невроните могат отново да изпращат израстък през нарушения, предизвикани от нервно увреждане (Varga et al., (1995) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 92, 10959-10963).

Механизмът на действие, по който Nogo инхибира аксоналния растеж не е напълно изяснен. Идентифицирането и характеризирането този механизъм на действие и биохимичните пътища, свързани с ефектите на Nogo, биха били полезни при лечение на болестни състояния, свързани с аксонално увреждане и аксонална демиелинизация.

## ТЕХНИЧЕСКА СЪЩНОСТ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Настоящото изобретение се основава на откритието на Nogo рецепторни белтъци и биологично активни Nogo белтъчни (лигандни) фрагменти. Изобретението предоставя изолирана молекула нуклеинова киселина, подбрана от група състояща се от изолирана молекула нуклеинова киселина, която кодира аминокиселинната последователност на SEQ ID NO: 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 или 20; изолирана молекула нуклеинова киселина, която кодира фрагмент от най-малко шест, напр. десет, петнадесет, двадесет, двадесет и пет, тридесет, четиридесет, петдесет, шестдесет или седемдесет аминокиселини на SEQ ID NO:2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 или 20; изолирана молекула нуклеинова киселина, която хибридува с

молекула нуклеинова киселина съдържаща комплемента на SEQ ID NO: 1, 3, 7, 9, 11, 13, 15, 17 или 19 при условия на висока строгост; и изолирана молекула нуклеинова киселина, с най-малко седемдесет и пет, например, осемдесет, осемдесет и пет, деветдесет или деветдесет и пет процента идентичност на аминокиселинната последователност с SEQ ID NO: 1, 3, 7, 9, 11, 13, 15, 17 или 19. В предпочитано изпълнение, изобретението включва изолирана молекула нуклеинова киселина, съдържаща нуклеотиди 166 до 1584 на SEQ ID NO: 1 или нуклеотиди 178 до 1596 на SEQ ID NO: 3.

Настоящото изобретение по-нататък включва молекулите нуклеинови киселини, оперативно свързани с един или повече контролни елементи на експресията, включително вектори съдържащи изолираните молекули нуклеинови киселини. Изобретението по-нататък включва клетки гостоприемници, трансформирани да съдържат молекулите нуклеинови киселини на изобретението и методи за получаване на белтък, характеризиращ се с етап за култивиране на клетка гостоприемник, трансформирана с молекула нуклеинова киселина на изобретението, в условия, при които белтъкът е експресиран.

Настоящото изобретение включва изолиран полипептид, избран от групата състояща се от изолиран пептид съдържащ аминокиселинната последователност на SEQ ID NO: 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 или 20; изолиран полипептид съдържащ фрагмент от най-малко шест, например, десет, петнадесет, двадесет, двадесет и пет, тридесет, четиридесет, петдесет, шестдесет или седемдесет аминокиселини на SEQ ID NO: 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 или 20; изолиран полипептид, съдържащ аминокиселинната последователност на SEQ ID NO: 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 или 20, съдържаща най-малко една, например пет, десет, петнадесет или двадесет консервативни аминокиселинни замени; изолиран полипептид



съдържащ аминокиселинната последователност на SEQ ID NO: 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 или 20 съдържаща една, например пет, десет, петнадесет или двадесет естествено срещащи се замени на аминокиселинната последователност; и един изолиран полипептид с най-малко седемдесет и пет, например осемдесет, осемдесет и пет, деветдесет или деветдесет и пет процента идентичност на аминокиселинната последователност със SEQ ID NO: 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 или 20. Изобретението включва също химерни полипептиди, съдържащи аминокиселинната последователност на SEQ ID NO: 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 или 20.

Изобретението по-нататък предоставя антитела, които се свързват с Nogo белтък и антитела, които се свързват с Nogo рецепторен белтък. Антителата могат да бъдат моноклонални или поликлонални антитела. В допълнение, антитялото може да бъде хуманизирано. Изобретението включва също фрагменти от антитяло, които проявяват антиген свързваща активност.

Изобретението включва метод за идентифициране на агент, който модулира Nogo белтък или експресия на Nogo рецепторен белтък, характеризира се с това, че има етапи за предоставяне на клетка експресираща Nogo белтък или Nogo рецепторен белтък; контактуване на клетката с кандидат-агент; и откриване нарастване или намаление нивото на Nogo белтъка или експресията на Nogo рецепторен белтък в присъствието на кандидат-агента, по отношение нивото на Nogo белтък или експресия на Nogo рецепторен белтък в отсъствието на кандидат-агента.

Изобретението включва също метод за идентифициране агент, който модулира най-малко една активност на Nogo белтък или Nogo рецепторен белтък, характеризира се с това, че има етапи предоставящи клетка експресираща Nogo белтък или Nogo рецепторен белтък; контактуване на клетката с кандидат-агент; и

откриване нарастване или намаление нивото на Nogo белтък или активност на Nogo рецепторен белтък в присъствието на кандидат-агента, в сравнение с нивото на Nogo белтък или активността на Nogo рецепторен белтък в отсъствието на кандидат агента. В едно изпълнение на изобретението, активността е придвижване на растежния конус. В едно изпълнение, агентът е избран от група състояща се от Nogo белтъчен фрагмент, анти-Nogo антитяло и анти-Nogo рецепторно антитяло.

По-нататък изобретението включва метод за идентифициране на свързващ участник за Nogo рецепторен белтък, характеризиращ се с етапите за предоставяне на Nogo рецепторен белтък; контактуване на Nogo рецептора с кандидат свързващ участник; и откриване на свързване на кандидат свързващия участник с Nogo рецепторния белтък. В едно изпълнение, свързващият участник е избран от група, състояща се от Nogo белтъчен фрагмент, едно анти-Nogo антитяло, един фрагмент на анти-Nogo рецепторно антитяло; и едно хуманизирано анти-Nogo рецепторно антитяло.

Изобретението включва метод за лечение нарушение в централната нервна система у бозайник, характеризиращ се с това, че има етап на въвеждане на ефективно количество от агент, който модулира експресията на Nogo белтък или Nogo рецепторен белтък. В някои изпълнения на изобретението, експресията е понижена, докато в други изпълнения, тя е повишена.

По-нататък изобретението включва метод за лечение нарушение на централната нервна система у бозайник, характеризиращ се с това, че има етап на въвеждане на ефективно количество от агент, който модулира активността на Nogo белтък или Nogo рецепторен белтък. Активността може да бъде повишена или понижена. Ако активността е понижена, агентът може да бъде

например полипептид, съдържащ аминокиселинна последователност на SEQ ID NO: 8, 10, 12, 18 или 20; един пълноразмерен Nogo рецепторен белтък; фрагмент от Nogo рецепторен белтък; един разтворим фрагмент от Nogo рецепторен белтък; или анти-Nogo рецепторно антияло или негов активен фрагмент. Ако активността е повишена, агентът е полипептид, избран от група състояща се от SEQ ID NO: 14 и 16.

Един разтворим Nogo рецепторен белтък може да включва фрагмент от най-малко шест, например десет, петнадесет, двадесет, двадесет и пет, тридесет, четиридесет, петдесет, шестдесет или седемдесет аминокиселини на SEQ ID NO: 2 или 4; аминокиселинната последователност на SEQ ID NO: 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 или 20; аминокиселинната последователност на SEQ ID NO: 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 или 20, включваща най-малко една или например, пет, десет, петнадесет или двадесет консервативни аминокиселинни замени; аминокиселинната последователност на SEQ ID NO: 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 или 20 включваща най-малко една, например пет, десет, петнадесет или двадесет естествено срещащи се аминокиселинни замени на последователността.

В някои изпълнения, нарушение на централната нервна система е резултат на черепна или мозъчна травма, увреждане на гръбначния мозък, инсулт или демиелинизиращо заболяване. Примери на демиелинизиращи заболявания са множествена склероза, монофазна демиелинизация, енцефаломиелит, мултифокална левкоенцефалопатия, паненцефалит, болест на Marchiafava-Bignami, понтинна миелинолиза, адренолевкодистрофия, болест на Pelizaeus-Merzbacher, спонгиозна дегенерация, болест на Alexander, болест на Canavan, метахроматична левкодистрофия и болест на Krabbe.

По-нататък изобретението включва изолиран пептид, който специфично се свързва с Nogo рецепторен белтък. Специфичното

свързване на пептида с Nogo рецепторен белтък, предпочитано има най-малко един от следните ефекти: инхибиране свързването на Nogo белтък с Nogo рецепторен белтък, блокада на Nogo-медирано инхибиране на аксоналния растеж, модулиране експресията на Nogo белтък, или модулиране експресията на Nogo рецепторен белтък. В някои изпълнения, изолираният пептид съдържа аминокиселинната последователност на SEQ ID NO: 8, 10, 12, 14, 16, 18 или 20, или една от гореспоменатите с една или повече, например пет, десет, петнадесет или двадесет последователни аминокиселинни замени или естествено срещащи се аминокиселинни замени.

## ОПИСАНИЕ НА ФИГУРИТЕ

### Фигура 1 – Сравнение на Nogo домени

(a) е схематична диаграма, която обобщава особености на Nogo белтъци, използвани в това проучване. (b) е фотография на NIH-3T3 фибробласти, култивирани върху повърхности с Амино-Nogo, GST-Nogo-66 или без белтък и оцветени за филаментозен актин (скала полоса 40 $\mu$ m). (c) е фотография на пилешки E12 дорзален коренчев ганглий, култивиран върху повърхности покрити с Амино-Nogo, GST-Nogo-66 или без белтък (субстрат-свързан) или с 100nM Nogo белтък (разтворим) (скала полоса, 40 $\mu$ m). (d) е фотография на гел и на един имуноблот, където пречистен Амино-Nogo-Мус-His белтък е подложен на SDS-PAGE и е оцветен с Commassie Brilliant Blue (CBB) или е направен имуноблот с анти-Мус антитела (Мус) (маркери за молекулни тегла от 200, 116, 97, 65 & 45 kDa са отляво). (e) е графика представяща експериментални данни, където процентът на 3T3 фибробласти с площ по-голяма от 1200  $\mu$ m<sup>2</sup> (разгъната) е измерен от експерименти като в (b) върху Nogo-покрити повърхности (черно) или с разтворим 100nM Nogo препарати (синьо) (AM, Amino-Nogo; AM+Мус, Amino-Nogo, преинкубирани с анти-Мус

антитяло; AM+Мус+Мо, AM+Мус, преинкубирани с анти-мишо IgG антитяло; Мус+Мо, анти-Мус антитяло плюс анти-мишо IgG антитяло). (f) е графика представяща експериментални данни, където процентът на разстлани COS-7 клетки е определен след култура върху Nogo-покрити повърхности или с разтворими 100nM Nogo препарати. (g) е графика представяща експериментални данни, където ефектите на пречистени препарати от GST-Nogo-66 или Amino-Nogo върху морфологията на растежните конуси е определена при култури от E12 дорзален коренчев ганглий в указаните концентрации след тридесет минути. Това показва, че GST-Nogo-66 е по-моцнен два порядъка от величината на Amino-Nogo в този тест. (h) е графика представяща експериментални данни, където нарастването на неврита на клетка в култури от E13 дорзален ганглий, е определено количествено от експерименти както в (c) върху Nogo-покрити повърхности или с разтворими 100nM Nogo препарати. (i) е графика представяща експериментални данни, където са измерени ефектите на Nogo препарати върху нарастване на неврита в церебеларни неврони.

**Фигура 2 – Nogo фрагменти антагонизират действието на Nogo и миелин на ЦНС**

(a) е фотография на експлантите от пилешки E12 дорзален коренчев ганглий, които са култивирани и е определен колапс на растежния конус, както е описано във Фигура 4. Културите са третирани със следните препарати за тридесет минути преди фиксиране и оцветяване с родамин-фалоидин (rhodamine-phalloidin): буфер само (контрола); 15nM GST-Nogo (Nogo); 1 $\mu$ M от всеки Per1, Per2 и Per3 (Per); 15 nM GST-Nogo плюс 1 $\mu$ M от всеки Per1, Per2 и Per3 (Nogo+Per). Отбележете, че колапс на растежния конус с Nogo е блокиран от добавката на пептид. Per1, остатъци 1-25 на екстрацелуларния домен; Per2, 11-35; и Per3, 21-45. (b) е

графика, която количествено оценява резултатите от тестовете за колапс на растежния конус както в (а). Отделните пептиди са включени като 4 $\mu$ M, и пептид 1-3 сместа е 1  $\mu$ M от всеки пептид. Получен е миелин от ЦНС както е описано и указаните общи концентрации на тоталния миелинов белтък са включени в културите. Всички резултати са средните  $\pm$  ср.станд.откл., изчислени от четири до седем определения. Тези стойности значимо различни от съответните стойности със същата концентрация на Nogo или миелин са показани, но без пептид (звездичка,  $p < 0.05$ , Student's двустранен t тест).

#### Фигура 3 – Nogo антагонист Пер2-41

(а) е графика показваща резултатите от тестове за колапс на растежен конус на E12 дорзален коренчев ганглий. Тези тестове са проведени и количествено оценени както при GrandPre et al., (2000) Nature 403, 439-444. Тестовете са проведени без добавка (контрола), 156 nM GST-Nogo (Nogo) или 15nM GST-Nogo плюс 1 $\mu$ M Пер2-41 (Nogo-Пер). Стойностите са средни  $\pm$  ср.станд.откл. изчислени от четири определения. (b) е графика представяща резултатите от свързващи експерименти, където свързването на 10nM AP-Nogo с пилешки неврони от E12 дорзален коренчев ганглий е определено както е описано във Фигура 4, с добавката на указаните концентрации на Пер2-41.

#### Фигура 4 – Nogo Пер2-41 предотвратява Nogo & ЦНС миелин инхибиране на невритното нарастване

Тази фигура е графика, която представя резултатите от тестове за нарастване, където неврони са култивирани в присъствието на указаните концентрации Пер2-41, пречистен GST-Nogo (GST-Nogo-66) белтък и суров ЦНС миелинов протеин. Неврони

от пилешки E13 дорзален коренчев ганглий са култивирани при стандартни условия. За тестова за нарастване, неврони са култивирани в присъствието на указаните концентрации Рер-41, пречистен GST-Nogo (GST-Nogo-66) белтък и суров ЦНС миелинов протеин. Това показва, че Рер-41 може да снее инхибирането на невритното нарастване с GST-Nogo или тотален ЦНС миелин.

Фигура 5 – Лиганд свързващ тест за аксонални Nogo рецептори

(а) е фотография на гел и имуноблот, където His-AP-Nogo (66 аминокиселина) белтък е експресирани в HEK293T клетки и пречистен от кондиционираната среда върху никел-съдържаща смола чрез His tag. Пречистен белтък е подлаган на SDS-PAGE и е оцветяван за общ белтък с СВВ или е правен имуноблот с анти-Nogo- антитела (анти-Nogo). От лявата страна са показани маркери за молекулни тегла 200, 116, 97, 65 и 45 kDa и от дясната страна е показана миграцията на AP-Nogo. (b) е фотография на дисоциирани неврони от пилешки E12 дорзален коренчев ганглий, които са инкубирани с 10nM AP-Nogo или 10 nM AP-Nogo + 160 nM GST-Nogo за 60 минути на 23°C. Клетките са измити, фиксирани и инкубирани на 60°C, за инактивиране на ендогенния AP. Свързаният AP-Nogo е откриван чрез инкубация с нитротетразолово синьо (NBT). Забележете интензивното невронално оцветяване с AP-Nogo, което е изместено от небелязания лиганд. (c) е графика, представяща експериментални данни, при които е определяна потентността на AP-Nogo и GST-Nogo в тестове с колапс на растежен конус от пилешки E12 дорзален коренчев ганглий, както е описано в Примерния раздел. Определено е, че EC<sub>50</sub> на AP-Nogo е 1nM или по-малка. Илюстрирани са средните стойности ± средното стандартно отклонение, изчислени от пет до осем определения. (d) е графика представяща

експериментални данни, при които свързването на 10 nM AP-Nogo с неврони от пилешки E12 дорзален коренчев ганглий е определяно самостоятелно или в присъствието на 100 nM GST-Nogo, или в присъствието на 4 μM Per2, което е определено от експерименти както в (b) с метода описан в Експерименталния раздел. Представени са средните стойности  $\pm$  средното стандартно отклонение от осем определения. (e) е графика представяща експериментални данни, при които AP-Nogo свързване с неврони от дорзален коренчев ганглий е определяно като функция от концентрацията на AP-Nogo. Това е един от шест експеримента със сходни резултати. (f) е графика обобщаваща данните от (e) преразпределени за Scatchard анализ. Видимото  $K_d$  за AP-Nogo свързване с неврони от пилешки E12 дорзален коренчев ганглий е 3 nM.

#### Фигура 6 – Nogo свързване с COS-7 експресираци Nogo рецептора

Тази фигура е фотография на COS-7 клетки, които са трансфектирани с експресионен вектор, кодиращ миши Nogo рецептор. Два дни след трансфекцията е определяно свързване на AP-Nogo или AP, както е описано в Примерния раздел за неврони от дорзален коренчев ганглий. Отбележете селективното свързване на Nogo с Nogo рецептор експресираци клетки. Свързването е силно намалено в присъствието на излишък от Nogo пептид, който не е слет с AP.

#### Фигура 7 – Структура на Nogo рецептора

Тази схематична диаграма илюстрира структурните особености на Nogo рецептора.



### Фигура 8 – Разпространение на Nogo рецепторна мРНК.

Тази фигура е фотография на Northern blot на Nogo рецепторна мРНК за полиА-РНК проби, от указаните миши тъкани от лявата страна и за проби от тотална РНК от различни зони на мозъка на плъх в дясната страна. Отляво е показана миграцията на различни размери РНК маркери.

### Фигура 9 – Имунохистология на Nogo-66 рецептор

(а) е фотография на имуноблот, при който са анализирани мембранни фракции (10 $\mu$ g белтък) от указаните клетки или пилешки тъкани с анти-Nogo-66 рецепторен имуноблот (в дясно са маркери за молекулни тегла в kDa). (b) е фотография на COS-7 клетки, експресиращи Мус-Nogo-66 рецептор или експланти от пилешки Е5 гръбначен мозък (осем дни *in vitro*), оцветени с анти-Nogo-66 рецептор, анти-Мус или олигодендроцит-специфично О4 антитяло. Долните три блока показват двойно белязана имунохистохимия на същото поле ( скала блокче, 40  $\mu$ m за горните три блока и 80  $\mu$ m за долните три блока). (c) е фотография на фиксирани с параформалдехид срези с вибратор, на препарат от зрял мозък или гръбначен мозък, оцветен с анти-Nogo-66 рецептор. Това демонстрира оцветяване на аксонални профили (стрелкички) в моста и гръбначния мозък. Оцветяването е драматично намалено в присъствието на 10  $\mu$ g/ml GST-Nogo-66 рецепторен антиген.

### Фигура 10 – Nogo-66 рецептор медира колапс на растежния конус с Nogo-66

(а) е фотография на пилешки Е12 DRG (дорзален ганглий) експланти, изложени на Nogo-66 след пре-третиране с PI-PLC или буфер. Илюстрирано е оцветяване на F-актин в аксони (скала блокче, 40  $\mu$ m). (b) е графика обобщаваща експерименталните резултати от

свързване на 3 nM AP или AP-Nogo с дисоциирани неврони от пилешки E12 дорзален коренчев ганглий. Където е указано, културите са пре-третирани с PI-PLC или 150 nM GST-Nogo-66 е включен в инкубацията с AP-Nogo. (c) е графика обобщаваща измервания на колапс на растежния конус от експерименти както в (a). Култури от E12 DRG са третирани със или без PI-PLC, преди излагане на 30 nM GST-Nogo-66 или 100  $\mu$ M Sema3A. (d) е фотография на клетъчни експланти от E7 ретинален ганглий, инфектирани с контролен вирус (HSV-PlexinA1) или с HSV-Мус-Nogo-66 рецептор и след това са инкубирани със или без Nogo-66. Илюстрирано е оцветяване с фалоидин на аксоналните растежни конуси (скала блокче, 25  $\mu$ m). (e) е графика определяща количествено колапса на растежния конус в неинфектирани, или инфектирани с вирус E7 ретинални неврони както в (d).

#### Фигура 11 – Структура-функция анализ на Nogo-66 рецептор

(a) е схематична диаграма на различни Nogo-66 рецепторни делетирани мутанти. Тези мутанти са тествани за ниво на експресия чрез имуноблот и за AP-Nogo свързване. Отбележете, че левцин богатите повтори и богатият на левцин повтор карбокси край е необходим за Nogo свързване, но остатъкът от белтъка не е. Вторият белтък е тестван след пречистване и имобилизиране. (b) е диаграма на предсказаната три-димензионална структура за първите седем богати на левцин повтори на Nogo-66 рецептора. Това произтича от компютерно моделиране въз основа на предсказаната структура на сродните богати на левцин повтори на леутропиновия рецептор (Jiang et al., (1995) Structure 3, 1341-1353). Моделирането е направено с Swiss-Model при . Указани са също областите с бета лента и алфа спираловидна вторична структура.

## Фигура 12 – Разтворим Nogo рецептор блокира Nogo-66

Пилешки E13 DRG неврони, култивирани при стандартни условия. В тестове за колапс на растежни конуси, е добавяна кондиционирана среда от HEK 293T клетки секретирани 1-348 аминокиселинен ектодомен фрагмент на мишия Nogo рецептор или контролна кондиционирана среда заедно със 100 nM Nogo-66. В долната част на левия блок, данните в графата демонстрират, че Nogo-индуциран колапс е блокиран от разтворим рецепторен фрагмент. За тестове с нарастване, неврони са култивирани в присъствието на контролен или Nogo рецепторен ектодомен кондиционирана среда заедно с Nogo-66 белтък (50 nM) или миелин от централната нервна система (15 µg тотален белтък/ ml). Горните четири блока показват фотографии демонстриращи, че миелин от централната нервна система инхибира нарастването и че то е блокирано от наличието на Nogo рецепторен ектодомен белтък. Нарастването е определено количествено на графиката при долния десен блок.

## ПОДРОБНО ОПИСАНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

### I. Дефиниции

Ако друго не е указано, всички технически и научни термини използвани тук имат същото значение както обичайно се разбира от специалиста в тази област, към която принадлежи изобретението. Въпреки че всякакви методи и материали, сходни или еквивалентни на описаните тук, могат да бъдат използвани в практиката или тестирането на настоящото изобретение, предпочитаните методи и материали са описани.

Както тук е използван, терминът "аксон" се използва за дълго клетъчно източване от неврона, където еферентни (излизаци)

акционни потенциали се провеждат от клетъчното тяло към прицелни клетки.

Както тук се използва, терминът "аксонален растеж" се отнася до удължаване на дългия израстък или аксон, произлизащ от клетъчното тяло и предшествуван от растежния конус.

Както тук е използван, терминът "нарушение на централната нервна система" се отнася до всяко патологично състояние, свързано с абнормна функция на централната нервна система (ЦНС). Терминът включва, но не се ограничава до променена функция на ЦНС, в резултат на физична травма на мозъчната тъкан, вирусна инфекция, автоимунен механизъм, генетична мутация и невродегенеративни заболявания или нарушения.

Както тук е използван, терминът "химерен белтък" се отнася за всеки полипептид, който не е напълно хомоложен на аминокиселинно ниво, за неговата див-тип последователност или е кодиран от нуклеинова киселина, която произхожда от снаждане на два отделни източника на нуклеинови киселини. Терминът включва, но не се ограничава до фузия на белтъци и белтъци планирани да съдържат една или повече аминокиселинни замени, които отличават тяхната аминокиселинна последователност от последователността на дивия тип.

Както тук е използван терминът "демиелинизиращо заболяване" се отнася за патологично нарушение, характеризиращо се с деградация на миелиновата обвивка на олигодендроцитната клетъчна мембрана.

Както тук е използван терминът "растежен конус" се отнася до специализирана област на края на растящия неврит, която е отговорна за усещане на заобикалящата среда и придвижване на аксона към съответна синаптична прицелна клетка.

Както тук е използван терминът “движение на растежния конус” се отнася за източване или колапс на растежния конус към прицелна клетка на неврона.

Както тук е използван терминът “неврит” се отнася за израстък, растящ извън неврона. Тъй като понякога е трудно да се разграничи един дендрит от аксон в култура, терминът неврит се използва и за двете.

Както тук е използван терминът “олигодендроцит” се отнася за невроглиална клетка на централната нервна система, чиято функция е да миелинизира аксоните на централната нервна система.

Както тук е използван, терминът “полипептид” се отнася за пептид, който при хидролиза освобождава повече от две аминокиселини, наречени трипептиди, тетрапептиди и т.н. съответно на броя на аминокиселините съдържащи се в полипептида. Терминът “ полипептид” се използва синонимно с термина “белтък” и “пептид” навсякъде в спецификацията.

## II. Специфични изпълнения

### A. Nogo рецепторен белтък и пептидни агенти за Nogo рецепторния белтък

Настоящото изобретение предоставя изолиран белтък, алелни варианти на белтъка и консервативни аминокиселинни замени на белтъка. Както тук е използван, белтъкът или полипептидът се отнася за Nogo рецепторен белтък, който има човешка аминокиселинна последователност представена в SEQ ID NO: 2 или мишата аминокиселинна последователност, представена в SEQ ID NO: 4. Белтъкът или полипептидът се отнася също за пептидите идентифицирани като Nogo рецепторни пептидни агенти, които имат аминокиселинните последователности изобразени в SEQ ID NO: 8, 10, 12, 14, 16, 18 и 20. Изобретението включва също природно срещащи

се алелни варианти и белтъци, които има слабо различаваща се аминокиселинна последователност в сравнение със специфично представените по-горе. Алелни варианти, въпреки че притежават слабо различаваща се аминокиселинна последователност, от представената по-горе, ще имат същите или сходни биологични функции, свързани с човешкия и мишия Nogo рецепторни белтъци и Nogo рецепторните пептидни агенти представени в SEQ ID NO: 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 и 20.

Както ту е използвано, семейството белтъци свързани с Nogo рецепторните белтъци, се отнася за белтъци, които са изолирани от организми в допълнение на човешки и миши. По-долу са описани методите използвани за идентифициране и изолиране на други членове на семейството белтъци, свързани с Nogo рецепторните белтъци.

Nogo рецепторните белтъци и пептидни агенти на настоящето изобретение, предпочитано са в изолирана форма. Както тук е използван, белтък или лиганд се казва, че е изолиран, когато са използвани физични, механични или химични методи, за отстраняване на белтъка от клетъчните съставки, които нормално са свързани с белтъка. Специалистът в тази област може направо да използва стандартни методи за пречистване за получаване на изолиран белтък или лиганд.

Белтъците на настоящето изобретение включват освен това консервативни варианти на описаните тук белтъци и лиганди. Както тук е използвано, консервативен вариант се отнася за промени в аминокиселинната последователност, които не повлияват неблагоприятно биологичните функции на белтъка. Една замяна, инсерция или делеция се казва, че повлиява неблагоприятно белтъка, когато променената последователност предотвратява или нарушава биологичната функция свързана с белтъка. Например, общият заряд,

структура или хидрофобни-хидрофилни свойства на белтъка могат да бъдат променени без неблагоприятно да се повлиява дадена биологична активност. Съответно, аминокиселинната последователност може да бъде променена, например да превърне пептида по-хидрофобен или хидрофилен, без неблагоприятно повлияване биологичните активности на белтъка.

Обикновено, алелните варианти, вариантите с консервативни замени и членовете на белтъчното семейство, ще имат аминокиселинна последователност, съдържаща най-малко седемдесет и пет процента идентичност на аминокиселинната последователност с човешки и миши последователности, представени в SEQ ID NO: 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 и 20, по-предпочитано най-малко осемдесет процента, още по-предпочитано деветдесет процента и най-предпочитано поне деветдесет и пет процента. Идентичност или хомоложност по отношение на такива последователности е определена тук като процент на аминокиселинни остатъци в последователността кандидат, които са идентични с известните пептиди, след подреждане последователностите и въвеждането на празнини, ако е необходимо, за постигане максимален процент хомоложност и без да се разглеждат всякакви консервативни замени като част от идентичността на последователността. N-крайни, C-крайни или вътрешни удължавания, делеции или инсерции в пептидната последователност, няма да бъдат разглеждани като повлияващи хомологията.

Така, белтъците и пептидите на настоящето изобретение включват молекули, съдържащи аминокиселинната последователност на SEQ ID NO: 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 и 20; нейни фрагменти притежаващи една последваща последователност от най-малко около 3, 4, 5, 6, 10, 15, 20, 25, 30, 35 или повече аминокиселинни остатъци на Nogo рецепторни белтъци и пептидни агенти; варианти на

аминокиселинна последователност на такива последователности, където най-малко един аминокиселинен остатък е свързан чрез инсерция N- или C-крайно или в рамките на представената последователност: варианти на аминокиселинната последователност на представените последователности, или техни фрагменти, както е определено по-горе, които са заменени с друг остатък. Планирани варианти по-нататък включват такива съдържащи предварително определени мутации чрез, например хомоложна рекомбинация, място-насочена или PCR мутагенеза и съответните белтъци на други животински видове, включително, но без да се ограничават до заешки, плъши, свински, говежди, овчи, конски и не-човешки приматни видове, алелите или други природно срещащи се варианти на семейството белтъци; и производни, където белтъкът е ковалентно модифициран чрез замяна, химични, ензимни или други подходящи начини с една част, различна от естествено срещащата се аминокиселина (например, откриваема част като ензим или радиоизотоп).

Както е описано по-долу, могат да бъдат използвани членове от семейството белтъци: (1) за идентифициране агенти, които модулират най-малко една активност на белтъка, (2) при методи за идентифициране свързващи участници за белтъка, (3) като антиген за предизвикване на поликлонални или моноклонални антитела и (4) като терапевтичен агент.

### В. Молекули нуклеинови киселини

По-нататък настоящето изобретение предоставя молекули нуклеинови киселини, които кодират белтъци и пептиди, съдържащи аминокиселинната последователност на SEQ ID NO: 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 и 20 и сродните белтъци описани тук, предпочитано в изолирана форма. Както тук е използвано "нуклеинова киселина"



включва геномна ДНК, кДНК, мРНК и антисенз молекули, както и нуклеинови киселини базирани на алтернативни основни вериги или включвайки алтернативни бази производни от природни източници или синтезирани.

Хомология или идентичност е определена с BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) анализ, като е използван алгоритъм употребяван от програмите *blastp*, *blastn*, *blastx*, *tblastn* и *tblastx* (Karlin et al., (1990) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 87, 2264-2268 и Altschul, (1993) J.Mol.Evol. 36, 290-300 включени изцяло чрез цитат), които са оформени за търсене сходство на последователността. Подходът използван от BLAST програмата е първо да разгледа сходните сегменти между въпросна последователност и една база данни последователност, след това да се оцени статистическата значимост на всички съвпадения, които са идентифицирани и накрая да се обобщат само онези съвпадения, които удовлетворяват един предварително избран праг на значимост. За обсъждане на основни издания в търсене на сходство на база данни за последователност, виж Altschul et al., (1994) Nature Genetics 6, 119-129, която изцяло е включена чрез цитат. Търсещите параметри за хистограма, описания, подреждане, очакване ( т.е. прага на статистическа значимост за съобщените съвпадения спрямо база данни последователности), **cutoff**, **matrix** и **filter** са при отсъстващите условия. Отсъстващият оценяващ матрикс използван от **blastp**, **blastx**, **tblastn** и **tblastx** е **BLOSUM62** матрикс (Henikoff et al., (1992) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89, 10915-10919, изцяло включена чрез цитат). Четири **blastn** параметри са нагласени както следва: **Q=10**( gap creation penalty); **R=10** (gap extension penalty); **wink = 1** (много бързо, за нула време, мигане)(генерира word hits на всяка  $wink^{th}$  позиция по дължината на въпросителната); и **gapw = 16** ( да се постави ширината на прозорчето в рамките, на която се генерира поредица на последователността).

Еквивалентните условия на **Blastp** параметър бяха  $Q=9$ ;  $R=2$ ;  $wink = 1$ ; и  $gapw = 32$ . **Bestfit** сравнение между последователности, които са на разположение в **GCG package version 10.0**, използва ДНК параметри  $GAP=50$  (gap creation penalty) и  $LEN=3$  (gap extension penalty) и еквивалентните условия при сравнения на белтъци са  $GAP=8$  и  $LEN=2$ .

Както тук е използвано "условия на висока строгост" означава хибридизация при  $42^{\circ}\text{C}$  в присъствието на 50% формамид, последвана от първо измиване на  $65^{\circ}\text{C}$  с 2 x SSC съдържащ 1% натриев SDS, последвано от второ измиване при  $65^{\circ}\text{C}$  с 0.1 x SSC.

Както тук е използвано, молекула нуклеинова киселина се казва, че е "изолирана" когато молекулата нуклеинова киселина е съществено отделена от примес на нуклеинова киселина кодираща други полипептиди от източника на нуклеинова киселина.

По-нататък настоящото изобретение предоставя фрагменти от молекулата на кодиращата нуклеинова киселина. Както тук е използвано, фрагмент на молекула кодираща нуклеинова киселина се отнася за част от цялата белтък кодираща последователност. Размерът на фрагмента ще се определя от предвиденото приложение. Например, ако фрагментът е избран така, че да кодира активна част от белтъка, фрагментът ще е необходимо да бъде достатъчно голям да кодира функционалната област(и) на белтъка. Ако фрагментът ще бъде използван като сонда нуклеинова киселина или PCR праймер (зародиш), тогава дължината на фрагмента се подбира така, че да се получат сравнително малък брой погрешни удължавания при зараждане/индуциране на синтезата (probing/priming).

Фрагменти от молекули на кодиращата нуклеинова киселина на настоящото изобретение (т.е. синтетични олигонуклеотиди), които са използвани като сонди или специфични праймери за полимеразна

верижна реакция (PCR), или да синтезират генни последователности, кодиращи белтъци на изобретението, могат лесно да бъдат синтезирани с химични техники, например, фосфотриестерния метод на Matteucci et al., (1981) J.Am.Chem.Soc. 103, 3185-3191 или като се използват автоматизирани синтетични методи. В допълнение, по-големи ДНК сегменти могат да бъдат получени с добре известни методи, като синтеза на група олигонуклеотиди, които определят различни модулни сегменти на гена, последвана от лигиране на олигонуклеотиди за изграждане на завършения модифициран ген.

Кодиращите молекули нуклеинова киселина на настоящото изобретение могат по-нататък да бъдат модифицирани, така че да съдържат откриваем маркер за диагностични цели или като сонди. Разнообразие от такива маркери са известни на специалиста в тази област и могат да бъдат използвани с описаните тук кодиращи молекули. Подходящи маркери включват, но не се ограничават, до биотин, радиоактивно белязани нуклеотиди и подобни. Специалистът в тази област може да използва всеки от известните маркери, за да получи белязана кодираща молекула нуклеинова киселина.

Модификации на самата първична структура чрез делеция, добавяне или промяна на включените аминокиселини в белтъчната последователност при трансляция, могат да бъдат направени без да се нарушава активността на белтъка. Такива замени или промени имат за резултат белтъци, притежаващи аминокиселинна последователност, кодирана от нуклеинова киселина, попадаща в рамките на планирания обхват на настоящото изобретение.

### C. Изолиране на други сродни молекули нуклеинова киселина

Както е описано по-горе, идентифицирането на молекула човешка нуклеинова киселина, притежаваща SEQ ID NO: 1, 3, 7, 9, 11,

13, 15, 17 и 19, позволява на специалиста да изолира молекули нуклеинова киселина, които кодират други членове на семейството на Nogo рецепторния белтък, в допълнение на описаните тук последователности. По-нататък, представените понастоящем молекули нуклеинова киселина позволяват на специалиста да изолира молекули нуклеинова киселина, които кодират други членове на семейството на Nogo рецепторните белтъци и пептидни агенти.

По същество, специалистът може да използва аминокиселинната последователност на SEQ ID NO: 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 и 20 или техни епитоп-съдържащи фрагменти, за създаване на антители сонди за скриниране експресионни библиотеки, получени от подходящи клетки. Обикновено, поликлонален антисерум от бозайници като зайци, имунизирани с пречистения белтък (както е описано по-долу) или моноклонални антитела, могат да бъдат използвани за синтеза кДНК от бозайници или геномна експресионна библиотека, като lambda gtl1 библиотека, за получаване на подходяща кодираща последователност за други членове на белтъчното семейство. Клонираната кДНК последователност може да бъде експресирана като слет белтък, експресирана директно, като се използва нейните собствени контролни последователности или експресирана чрез конструкции използващи контролни последователности, подходящи за дадения гостоприемник, използван за експресия на ензима.

Алтернативно, част от кодиращата последователност описана тук, може да бъде синтезирана и използвана като сонда за поправка на ДНК кодираща един член на белтъчното семейство от всякакъв организъм на бозайник. Олигомери, съдържащи например, приблизително 18-20 нуклеотиди (кодиращи едно около шест до седем аминокиселинно удължаване), могат да бъдат получени и използвани да скринират геномна ДНК или кДНК библиотеки, за

получаване хибридизация при строги условия или условия на достатъчна строгост за елиминиране на неподходящо ниво на погрешни позитиви.

Допълнително, могат да бъдат получени чифтове на олигонуклеотидни праймери, за употреба в полимеразна верижна реакция (PCR), селективно да клонират кодираща молекула нуклеинова киселина. Един PCR денатуриращ/свързващ/удължаващ цикъл за използване на такива PCR праймери е добре известен на специалист в тази област и може да бъде адаптиран за приложение при изолиране на други кодиращи молекули нуклеинова киселина.

#### D. Рекомбинантни ДНК молекули, съдържащи една молекула нуклеинова киселина

Настоящото изобретение по-нататък предоставя рекомбинантни ДНК молекули (рДНК), които съдържат една кодираща последователност. Както тук е използвано, рДНК молекула е ДНК молекула, която е била подложена на молекулярна манипулация. Методи за генериране на рДНК молекули са добре известни в тази област, например виж Sambrook et al., (1989) *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press. В предпочитаните рДНК молекули, една кодираща ДНК последователност е оперативно свързана с контролни последователности на експресията и векторни последователности.

Изборът на вектор и контролни последователности на експресията, за които една от белтъчното семейство кодиращи последователности на настоящото изобретение, е оперативно свързана, зависи пряко, както е добре известно в тази област, от желаните функционални свойства (например, белтъчна експресия и клетката гостоприемник, която да бъде трансформирана). Един вектор на настоящото изобретение може да бъде най-малко способен

да насочва репликацията или инсерцията в хромозомата гостоприемник и предпочитано също експресия на структурния ген, включен в рДНК молекулата.

Контролни елементи на експресията, които са използвани за регулиране експресията на оперативно свързана белтък кодираща последователност, са известни в тази област и включват, без да се ограничават до индуцируеми промотори, конститутивни промотори, секреционни сигнали и други регулаторни елементи. Предпочитно, индуцируемият промотор е пряко контролиран, като такъв, който е отговарящ спрямо хранителна съставка в средата на клетката гостоприемник.

В едно изпълнение, векторът съдържаща молекула кодираща нуклеинова киселина, ще включва прокариотен репликон, т.е. една ДНК последователност, притежаваща способността да насочва автономна репликация и поддръжка на рекомбинантната ДНК молекула, екстрахромозомна в прокариотна клетка гостоприемник, като бактериална клетка гостоприемник, трансформирана след това. Такива репликони са добре известни в тази област. В допълнение, вектори, които включват прокариотен репликон, могат също да включват един ген, чиято експресия придава откриваем маркер, като такъв за лекарствена резистентност. Типични бактериални гени за лекарствена резистентност, са такива, които придават резистентност спрямо ампицилин или тетрациклин.

Вектори, които включват прокариотен репликон, могат по-нататък да включват един прокариотен или бактериофаген промотор, способен да насочва експресията (транскрипция или трансляция) на кодиращите генни последователности в бактериална клетка гостоприемник, като *E.coli*. Един промотор е експресионен контролен елемент, образуван от една ДНК последователност, която позволява да се появи свързване на РНК полимераза и транскрипция.

Промоторни последователности съвместими с бактериални гостоприемници, обикновено се осигуряват в плазмидни вектори, съдържащи удобни рестрикционни места за инсерция (вмъкване) на ДНК сегмент от настоящето изобретение. Примери за такива векторни плаزمиди са pUC8, pUC9, pBR322 и pBR329 (Biorad Laboratories), pPL и pKK223 (Pharmacia). Може да бъде използван всеки подходящ прокариотен гостоприемник да експресира една рекомбинантна ДНК молекула, кодираща белтък на изобретението.

Експресионни вектори съвместими с еукариотни клетки, предпочитано такива съвместими с клетки от гръбначни, може също да бъдат използвани за формиране на рДНК молекули, които съдържат една кодираща последователност. Експресионни вектори на еукариотни клетки са добре известни в тази област и се предоставят от няколко търговски източници. Обикновено, такива вектори са предоставени, съдържащи удобни рестрикционни места за инсерция на желания ДНК сегмент. Примери за такива вектори са pSVL и pKSV-10 (Pharmacia), pBPV-1, pML2d (International Biotechnologies), pTDT1 (ATCC 31255) и подобните еукариотни експресионни вектори.

Еукариотни клетъчни експресионни вектори, използвани за конструиране на рДНК молекули на настоящето изобретение, могат по-нататък да включват селекционен маркер, който е ефективен в еукариотна клетка, предпочитано селекционен маркер за лекарствена резистентност. Един предпочитан маркер за лекарствена резистентност е генът, чиято експресия води до резистентност към неомизин, т.е. неомизин фосфотрансферазния (нео) ген. (Southern et al., (1982) J.Mol.Anal.Genet. 1, 327-341). Алтернативно, селектируемият маркер може да присъства върху отделен плазмид, двата вектора въведени чрез ко-трансфекция в клетката гостоприемник и

трансфектанти, избрани чрез култивиране в подходящо лекарство за селектируем маркер.

Е. Клетки гостоприемници, съдържащи екзогенно доставена молекула кодираща нуклеинова киселина

Настоящото изобретение по-нататък предоставя клетки гостоприемници, трансформирани с молекула нуклеинова киселина, която кодира белтък на настоящето изобретение. Клетката гостоприемник може да бъде прокариотна или еукариотна. Еукариотни клетки, приложими за експресия на белтък на настоящето изобретение не са ограничени, доколкото клетъчната линия е съвместима с методите на клетъчно култивиране и съвместима с развъждането на експресионния вектор и експресията на генния продукт. Предпочитани еукариотни клетки гостоприемници включват, но не се ограничават до, дрожди, насекоми и клетки от бозайници, предпочитано клетки от гръбначни, като такива от мишка, плъх, маймуна или човешка клетъчна линия. Примери за полезни еукариотни клетки гостоприемници включват Chinese hamster ovary (CHO) клетки, които се доставят от ATCC като CCL61, NIH Swiss mouse embryo cells NIH-3T3 (ембрионални клетки от швейцарска мишка NIH-3T3), достъпни от ATCC като CRL1658, бъбречни клетки от бебе хамстер (ВНК) и подобни еукариотни тъканни култури от клетъчни линии.

Трансформация на подходяща клетки гостоприемници с рДНК молекула на настоящето изобретение, е извършена с добре известни методи, които обикновено зависят от вида на използвания вектор и използваната система гостоприемник. По отношение на трансформация на прокариотни клетки гостоприемници, могат да бъдат използвани електропорация и методи за солево третиране (виж, 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). По отношение трансформация на клетки от гръбначни с вектори съдържащи рДНК, могат да бъдат използвани електропорация, методи за катионно липидно или солево третиране (виж, например Graham et al., (1973) Virology 52, 456-467; Wigler et al., (1979) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 76, 1373-1376).

Успешно трансформирани клетки, т.е. клетки, които съдържат рДНК молекули на настоящето изобретение, могат да бъдат идентифицирани с добре известни техники, включващи селекция на селектируем маркер. Например, клетки получени от въвеждане на една рДНК на настоящето изобретение могат да бъдат клонирани за произвеждане на единични колонии. Клетки от такива колонии могат да бъдат събрани, лизирани и тяхното ДНК съдържание да бъде изследвано за наличие на рДНК, като се използва метод, като такъв описан от Southern, (1975) J.Mol.Biol. 98, 503-517 или белтъците, получени от клетката тествани с имунологичен метод.

#### F. Получаване на рекомбинантни белтъци като се използва рДНК молекула

Настоящото изобретение по-нататък предоставя методи за произвеждане белтък на настоящето изобретение, като се използват молекули нуклеинова киселина, описани тук. Общо, получаването на рекомбинантна форма на белтък, обикновено включва следните етапи:

Първо, получава се молекула нуклеинова киселина, която кодира белтък на изобретението, като молекулата нуклеинова киселина представена в SEQ ID NO: 1, 3, 7, 9, 11, 13, 15, 17 или 19 или нуклеотиди 166-1584 на SEQ ID NO: 1 и нуклеотиди 178-1596 на

SEQ ID NO: 3. Ако кодиращата последователност е прекъсната от интрони, тя директно е подходяща за експресия в гостоприемника.

Молекулата нуклеинова киселина след това предпочитано е поставена в оперативна връзка с подходящи контролни последователности, както е описано по-горе, за формиране на експресионна единица, съдържаща белтъчната отворена рамка за четене. Експресионната единица е използвана да трансформира подходящ гостоприемник и трансформираният гостоприемник е култивиран в условия, които позволяват продукцията на рекомбинантния белтък. По избор, рекомбинантния белтък е изолиран от средата или от клетките; в някои случаи може да не е необходимо отделяне и пречистване на белтъка, където онечистванията могат да бъдат допустими.

Всеки от горните етапи може да бъде изпълнен по различни пътища. Например, желаните кодиращи последователности могат да бъдат получени от геномни фрагменти и направо да бъдат използвани в подходящи гостоприемници. Конструирването на експресионни вектори, които са опериращи в различни гостоприемници, е извършвано като са използвани подходящи репликони и контролни последователности, както са представени по-горе. Контролните последователности, експресионни вектори и методи за трансформация са зависими от типа на клетката гостоприемник, използвана да експресира гена и са обсъдени подробно по-рано. Подходящи рестрикционни места могат, ако нормално не са налице, да бъдат добавени към краищата на кодиращата последователност, така че да осигурят един ген, който може да бъде изрязан, да бъде вмъкнат в тези вектори. Специалистът в тази област може направо да адаптира всяка гостоприемник/експресионна система в тази област, за приложение с

молекули нуклеинова киселина на изобретението, за произвеждане на рекомбинантен белтък.

### С. Методи за идентифициране на свързващи участници

Настоящото изобретение предоставя методи за приложение при изолиране и идентифициране на свързващи участници на белтъци на изобретението. В някои изпълнения, белтък на изобретението се смесва с потенциален свързващ участник или екстракт, или фракция от клетка, в условия, които позволяват свързване на потенциални свързващи участници с белтъка на изобретението. След смесване, пептиди, полипептиди, белтъци и други молекули, които са станали асоциирани с белтък на изобретението, са отделени от сместа. Свързващият участник, свързан с белтък на изобретението след това може да бъде отделен и по-нататък анализиран. За идентифициране на изолирания свързващ се белтък, целият белтък, например целият Nogo рецепторен белтък на SEQ ID NO: 2 или 4 или целият Nogo белтък на SEQ ID NO:6 може да бъде използван. По избор може да бъде използван фрагмент от белтъка. Един пример за приложим Nogo рецепторен белтъчен фрагмент е разтворим Nogo рецепторен полипептид, който няма трансмембранен домен (Фигура 7).

Както тук е използвано, клетъчен екстракт се отнася за препарат или фракция, които са получени от лизирана или разрушена клетка. Предпочитан източник на клетъчни екстракти ще бъдат клетки, произхождащи от човешки мозък или гръбначен мозък, например човешка мозъчна тъкан. По избор, клетъчни екстракти могат да бъдат изготвени от всеки източник на нервна тъкан или неврални клетъчни линии, които са на разположение, по специално клетъчни линии от олигодендроцити.

Могат да бъдат използвани различни методи за получаване на екстракт от клетка. Клетки могат да бъдат разрушени с помощта на физични или химични методи за разрушаване. Примери за физични методи за разрушаване включват, но не се ограничават до, ултразвуково третиране и механично срязване. Примери за химичен лизис методи включват, но не се ограничават до детергентно лизиране и ензимен лизис. Специалистът в тази област може направо да адаптира методи за получаване на клетъчни екстракти, за да получи екстракти за приложение при наличните методи.

След като екстрактът е получен, екстрактът се смесва с белтък на изобретението в условия, при които може да се осъществи асоцииране на белтъка със свързващия участник. Могат да бъдат използвани различни условия, най-предпочитани условия са тези, които плътно наподобяват условията в цитоплазмата на човешка клетка. Използвани особености като осмоларитет, рН, температура и концентрация на клетъчния екстракт, могат да варират за да се оптимизира свързването на белтъка със свързващия участник.

След смесване при подходящи условия, свързаният комплекс е отделян от сместа. Могат да бъдат използвани различни техники за разделяне на сместа. Например, антитела специфични за белтъка на изобретението могат да бъдат използвани да имунопреципитират комплекса на свързващия участник. По избор, могат да бъдат използвани стандартни техники за разделяне, като хроматография и центрофугиране в плътностен градиент.

След отстраняване на не-свързаните клетъчни съставки, които се откриват в екстракта, свързващият участник може да бъде дисоцииран от комплекса, използвайки конвенционални методи. Например, дисоциация може да бъде извършена с променяне на солевата концентрация или рН на сместа.

За да се подпомогне отделянето на асоциираните чифтове свързващи участници от смесения екстракт, белтъкът на изобретението може да бъде имобилизиран върху твърда подложка. Например, белтъкът може да бъде прикачен към нитроцелулозен матрикс или акрилови зърна. Прикачването на белтъка към твърда подложка допринася при отделяне на чифтове пептид-свързващи участници от други съставки, които се намират в екстракта. Идентифицираните свързващи участници могат да бъдат единичен белтък или комплекс от два или повече белтъци. По избор, свързващи участници могат да бъдат идентифицирани като се използва тест за фузия на алкална фосфатаза, съгласно процедурите на Flanagan & Vanderhaeghen, (1998) *Annu.Rev.Neurosci.* 21, 309-345 или Takahashi et al., (1999) *Cell* 99, 59-69; тестът на Far-Western съгласно процедурите на Takayama et al., (1997) *Methods Mol.Biol.* 69, 171-184 или Dauder et al. *J.Gen.Virol.*(1996) 77, 991-996 или са идентифицирани с употребата на епитоп tagged белтъци или GST слети белтъци.

По избор, молекулите нуклеинова киселина на изобретението, могат да бъдат използвани при дрождена дву-хибридна система. Дрождената дву-хибридна система може да бъде използвана за идентифициране на други двойки участници, може да бъде пряко адаптирана за използване молекулите нуклеинови киселини, описани тук (виж Stratagene Hybrizap® дву-хибридна система).

#### Н. Методи за идентифициране агенти, които модулират експресия

Настоящото изобретение предоставя методи за идентифициране агенти, които модулират експресията на нуклеинова киселина, кодираща Nogo рецепторен белтък. Настоящото

изобретение предоставя също методи за идентифициране агенти, които модулират експресията на нуклеинова киселина кодираща Nogo белтъка. Такива тестове могат да използват всякакви средства, които са на разположение за мониториране прояви в нивото на експресията на нуклеинова киселина на изобретението, например нуклеинова киселина кодираща белтък, притежаващ последователността на SEQ ID NO: 2, 4 или 6, ако тя е способна да регулира положително или отрицателно експресията на нуклеиновата киселина в дадена клетка.

Във формата на един тест, могат да бъдат получени клетъчни линии, които съдържат сливания на репортерни гени между отворената рамка за четене, определена от нуклеотиди 166-1584 на SEQ ID NO: 1, или нуклеотиди 178-1596 на SEQ ID NO: 3, или нуклеотиди 135-3713 на SEQ ID NO: и може да бъде изготвен всякакъв слет участник, който може да бъде тестиран. Известни са многобройни слети участници, които могат да бъдат тестирани и те са пряко достъпни, включително луциферазен ген от светулки и генът, кодиращ хлорамфеникол ацетилтрансфераза (Alam et al., (1990) Anal. Biochem. 188, 245-254). Клетъчни линии съдържащи сливания на репортерен ген, след това са излагани на агента, който ще бъде тестиран, в подходящи условия и време. Диференциална експресия на репортерния ген между проби изложени на агента и контролни проби, идентифицира агенти, които модулират експресията на нуклеинова киселина кодираща белтъка, притежаващ последователността на SEQ ID NO: 2, 4 или 6.

Допълнителни тест формати могат да бъдат използвани за мониториране способността на агента да модулира експресията на нуклеинова киселина, кодираща Nogo рецепторен белтък на изобретението, като белтъка притежаващ аминокиселинната последователност на SEQ ID NO: 2 или 4 или Nogo белтък,

притежаващ аминокиселинната последователност на SEQ ID NO: 6. Например, мРНК експресия може да бъде мониторирана директно чрез хибридизация на нуклеинови киселини на изобретението. Клетъчни линии са излагани на действието на тестируания агент в подходящи условия и време и е изолирана тотална РНК и мРНК със стандартни процедури, като тези представени в Sambrook et al., (1989) *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Сонди за откриване разлики в нивата на експресия на РНК между клетки излагани на агента и контролни клетки, могат да бъдат получени от нуклеиновите киселини на изобретението. Предпочита се, но не е обезателно, да се планират сонди, които хибридизират само с прицелни нуклеинови киселини в условия на висока строгост. Само високо комплементарни хибриди на нуклеинови киселини се образуват в условия на висока строгост. Съответно, строгостта на условията на тестиране, определя количеството комплементарност, което би съществувало между две вериги нуклеинови киселини за да се образува хибрид. Трябва да бъде подбрана строгост за максимизиране разликата в стабилността между сонда:прицелен хибрид и потенциално сонда:не-прицелни хибриди.

Могат да бъдат планирани сонди от нуклеиновите киселини на изобретението с помощта на методи известни в тази област. Например, G+C съдържанието на сондата и дължината на сондата може да повлияе свързването на сондата с нейната прицелна последователност. Методи за оптимизиране специфичността на сондата обикновено са на разположение в Sambrook et al., (1989) *Molecular Cloning – A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press or Ausubel et al., (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing.

Условията на хибридизация са модифицирани като са използвани методи, като тези описани в Sambrook et al., (1989) и Ausubel et al., (1995) както се изисква за всяка сонда. Хибридизация на тотална клетъчна РНК или РНК обогатена на полиА-РНК може да бъде изпълнена във всякакъв формат, който е на разположение. Например, тотална клетъчна РНК или РНК обогатена на полиА-РНК, може да бъде прикрепена към твърда подложка и твърдата подложка да бъде изложена на най-малко една сонда, съдържаща най-малко една, или част от една от последователностите на изобретението, в условия, в които сондата специфично ще хибридира. По избор, фрагменти от нуклеинова киселина, съдържащи най-малко една или част от една от последователностите на изобретението, може да бъдат прикрепени към твърда подложка, като силиконова пластинка или пластинка от порьозно стъкло. След това пластинката може да бъде изложена на тотална клетъчна РНК или поли А+РНК от проба, в условия, при които прикрепените последователности специфично ще хибридизират. Такива пластинки и методи за хибридизация са широко достъпни, например, такива представени от Beattie, (1995) WO9511755. Изпитвайки способността на дадена сонда специфично да хибридира с РНК проба от една нетретирана клетъчна популация и от клетъчна популация излагана на агент, са идентифицирани агенти, които регулират възходящо или низходящо експресията на нуклеинова киселина, кодираща Nogo рецепторния белтък, притежаващ последователността на SEQ ID NO: 2 или 4 .

Може да бъде проведена хибридизация за качествен или количествен анализ на мРНК, като се използва тест за рибонуклеазно протектиране (RNase protection assay) (т.е. RPA, виж Ma et al., Methods (1996) 10, 273-238). Накратко, средство за експресия, съдържащо кДНК, кодираща генния продукт и фагов промотор специфичен за ДНК-зависима РНК полимераза (например,



T7, T3 или SP6 РНК полимераза) е линейризирано при 3' края на кДНК молекулата, след фаговия промотор, където такава линейризирана молекула, впоследствие е използвана като матрица за синтеза на белязан антисенз транскрипт на кДНК с *in vitro* транскрипция. След това белязаният транскрипт е хибридиран със смес от изолирана РНК (т.е. тотална или фракционирана мРНК) чрез инкубиране на 45°C за една нощ в буфер съдържащ 80% формалдехид, 40 mM Pipes, pH 6.4, 0.4 M NaCl и 1mM EDTA. Получените хибриди след това са хидролизирани в буфер съдържащ 40 µg/ml рибонуклеаза А и 2µg/ml рибонуклеаза. След деактивиране и екстрахиране на белтъците, които могат да бъдат екстрахирани, пробите са нанасяни върху урея-полиакриламидни гелове за анализ.

В друг тест формат, агенти, които повлияват експресията на непосредствени генни продукти, клетки или клетъчни линии, трябва най-напред да бъдат идентифицирани, кой физиологично експресира споменатите генни продукти. Клетки и клетъчни линии така идентифицирани, може да се очаква да съдържат необходимата клетъчна машинария, така че точността на модулация на транскрипционния материал е подържана по отношение экзогенния контакт на агента с подходящи повърхностни механизми на предаване и цитозолните каскади. По-нататък, такива клетки или клетъчни линии могат да бъдат трансдуцирани или трансфектирани с експресионно средство (например, плазмид или вирусен вектор) конструктор, включващ един опериращ не-транслиран 5'-промотор съдържащ край на структурния ген, кодиращ непосредствените генни продукти, слети с един или повече антигенни фрагменти, които са специфични за непосредствените генни продукти, където споменатите фрагменти са под транскрипционния контрол на споменатия промотор и са експресирани като полипептиди, чието молекулно тегло може да бъде различно от естествено срещащите се полипептиди, или може

по-нататък да съдържа имунологично определен tag. Такъв процес е добре известен в тази област (виж, Sambrook et al., (1989) Molecular Cloning – A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Клетки или клетъчни линии, трансдуцирани или трансфектирани както е подчертано по-горе, след това могат да бъдат поставени в контакт с агенти при подходящи условия; например, агент съдържащ фармацевтично приемлив ексципиент и е поставен в контакт с клетки във воден физиологичен буфер, като фосфатно буфериран физиологичен разтвор (PBS) при физиологично pH, Eagles balanced salt solution (BSS) (балансиран солеви разтвор на Eagles) при физиологично pH, PBS или BSS, съдържащи серум или кондиционирана среда съдържаща PBS или BSS и серум, инкубирани на 37°C. Споменатите условия могат да бъдат модулирани ако се счита за необходимо от специалиста в тази област. След поставянето в контакт на клетките с агента, споменатите клетки ще бъдат разрушени и полипептидите от разрушената маса са фракционирани, така че дадена полипептидна фракция е обединявана и поставяна в контакт с анти тяло, за да бъде по-нататък последващо процесирана с имунологичен тест (например, ELISA, имунопреципитация или Western blot). Пулът от белтъци, изолирани от "агент контактуваната" проба се сравнява с контролна проба, където само ексципиентът е бил в контакт с клетките и повишение или отслабване на имунологично генерирания сигнал от "агент контактуваната" проба, сравнено с контролата, ще бъде използвано за разграничаване ефективността на агента.

#### I. Методи за идентифициране агенти, които модулират активността

Настоящото изобретение предоставя методи за идентифициране агенти, които модулират поне една активност на

Nogo рецепторен белтък. Изобретението предоставя също методи за идентифициране агенти, които модулират най-малко една активност на Nogo белтък. Такива методи или тестове могат да използват всякакви средства за мониториране или откриване на желаната активност.

В един формат, може да бъде изследвана специфичната активност на Nogo рецепторния белтък или Nogo белтък, нормализирана спрямо стандартна единица, между клетъчна популация, която е била излагана на агента, да бъде тестирана в сравнение с не-излагана клетъчна популация. Клетъчни линии или популации са излагани на действието на агента, за да бъдат тествани при подходящи условия и време. Клетъчни лизати могат да бъдат изготвени от излагана клетъчна линия или популация и контрола, не-излагана клетъчна линия или популация. След това клетъчните лизати са анализирани със сондата.

Антитяло сонди могат да бъдат изготвени чрез имунизирание на подходящи бозайници гостоприемници, като се прилагат подходящи имунизационни протоколи, използващи Nogo рецепторен белтък, Nogo белтък, Nogo рецепторни пептидни агенти или антиген-съдържащи фрагменти от всеки от горните. За повишение на имуногенността, тези белтъци или фрагменти могат да бъдат конюгирани с подходящи носители. Методи за получаване на имуногенни конюгати с носители, като BSA, KLH или други носители белтъци, са добре известни в тази област. В известни условия, директно конюгиране може да бъде ефективно, като се използват, например, карбодиимидни реагенти; в други случаи свързващи реагенти, като тези доставяни от Pierce Chemical Co., могат да бъдат желани за осигуряване достъпност до хаптена. Хаптен пептидите могат да бъдат удължени от двата amino или карбокси- краища с цистеинов остатък или да бъдат разпръснати помежду с цистеинови

остатъци, например, за улесняване свързване с носител. Въвеждане на имуногените е извършвано общо с инжектиране за подходящ период от време и с помощта на подходящи адюванти, както общо е прието в тази област. По време на имунизационната схема, са определяни титрите на антителата за определяне адекватността на антияло образуването.

Докато поликлоналните антисеруми получени по този начин могат да бъдат задоволителни за известни приложения, за фармацевтични препарати, се предпочита употребата на моноклонални препарати. Могат да бъдат изготвени обезсмъртени клетъчни линии, които секретират желаните моноклонални антитела, като се използват стандартни методи, виж например, Kohler & Milstein, (1992) *Biotechnology* 24, 524-526 или модификации, които водят до обезсмъртяване на лимфоцити или клетки от слезка, както е общо известно. Обезсмъртените клетъчни линии секретират желаните антитела, могат да бъдат скринирани чрез имунотест, при който антигенът е пептиден хаптен, полипептид или белтък. Когато подходящата обезсмъртена клетъчна култура, секретират желаното антияло е идентифицирана, клетките могат да бъдат култивирани *in vitro* или чрез произвеждане на асцитна течност.

Желаните антитела могат да бъдат получени от надстоящата течност на културата или от асцитната надстояща течност. Интактните анти-Nogo или анти-Nogo рецепторни антитела или техни фрагменти, които съдържат имунологично значима част, могат да бъдат използвани като например, антагонисти на свързване между Nogo (лиганд) и Nogo рецептор. Ползуването на имунологично реактивни фрагменти, като Fab, Fab' на F(ab')<sub>2</sub> фрагменти често е предпочитано, по-специално в терапевтичен контекст, тъй като тези фрагменти общо са по-малко имуногенни отколкото целия имуноглобулин.

Антителата или фрагменти могат също да бъдат произведени, като се използва текуща технология, с рекомбинантни средства. Антитяло области, които специфично се свързват с желани области на белтъка, могат също да бъдат произведени в контекста на химери с произход от множество видове.

Антитяло области, които специфично се свързват с желани области на белтъка, могат също да бъдат получени в контекста на химери с произход от множество видове, например, хуманизирани антитела. Антитялото може следователно да бъде хуманизирано антитяло или човешко антитяло, както е описано в U.S. Patent 5,585,089 или Riechmann et al., (1988) Nature 323, 323-327.

Агенти, които са тествани с горния метод могат произволно да бъдат подбрани или рационално селектирани или планирани. Както тук е използвано, за един агент се казва, че е произволно подбран, когато агентът е избран произволно без да са разглеждани специфичните последователности, участващи в асоциацията на белтъка на изобретението самостоятелно или с неговите асоциирани субстрати, свързващи участници и т.н. Пример за произволно подбрани агенти е използването на химична библиотека или пептидна комбинаторна библиотека, или хранителен бульон на даден организъм.

Както тук е използвано, един агент се казва, че е рационално подбран или планиран, когато агентът е избран на непроизволна основа, която взема предвид последователността на прицелното място или неговата конформация във връзка с действието на агента. Агенти могат рационално да бъдат подбрани или рационално планирани чрез използване на пептидни последователности, които правят тези места. Например, рационално подбран пептиден агент може да бъде пептид, чиято аминокиселинна последователност е идентична със свързващия домен (SEQ ID NO:

20) на Nogo, който взаимодействува с Nogo рецептор. По избор, това може да бъде фрагмент от свързващия домен, например, SEQ ID NO: 8, 10, 12, 14, 16 и 18.

Агентите на настоящето изобретение могат да бъдат, например, пептиди, антитела, антитяло фрагменти, малки молекули, производни на витамини както и въглехидрати. Пептидни агенти на изобретението могат да бъдат получени като се използва стандартна твърда фаза (или фаза разтвор) пептидни методи за синтеза, каквито са известни в тази област. В допълнение, ДНК кодираща тези пептиди може да бъде синтезирана като се използват търговски достъпен инструментариум за олигонуклеотидна синтеза и рекомбинантно получени, използвайки стандартни системи за рекомбинантно произвеждане. Производството използващо твърдо фазова пептидна синтеза се налага ако ще бъдат включени не-генно-кодирани аминокиселини.

Друг клас агенти на настоящето изобретение са антитела или техни фрагменти, които се свързват с Nogo белтък или Nogo рецепторен белтък. Могат да бъдат получени антитяло агенти чрез имунизация на подходящи бозайници като обекти, с пептиди, съдържащи антигенни области, такива части от белтъка предвидени да бъдат прицелни за антителата.

#### J. Тестове с висока пропускливост

Мощността на скрининг с висока пропускливост е използвана за търсене на нови съединения, които са способни да взаимодействуват с Nogo рецепторния белтък. Като обща информация за скрининг с висока пропускливост (например, Devlin, (1998) High Throughput Screening, Marcel Dekker; U.S. Patent 5,763,263). Тестове с висока пропускливост използват една или повече различни техники за тестиране.

Имунодиагностики и имунотестове. Това са група техники, използвани за измерване на специфични биохимични вещества, обикновено в ниски концентрации в комплексни смеси, като биологични течности, което зависи от специфичността и високия афинитет, показан с подходящо изготвени и подбрани антитела за техните комплементарни антигени. Едно вещество, което ще бъде измервано, трябва неизбежно да бъде антигенно – или една имуногенна макромолекула, или хаптенова малка молекула. Към всяка проба е добавено известно, ограничено количество специфично антитяло и фракцията на антигена, която се комбинира с него, често експресирана като отношението свързано:свободно, е определена, използвайки като индикатор една форма от антигена, свързан с радиоизотоп (радиоимуно тест), флуоресцентна молекула (флуороимуно тест), стабилен свободен радикал (спин имуно тест), ензим (ензимен имуно тест) или друг директно различим белег.

Антитела могат да бъдат белязани по различни начини, включително: ензимно-свързан имуно сорбентен тест (ELISA); радиоимуно тест (RIA); флуоресцентен имуно тест (FIA), хемилуминисцентен тест (CLIA); и бележени на антитялото с колоидални златни частици (имунозолд).

Общи формати тестове включват сандвичов тест, компетитивен или конкурентен тест, латексов аглутинационен тест, хомогенен тест, микротитрационна платка формат и тест на базата на микрочастици.

Ензимно свързан имуносорбетен тест (ELISA). ELISA е имунохимична техника, която избягва опасностите на радиохимическите съединения и скъпите флуоресцентни системи за откриване. Вместо това, тестът използва ензими като индикатори. ELISA е форма на количествен имуно тест базиран на приложението на антитела (или антигени), които са свързани с повърхност на

неразтворим носител, който след това е използван да "захване" съответния антиген (или антитяло) в тестируения разтвор. Антиген-антитяло комплексът след това се открива чрез измерване активността на подходящ ензим, който предварително е ковалентно прикачен за антигена (или антитялото).

За информация върху ELISA техники, виж, например Crowther, (1999) 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.

Колориметрични методи за ензими. Колориметрия е всеки метод за количествен химичен анализ, при който концентрацията или количеството на дадено съединение се определя чрез сравнение оцветяването получено от реакция на един реагент със стандартни и тестирани количества от съединението, например, използвайки колориметър или спектрофотометър.

Стандартни колориметрични тестове за бета-галактозидазна ензимна активност, са добре известни на специалиста в тази област (виж, например Norton et al., (1985) Mol.Cell.Biol. 5, 281-290). Един колориметричен метод може да бъде изпълнен с лизати от цели клетки, използвайки О-нитрофенил-бета-D-галактопиранозид (ONPG, Sigma) като субстрат и стандартен колориметричен бета-галактозидазен тест (Sambrook et al., (1989) Molecular Cloning – A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Автоматизирани колориметрични тестове също са на разположение за определяне на бета-галактозидазна активност (виж, например U.S. Patent 5,733,720).



Имунофлуоресцентни тестове. Имунофлуоресценция или имунофлуоресцентна микроскопия е техника, при която един антиген или антитяло е направен флуоресцентен чрез конюгиране с флуоресцентно багрило и след това е оставен да реагира с комплементарно антитяло или антиген в тъканен срез или натривка. Локализацията на антигена или антитялото може след това да бъде определена чрез наблюдение флуоресценцията с микроскоп при ултравиолетова светлина.

За обща информация върху имунофлуоресцентни техники, виж 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. За подробни обяснения на имунофлуоресцентните техники, приложими за настоящето изобретение, виж U.S. Patent 5,912,176; U.S. Patent 5,869,264; U.S. Patent 5,866,319; и U.S. Patent 5,861,259.

#### К. Употреба на агенти, които модулират активност

Както е представено в Примерите, Nogo и Nogo рецепторни белтъци и нуклеинови киселини, такива като белтъците притежаващи аминокиселинната последователност на SEQ ID NO:2, 4 или 6, са експресирани в миелин, произхождащ от аксон и дендрити. Агенти, които модулират или регулират възходящо или низходящо експресията на Nogo или Nogo рецепторен белтък, или агенти като агонисти или антагонисти с най-малко една активност за Nogo или Nogo рецепторен белтък, могат да бъдат използвани за модулиране биологични и патологични процеси, свързани с функцията и

активността на белтъка. Изобретението е особено полезно за лечение на хора.

Патологични процеси се отнасят към тази категория биологични процеси, които предизвикват увреждащ ефект. Например, експресия на белтък на изобретението може да бъде свързана с инхибиране на аксонална регенерация след черепна, мозъчна или гръбначно мозъчна травма, инсулт или демиелинизиращо заболяване. Такива демиелинизиращи заболявания включват, но не се ограничават до, множествена склероза, монофазна демиелинизация, енцефаломиеелит, мултифокална левкоенцефалопатия, паненцефалит, болест на Marchiafava-Bignami, понтина миелинолиза, адренолевкодистрофия, болест на Pelizaeus-Merzbacher, спонгиозна дегенерация, болест на Alexander, болест на Canavan, метакроматчна левкодистрофия и болест на Krabbe. Както тук е използвано, един агент се казва, че модулира патологичен процес, когато агентът редуцира степента или тежестта на процеса. Например, демиелинизиращо заболяване може да бъде предотвратено или да бъде модулирано прогресирането му, чрез въвеждане на агенти, които редуцират, стимулират или модулират някакъв път на експресията, или поне активността на белтък на изобретението.

В един пример, въвеждане на Nogo пептидни агенти, представени в SEQ ID NO: 8, 10, 12, 14, 16, 18 и 20, може да бъде приложено за лечение на демиелинизиращо заболяване, свързано с Nogo или Nogo рецепторен белтък. В друг пример, клетки които експресират пептидните агенти на изобретението, могат да бъдат трансплантирани на място с увреждане в гръбначния мозък, за улесняване аксоналния растеж в увреденото място. Такива трансплантирани клетки биха предоставили средства за

възстановяване функцията на гръбначния мозък, след увреждане или травма.

В друг пример, въвеждане на разтворим Nogo рецепторен белтък, който се свързва с Nogo, може да бъде прилаган за лечение на демиелинизиращо заболяване, свързано с Nogo или Nogo рецепторния белтък. Този агент може да бъде използван за предотвратяване свързването на Nogo със свързания с клетъчната стена Nogo рецептор и да действа като антагонист на Nogo. Разтворими рецептори са използвани да свързват цитокини или други лиганди, за да регулират техната функция (Thomson, (1998) Cytokine Handbook, Academic Press). Разтворим рецептор се появява в разтвор или извън мембраната. Разтворими рецептори могат да се появят поради това, че сегментът от молекулата, която се разпростира или асоциира с мембраната отсъства. Този сегмент обикновено се определя от специалистите в тази област, като трансмембранен домен на гена, или мембранен свързващ сегмент на белтъка. Така, в някои изпълнения на изобретението, един разтворим рецептор включва един фрагмент или аналог на мембранно свързан рецептор. Предпочитано, фрагментът съдържа най-малко шест, например десет, двадесет, двадесет и пет, тридесет, четиридесет, шестдесет или седемдесет аминокиселини, осигуряващи той да запази неговата желана активност.

В други изпълнения на изобретението, структурата на сегмента, която се свързва с мембраната, е модифицирана (например, полиморфизъм на ДНК последователността или мутация в гена), така че рецепторът не е вмъкнат чрез инсерция в мембраната, или рецепторът е вмъкнат, но не е задържан в рамките на мембраната. Така, един разтворим рецептор, за разлика от съответната мембранно свързана форма, се различава по един или

повече сегменти на гена или рецепторния белтък, които са важни за неговото асоцииране с мембраната.

Агентите на настоящето изобретение могат да бъдат предоставени самостоятелно, или в комбинация, или в последователна комбинация с други агенти, които модулират даден патологичен процес. Например, един агент на настоящето изобретение, може да бъде въведен в комбинация с противовъзпалителни агенти, след инсулт, като средство за блокиране по нататъшно невронално увреждане и инхибиране на аксоналната регенерация. Както тук е използвано, два агента се казва, че се въвеждат в комбинация, когато двата агента са въведени едновременно или са въведени независимо, по начин, така че агентите да действуват по едно и също време.

Агентите на настоящето изобретение могат да бъдат въвеждани парентерално, подкожно, интравенозно, интрамускулно, интраперитонеално, трансдермално или букално. Например, един агент може да бъде въвеждан локално на мястото на увреждането чрез микроинфузия. Типични места включват, но не се ограничават до, увредени области на гръбначния мозък, които са резултат от нараняване или увредени места в мозъка като следствие от инсулт. По избор, или конкурентно, въвеждането може да бъде орално. Въвежданата дозировка ще зависи от възрастта, здравословното състояние и телото на реципиента, вида на конкурентно третиране ако има такова, честота на третиране и природата на желанния ефект.

Настоящото изобретение по-нататък предоставя препарати съдържащи един или повече агенти, които модулират експресията или поне една активност на белтъка на изобретението. Докато индивидуалните нужди варират, определянето на оптималните граници на ефективни количества от всеки компонент са във преценката на специалиста в тази област. Типични дозировки

включват 1 pg/kg до 100 mg/kg телесно тегло. Предпочитаните дозировки за системно въвеждане включват 100 ng/kg до 100mg/kg телесно тегло. Предпочитаните дозировки за директно въвеждане на място чрез микроинфузия, включват 1ng/kg до 1µg/kg телесно тегло.

В допълнение към фармакологично активния агент, препаратите на настоящето изобретение, могат да съдържат подходящи фармацевтично приемливи носители, съдържащи ексципиенти или спомагателни вещества, които улесняват обработката на активните съединения в препарати, които могат да бъдат използвани фармацевтично за осигуряване на мястото на действие. Подходящи комбинации за парентерално въвеждане включват водни разтвори на активните съединения във водно разтворима форма, например, водно разтворими соли. В допълнение, могат да бъдат въведени суспензии на активните съединения като подходящи маслени инжекционни суспензии. Подходящи липофилни разтворители или вехикулуми включват мастни масла, например сусамово масло или синтетични мастно киселинни естери, например, етил олеат или триглицериди. Водни инжекционни суспензии могат да съдържат вещества, които повишават вискозитета на суспензията и включват, например натриева карбоксиметил целулоза, сорбитол и декстран. По избор, суспензията може да съдържа също стабилизатори. Липозоми могат също да бъдат използвани за капсулиране на агента, за предоставяне в клетката.

Фармацевтичната комбинация за системно въвеждане, съгласно изобретението, може да бъде комбинирана за ентерално, парентерално или топично въвеждане. Наистина, всички три типове комбинации могат да бъдат прилагани едновременно за постигане системно въвеждане на активната съставка. Подходящи комбинации за орално въвеждане включват твърди или меки желатинови капсули,

пилюли, таблетки, включително филм-таблетки, елексири, суспензии, сиропи или инхалации и техни форми с контролирано освобождаване.

При използване методите на изобретението, агентите на това изобретение могат да бъдат прилагани самостоятелно или в комбинация, или в комбинация с други терапевтични или диагностични агенти. В някои предпочитани изпълнения, съединенията на това изобретение мога да бъдат прилагани заедно с други съединения, обикновено предписвани за тези състояния, съгласно общоприетата медицинска практика, такива като противо-възпалителни агенти, антикоагуланти, антитромботични, включително инхибитори на тромбоцитната агрегация, активатори на тъканния плазминоген, урокиназа, проурокиназа, стрептокиназа, аспирин и хепарин. Съединенията на това изобретение могат да бъдат използвани *in vivo*, обикновено при бозайници, като хора, овце, коне, говеда, прасета, кучета, котки, плъхове и мишки или *in vitro*.

#### L. Пептидни миметици

Това изобретение включва също пептидни миметици, които наподобяват три-димензионалната структура на Nogo и блок Nogo свързване при Nogo рецептора. Такива пептидни миметици могат да имат значими предимства пред естествено срещащите се пептиди, включително, например: по-икономично производство, по-голяма химична стабилност, повишени фармакологични свойства (полу-живот, абсорбция, потентност, ефикасност и т.н.) променена специфичност (например, широк спектър биологични активности), намалена антигенност и други.

При една форма, миметици са пептид-съдържащи молекули, които наподобяват елементи на белтъчната вторична структура (виж, например, Johnson et al., (1993) Peptide Turn Mimetics, in Biotechnology and Pharmacy, Pezzuto et al., (editors) Chapman and Hall). Основната

причина за приложението на пептидни миметици е, че пептидната основна верига на белтъците съществува главно да ориентира аминокиселинните странични вериги по такъв начин, че да улесняват молекулните взаимодействия, като такива на антитяло и антиген. Един пептиден миметик се очаква да позволява молекулни взаимодействия, сходни на природната молекула.

В друга форма, пептидни аналози обичайно са използвани във фармацевтичната индустрия като не-пептидни лекарства със свойства аналогични на тези на матричния пептид. Тези типове не-пептидни съединения също са означени като "пептидни миметици" или "пептидомиметици" (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, които тук са включени чрез цитат) и обикновено са създадени с помощта на компютерно молекулно моделиране.

Пептидни миметици, които структурно са сходни с терапевтично използвани пептиди, могат да бъдат използвани за получаване на еквивалентен терапевтичен или профилактичен ефект. Общо, пептидни миметици са структурно сходни с един парадигма полипептид (т.е. полипептид, който има биохимично свойство или фармакологична активност), като извънклетъчния домен на Nogo, но има една или повече пептидни връзки по избор заменени с една връзка, подбрана от групата състояща се от:  $-\text{CH}_2\text{NH}-$ ,  $-\text{CH}_2\text{S}-$ ,  $\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ ,  $-\text{CH}=\text{CH}$  (цис и транс),  $-\text{COCH}_2-$ ,  $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$  и  $-\text{CH}_2\text{SO}-$ , с методи известни в тази област и по-нататък описани в следните цитати; Weinstein, (1983) *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins*, Marcel Dekker, Morley, (1980) *Trends Pharmacol. Sci.* 1, 463-468 (general review); 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 (-CH-CH-, цис и транс); Almquist et al., (1980) J.Med.Chem. 23, 1392-1398 (-COCH<sub>2</sub>-); Jennings-White et al., (1982) Tetrahedron Lett. 23, 2533 (-COCH<sub>2</sub>-); Holladay et al., (1983) Tetrahedron Lett. 24, 4401-4404 (-C(OH)CH<sub>2</sub>-); и Hruby, (1982) Life Sci. 31, 189-199 (-CH<sub>2</sub>S-); всяка, от които тук е включена чрез цитат.

Белязането на пептидни миметици обикновено включва ковалентно прикачване на един или повече белези, директно или чрез спейсер (например, една аминокиселинна група), за една не-интерферираща позиция(и) върху пептидния миметик, които са предвидени от количествени данни за структура-активност и молекулно моделиране. Такива не-интерфериращи позиции общо са позиции, които не формират директни контакти с макромолекулата(те) (например, не са контактни пунктове в Nogo-Nogo рецепторните комплекси), за които пептидният миметик се свързва за да произведе терапевтичния ефект. Дериватизация (например белязване) на пептидни миметици не трябва съществено да интерферира със желаната биологична или фармакологична активност на пептидния миметик.

Nogo пептидни миметици могат да бъдат конструирани чрез базиращ се на структура лекарствен дизайн, чрез заместване на аминокиселини с органични части (виж, например, Hughes, (1980) Philos.Trans.R.Soc.Lond. 290, 387-394; Hodgson, (1991) Biotechnol. 9, 19-21; Suckling, (1991) Sci.Prog. 75, 323-359).

Употребата на пептидни миметици може да се повиши, чрез прилагането на комбинаториална химия за създаване на лекарствени библиотеки. Дизайнът на пептидни миметици може да бъде подпомогнат чрез идентифициране на аминокиселинни мутации, които повишават или намаляват свързването на Nogo при Nogo рецептора. Подходи, които могат да бъдат прилагани, включват дрожения дву-хибриден метод (виж, Chien et al., (1991)



Proc.Natl.Acad.Sci. USA 88, 9578-9582) и използване метода на фагов дисплей. Дву-хибридният метод открива белтък-белтък взаимодействия при дрожди (Fields et al., (1989) Nature 340, 245-246). Методът фагов дисплей открива взаимодействие между един имобилизиран белтък и белтък, който е експресиран по повърхността на фаги, като ламбда и M13 (Amberg et al., (1993) Strategies 6, 2-4; Hogrefe et al., (1993) Gene 128, 119-126). Тези методи позволяват положителна или отрицателна селекция за белтък-белтък взаимодействия и идентифицирането на последователностите, които определят тези взаимодействия.

За обща информация върху пептидна синтеза и пептидни миметици, виж, например Jones, (1992) Amino Acid and Peptide Synthesis, Oxford University Press; Jung, (1997) Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries: A Handbook, John Wiley; Bodansky et al., (1993) Peptide Chemistry – A Practical Textbook, Springer Verlag.

#### М. Трансгенни животни

Терминът “животно” както е използван тук, включва всички гръбначни животни, с изключение на хора. Той включва също индивидуално животно във всички етапи на развитие, включително ембрионални и фетални стадии. “Трансгенно животно” е животно съдържащо една или повече клетки, носещи генетична информация получена директно или индиректно, чрез преднамерена генетична манипулация на субклетъчно ниво, като микроинжекция или инфекция с рекомбинантен вирус. Тази въведена ДНК молекула може да бъде интегрирана вътре в хромозомата, или тя може да бъде екстра-хромозомна реплицираща ДНК. Терминът “зародишна клетка-линия трансгенно животно” се отнася за трансгенно животно, на което генетичната информация е въведена в една зародишна линия клетка, при което придава способността да пренася информация на

потомство. Ако такова потомство фактически притежава някаква или цялата тази информация, тогава те също са трансгенни животни. В изобретението са обхванати трансгенни животни съдържащи мутантни, knock-out, модифицирани гени или генни конструкти, които да свръх-експресират или условно експресират ген, съответстващ на кДНК последователностите на SEQ ID NO: 1 или 3 или свързани последователности.

Информацията може да бъде чужда на видовете животни, към които принадлежи реципиента, чужда само на даден индивидуален реципиент или генетична информация, която вече е притежавана от реципиента. В последния случай, въведеният ген може да бъде различно експесиран в сравнение с нативния ендогенен ген. Гените могат да бъдат получени чрез изолирането им от генетични източници, чрез получаване на кДНК от изолирани РНК матрици, чрез насочена синтеза, или чрез тяхна комбинация.

За да бъде експесиран, един ген трябва да бъде оперативно свързан с регулаторна област. Регулаторни области, като промотори, могат да бъдат използвани да повишат, да намалят, регулират или посочат известни тъкани или известни етапи от развитието експресията на един ген. Промоторът не е необходимо да бъде природно срещаща се промотор. "Трансгенните не-човешки животни" на изобретението са произведени чрез въвеждане "трансгени" в зародишната линия на животно, което не е човек. Методите, които правят възможно въвеждането на ДНК в клетки са общо достъпни и добре известни в тази област. Могат да бъдат използвани различни методи за въвеждане на трансгени. Общо, зиготата е най-добрия таргет (прицелно място) за микроинжекция. При мишката, мъжкият пронуклеус достига размер от приблизително двадесет микрона в диаметър, което позволява възпроизводимо инжектиране на един до два пиколитра ДНК разтвор. Употребата на

зиготи като прицелно място за генен пренос има голямо предимство. В повечето случаи, инжектираната ДНК ще се включи в гена на гостоприемника преди първото разцепване (Birnstler et al., (1985) Proc.Natl.Acad.Sci. USA 82, 4438-4442). Следователно, почти всички клетки на трансгенното животно, което не е човек, ще носят включения трансген. Общо, това ще има също за резултат ефективен пренос на трансген в потомство на родоначалник, тъй като 50% от зародишните клетки ще задържат трансгена. Микроинжектиране на зиготи е предпочитан метод за включване на трансгени при практикуване на изобретението.

Може също да бъде използвана ретровирусна инфекция, за въвеждане на трансген в животно, което не е човек. Развиващо се нечовешко ембрио може да бъде култивирано *in vitro* до стадия на бластоцит. През това време, бластомерите могат да бъдат прицелни места за ретровирусна инфекция. Ефективна инфекция на бластомери е получена чрез ензимно третиране, за отстраняване на *zona pellucida*. Вирусната векторна система използвана за въвеждане на трансгена, обикновено е репликация-дефектен ретровирус носещ трансгена (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). Трансфекция се постига лесно и ефективно чрез култивиране на бластомерите върху монослой от вирус-продуциращи клетки (van der Putten et al., (1985) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82, 6148-6152; Stewart et al., (1987) EMBO J. 6, 383-388). По избор, инфекция може да бъде извършена на по-късен стадий. Вирус или вирус-продуциращи клетки могат да бъдат инжектирани в бластоцелето (Jahner et al., (1982) Nature 298, 623-628). Повечето от животните родоначалници ще бъдат мозаечни за трансгена, тъй като включване се появява само с една подгрупа от клетките, които формират трансгенното животно, което не е човек.

По-нататък, животното родоначалник, може да съдържа ретровирусни инсерции на трансгена на различни позиции в генома; тези общо се отделят в потомството. В допълнение, възможно е също да се въведат трансгени в зародишната линия, макар и с ниска ефективност, чрез интраутеринна ретровирусна инфекция на ембрио в среден период след гестация Jahner et al., (1982) Nature 298, 623-628).

Трети тип прицелна клетка за трансгенно въвеждане е ембрионалната стволова клетка (ES). ES клетки са получени от преимплантация ембриони, култивирани *in vitro* (Evans et al., (1981) Nature 292, 154-156; Bradley et al., (1984) Nature 309, 255-256; Glosser et al., (1986) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83, 9065-9069). Трансгени могат да бъдат ефективно въведени в ES клетки чрез ДНК трансфекция или ретровирус-медирана трансдукция. Получените трансформирани ES клетки могат след това да бъдат комбинирани с бластоцити от животно, което не е човек. ES колонизират ембриото и допринасят за зародишната линия на полученото химерно животно.

Методите за оценка наличието на въведена ДНК, както и нейната експресия, са пряко достъпни и добре известни в тази област. Такива методи включват, но не се ограничават до ДНК (Southern) хибридизация за откриване на екзогенна ДНК, полимеразна верижна реакция (PCR), електрофореза в полиакриламиден гел (PAGE) и Western blots (препечатка) за откриване на ДНК, РНК и белтък. Методите включват имунологични и хистохимични техники, за откриване експресия на Nogo рецепторен ген.

Както тук е използвано, "трансген" е ДНК последователност, въведена в зародишна линия на животно, което не е човек, чрез човешка интервенция, като по начин в Примерите, описани по-долу. Последователност на нуклеиновата киселина на трансгена, в този случай форма на SEQ ID NO: 1 или 3, може да бъде интегрирана в

един локус на геном, където дадената последователност на нуклеинова киселина не се открива нормално, или в нормален локус за трансгена. Трансгенът може да се състои от последователности на нуклеинова киселина, произхождаща от геном на същите видове или на различни видове, в сравнение с видовете на прицелното животно. Например, аксонална регенерация у мишки, които не притежават Nogo, може да бъде сравнена с такава у мишки, които не притежават MAG или и двата – MAG и Nogo. За определяне дали ефектът на анти-Nogo антитяло се дължи на Nogo блокада, антитяло ефекти могат да бъдат проучени при животни, които не притежават Nogo експресия.

Както е обсъдено по-горе, нуклеинова киселина на изобретението може да бъде трансфектирана в клетка гостоприемник като се използва вектор. Предпочитани вектори са плазмиди и вирусни вектори, като ретровируси. Вирусни вектори могат да бъдат използвани за получаване на трансгенни животни, съгласно изобретението. Предпочитано, вирусните вектори са репликация дефектни, което означава, че те не са способни да реплицират автономно в прицелната клетка. Общо, геномът на репликация дефектните вирусни вектори, които са използвани в обсега на настоящето изобретение, не притежават най-малко една област, която е необходима за репликацията на вируса в инфектираната клетка. Тези области могат или да бъдат елиминирани (изцяло или частично), или да бъдат превърнати в не-функционални с всяка техника, известна на специалиста в тази област. Тези техники включват тотално отстраняване, заместване (с други последователности, в частност с вмъкнатата чрез инсерция нуклеинова киселина), частична делеция или добавяне на една или повече бази към съществена (за репликацията) област. Такива техники могат да бъдат изпълнени *in vitro* (върху изолираната ДНК) или *in situ*, като се

използват техниките на генетична манипулация или чрез третиране с мутагенни агенти.

Предпочитано, репликация дефектният вирус задържа последователностите на неговия геном, които са необходими за залавяне на вирусните частици. Ретровирусите са интегриращи се вируси, които инфектират дялящи се клетки. Ретровирусният геном включва два LTRs, една залавяща последователност и три кодиращи области (*gag*, *pol* и *env*). Описана е конструкцията на рекомбинантни ретровирусни вектори (виж, например Bernstein et al., (1985) Genet.Eng. 7, 235; McCormick, (1985) Biotechnol. 3, 689-691). В рекомбинантни ретровирусни вектори, *gag*, *pol* и *env* гените са общо делетирани, изцяло или частично и заменени с хетероложна последователност на нуклеинова киселина, която е от интерес. Тези вектори могат да бъдат конструирани от различни типове ретровируси, като HIV, MoMuLV (murine Moloney leukemia virus), MSV (murine Moloney sarcoma virus), HaSV (Harvey sarcoma virus); SNV (spleen necrosis virus) ( вирус на некроза на слезката); ESV (Rous sarcoma virus) и Friend вирус.

Общо, за да се конструират рекомбинантни ретровируси, съдържащи последователност на нуклеинова киселина, е конструиран плазмид, който съдържа LTRs, залавящата последователността и кодиращата последователност. Този конструктор е използван да трансфектира една пакетираща клетъчна линия, която клетъчна линия е способна да достави в транс ретровирусните функции, които са липсващи в плаزمид. Общо, пакетиращите клетъчни линии, са способни да експресират *gag*, *pol* и *env* гени. Такива пакетиращи клетъчни линии са описани в предишни изследвания, по-специално в клетъчната линия PA317 (U.S.Patent 4,861,719); PsiCRIP клетъчната линия (WO9002806) и GP+envAm-12 клетъчната линия (WO8907150). В допълнение, рекомбинантните

ретровирусни вектори могат да съдържат модификации в рамките на LTRs за потискане на транскрипционна активност както и обширни залавящи последователности, които могат да включват част от gag гена (Bender et al., (1987) J.Virol. 61, 1639-1646). Рекомбинантни ретровирусни вектори са пречистени със стандартни техники, известни на специалистите в тази област.

В един аспект нуклеиновата киселина кодира антисенз РНК молекули. В това изпълнение, нуклеиновата киселина е оперативно свързана с подходящи регулаторни области (обсъдени по-горе), които правят възможна експресията на последователността на нуклеинова киселина и е въведена в клетка използваща, предпочитано, рекомбинантни векторни конструкции, които ще експресират антисенз нуклеиновата киселина, след като векторът е въведен в клетката. Примери за подходящи вектори включват плазмиди, аденовируси, адено-свързани вируси (виж, например, U.S.Patent 4,797,368, U.S. Patent 5,139,941), ретровируси (виж по-горе) и херпес вируси. За предаване на терапевтичен ген, векторът предпочитано е адено-свързан вирус.

Аденовируси са еукариотни ДНК вируси, които могат да бъдат модифицирани ефективно да предават нуклеинова киселина на изобретението на различни клетъчни типове. Съществуват различни серотипове аденовирус. От тези серотипове, предимство се дава в обсега на настоящето изобретение, да се използват два типа или тип пет човешки аденовируси (Ad2 или Ad5) или аденовируси от животински произход (виж WO9426914). Такива вируси от животински произход, които могат да бъдат използвани в обсега на настоящето изобретение, включват аденовируси от кучешки, говежди, миши, яйчев, свински, птичи и маймунски произход.

Репликационно дефектните рекомбинантни аденовируси, съгласно изобретението могат да бъдат получени с всяка техника

известна на специалиста в тази област. В частност, те могат да бъдат получени чрез хомоложна рекомбинация между аденовирус и плазмид, който носи между другото, ДНК последователността, която представлява интерес. Хомоложната рекомбинация се извършва след ко-трансфекция на споменатия вирус и плазмид в подходяща клетъчна линия. Клетъчната линия, която е използвана, трябва предпочитано (i) да бъде трансформируема със споменатите елементи, и (ii) да съдържа последователностите, които са способни да допълват частта на генома на репликационно дефектния аденовирус, предпочитано в интегрирана форма, за да се избегнат рискове от рекомбинация. Рекомбинантни вируси се получават и пречистват, като се използват стандартни биологични техники, които са добре известни на специалиста в тази област.

Произведени са известен брой рекомбинантни или трансгенни мишки, включително такива, които експресират активирана онкогенна последователност (U.S. Patent 4,736,866); експресират Simian SV 40 Т-антиген (U.S. Patent 5,738,915); не притежават експресията на интерферон регулаторен фактор 1 (IRF-1) (U.S. Patent 5,731,490); проявяват допаминергична дисфункция (u.S. Patent 5,723,719); експресират най-малко един човешки ген, който участва в контрола на кръвното налягане (U.S. Patent 5,731,489); проявяват по-голямо сходство с условията, съществуващи при естествено проявяваща се болест на Alzheimer (U.S. Patent 5,720,936); имат намален капацитет да медируют клетъчно прилепване (U.S. Patent 5,602,307); притежават ген на говежди растежен хормон (Cutter et al., (1996) Genetics 143, 1753-1760) или са способни да генерират напълно човешки антитяло отговор (Zou et al., (1993) Science 262, 1271-1274).

Докато мишки и плъхове остават животните на избор за повечето трансгенни експерименти, в някои случаи се предпочита



или дори е необходимо да се използват алтернативни животински видове. Трансгенни процедури успешно са използвани в различни не-миши животни, включително овце, кози, пилета, хамстери, зайци, крави и морски свинчета (виж, Aigner et al., (1999) *Biochem.Biophys. Res.Comm.* 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; U.S.Patent 5,908,969; U.S.Patent 5,792,902; U.S.Patent 5,892,070; U.S.Patent 6,025,540).

#### N. Диагностични методи

Един начин за диагностициране на демиелинизиращо заболяване, използвайки молекули нуклеинова киселина или белтъци на изобретението, включва получаване на тъканна проба от живи индивиди. Получаване на тъканни проби от живи източници е проблематично за тъкани, като централната нервна система. При пациенти страдащи от демиелинизиращо заболяване, тъканни проби за диагностични методи, могат да бъдат получени с по-малко инвазивни процедури. Например, проби могат да бъдат получени от цяла кръв и серум.

Употребата на молекулярно биологични средства става рутинна в съдебната технология. Например, сонди от нуклеинови киселини могат да бъдат използвани за определяне експресията на молекула нуклеинова киселина, съдържаща цялата или поне част от последователностите на SEQ ID NO: 1, при образци на съдебна патология. По-нататък, тестове с нуклеинови киселини могат да бъдат изпълнени по всякакви начини за провеждане охарактеризиращ

транскрипцията анализ. В допълнение към анализа на нуклеинови киселини, съдебни методи на изобретението, могат да бъдат насочени към белтъка, кодиран от SEQ ID NO: 1, за определяне възходящата и низходяща регулация на гените (Shiverick et al., (1975) Biochim. Biophys. Acta 393, 124-133).

Методи на изобретението могат да включват третиране на тъкани с колагенази или други протеази, за да се направи тъканта податлива на клетъчен лизис (Semenov et al., (1987) Biull.Eksp.Biol.Med. 104, 113-116). По-нататък, възможно е да се получат биопсични проби от различни области на мозъка за анализ.

Тестове за откриване молекули нуклеинова киселина или белтък на изобретението, могат да бъдат във всякакъв формат, който е на разположение. Типични тестове за молекули нуклеинови киселини включват хибридизация или PCR. Типични тестове за откриване белтъци, полипептиди или пептиди на изобретението, включват прилагането на антитяло сонди във всякакъв разполагаем вид, като *in situ* свързващи тестове, и т.н. Виж, Harlow & Lane, (1988) Antibodies – A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press. В предпочитани изпълнения, тестовете се провеждат с подходящи контроли.

Без следващо описание, счита се, че специалистът в тази област може, използвайки предходното описание и следващите илюстративни примери, да направи и използва съединенията на настоящето изобретение и да прилага претендираните методи. Следващите работни примери следователно, специфично отбелязват предпочитани изпълнения на настоящето изобретение и не се разглеждат като ограничаващи по някакъв начин на останалата част от представянето.

## ПРИМЕРИ

### Пример 1 – Идентифициране на Nogo като член на ретикулон семейството белтъци

Регенерацията на зрял аксон на бозайник, обикновено е успешна в периферията, но печално слаба в ЦНС. Обаче, много класове аксони на ЦНС могат да се удължат на дълги разстояния в присадки на периферен нерв (Benfy & Aguayo (1982) *Nature* 296, 150-152). Сравнение на миелин от ЦНС и периферната нервна система (ПНС), разкрива, че бялото вещество на ЦНС е селективно инхибиторно за аксоналното нарастване (Schwab & Thoenen (1985) *J.Neurosci.* 5, 2415-2423). Описани са няколко компоненти на бялото вещество на ЦНС, N135, NI250 (Nogo) и MAG, с инхибиторна активност за аксоналното нарастване (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.* 73, 19283-19293; McKerracher et al., (1994) *Neuron* 13, 805-811; Mukhopadhyay et al., (1994) *Neuron* 13, 757-767). Съобщено е, че IN-1 антитялото, предизвикано срещу N135 и NI250 (Nogo), позволява умерена степен на аксонална регенерация и функционално възстановяване след увреждане на гръбначния мозък (Bregman et al., (1995) *Nature* 378, 498-501; Thallmair et al., (1998) *Nature Neurosci.* 1, 24-31). Настоящото изобретение идентифицира Nogo като член на ретикулон (Reticulon) белтъчното семейство.

Nogo се експресира от олигодендроцити, но не от Шванови клетки и се свързва първично с ендоплазматичния ретикулум. Шестдесет и шест аминокиселинния луменален-екстрацелуларен домен на Nogo (SEQ ID NO: 20) инхибира аксоналното удължаване и колабира растежните конуси на дорзалния коренчев ганглий. Други ретикулон белтъци не са експресирани в олигодендроцити, и 66

аминокиселинния луменален-екстрацелуларен домен от ретикулон белтъци не инхибира аксоналната регенерация. Тези данни осигуряват молекулна база за определяне приноса на Nogo за неуспеха на аксонална регенерация в зрялата ЦНС.

За експресия и белтъчно пречистване на рекомбинантен Nogo-A, пълноразмерната последователност (K1AA0886) е щедро предоставена от Kazusa DNS Research Institute. Пълноразмерната кодираща последователност е амплифицирана с полимеразна верижна реакция (PCR) и лигирана в pCDNA3.1-MycHis вектор (Invitrogen), за създаване плазмид, кодиращ Nogo-A, слят при карбоксилния край с Myc епитопа (Nogo-A-Myc). По избор, кодиращата последователност е амплифицирана като са използвани праймери, които кодират един във-рамката Myc епитоп, непосредствен аминокрай на първия остатък и един стоп кодон при карбоксилния край (Myc-Nogo-A). Nogo-C-MycHis и Rtn1C-MycHis експресионни вектори са направени производни по същия начин, с изключение на това, че е използвана кДНК библиотека от зрял мозък на плъх, като матрица за PCR реакция, с праймери базирани на Nogo-C или Rtn 1C последователностите (Van de Velde et al., (1994) J.Cell Sci. 107, 2403-2416). Тези плаزمиди са трансфектирани в COS-7 или HEK293T с Lipofectamine (Gibco-BRL) или FuGENE 6 (Boehringer Mannheim) метода.

Една част от Nogo-A, кодираща 66 аминокиселинния луменален-екстрацелуларен фрагмент на Nogo-A, е амплифицирана с PCR и лигирана в pGEX-2T плазмид, за добиване прокариотен експресионен вектор за GST-Nogo слет белтък. Сходни области на Rtn1, Rtn2 и Rtn3 са амплифицирани с nested PCR, като е използвана кДНК библиотека от зрял мозък на плъх като матрица и са лигирани с pGEX-2T. *E.coli* трансформирани с тези плазмиди са

въведени с IPTG. Разтворими, нативни GST слети белтъци са пречистени с глутатион-смола и съдържат приблизително 75% GST и 25% пълноразмерен GST-Nogo или GST-Rtn белтък. Голямата част от GST-Nogo белтък не беше екстрактируема при не-денатуриращи условия, но екстракт с 8M урея, диализиран срещу PBS съдържа повече от 98% чист GST-Nogo.

Открива се Мус имунореактивност с видим размер в 225 kDa област при редуциращи условия (данните не са представени). Така кДНК насочва експресията на белтък със съответна електрофоретична подвижност и аминокиселинната последователност, която да бъде Nogo, който е наречен човешки Nogo-A (hNogo-A).

Консервираната карбоксилна опашка на Rtn семейството белтъци, съдържа два хидрофобни домена, разделени със 66 аминокиселинен остатъчен хидрофилен сегмент. Никоя от последователностите не съдържа сигнален пептид. Предсказаната топология на тези белтъци е за аминокиселинния край, който се намира в цитозола, и за консервираната област за асоцииране с липидния двоен слой. Има експериментални данни за Rtn 1-A, които демонстрират, че полипептидът се проявява като интегрален мембранен белтък, и че хидрофобните сегменти на консервирания домен, са отговорни за това поведение (Van de Velde et al., (1994) J.Cell Sci. 107, 2403-2416). Мус-tagged Nogo също е свързан с партикулна фракция и се екстрахира с детергент, но не при висока йонна сила (данните не са показани).

Когато е свръх експресиран в бъбречни клетки, Rtn 1 белтъкът е локализиран първично към ендоплазматичния ретикулум (ER) във финно гранулиран вид, от тук името Reticulon (Van de Velde et al., (1994) J.Cell Sci. 107, 2403-2416). Има един ди-лизин ER ретенционен мотив при карбоксилния край на Nogo най-много Rtn белтъци (Van de Velde et al., (1994) J.Cell Sci. 107, 2403-2416; Jackson

et al., (1991) EMBO J. 9, 3153-3162). При неврони, Rtn 1 е експресиран навсякъде в израстъците и е концентриран в растежните конуси (Senden et al., (1996) Eur.J.Cell Biol. 69, 197-213). Неговата локализация в трансфектирани бъбречни клетки е довела до предположението, че Rtn 1 може да регулира белтъчното разпределение и други аспекти на ER функция (Van de Velde et al., (1994) J.Cell Sci. 107, 2403-2416). И двете А и С снадени форми на Nogo проявяват едно ретикуларно разпределение, когато са експресирани в COS-7 клетки, подобно на това на Rtn1-C.

#### Пример 2 – Поликлонални антитела срещу Nogo

Предсказаната интра-мембранна топология на двата хидрофобни домена на Nogo, показва, че 66 аминокиселинните остатъци между тези сегменти, са локализирани към луменалната/екстрацелуларна повърхност на мембраната. За изследване на това по-нататък, е създаден антисерум срещу 66 аминокиселинния домен.

За получаване на антитяло и имунохистология, са получени анти-Мус имуноблотове и имунохистология с 9E10 антитялото, както е описано в Takahashi et al., (1998) Nature Neurosci., 1, 487-493 & Takahashi et al., (1999) Cell, 99, 59-69. GST-Nogo слетият белтък е използван като имуноген, за създаване на анти-Nogo заешки антисерум. Антитялото е афинитетно пречистено и използвано при 3  $\mu\text{g/ml}$  за имунохистология и 1  $\mu\text{g/ml}$  за имуноблотове. За определяне специфичността на антисерума, е правено оцветяване в присъствието на GST-Nogo белтък при 0.1  $\text{mg/ml}$ . За оцветяване на живи клетки, клетките са инкубирани в разреждания на първично антитяло на 4°C за един час в Hanks балансиран солеви разтвор с 0.05% BSA (говежди серум албумин) и 20 mM Na-Hepes (pH 7.3). След

фиксация, свързаното антитяло е открито чрез инкубация с флуоресцентно белязани вторични антитела.

Антитялото открива ниско ниво на повърхностна експресия на този епитоп, докато Мус епитопът при карбоксилния край на експресиран Nogo не е открит, ако клетките не са пермеабелизирани. Това повърхностно оцветяване се отдава на по-малкото Nogo белтък, свързан с плазмената мембрана, отколкото ER мембраната. Тези данни подкрепят един топографски модел, където аминокиселина краищата на белтъка се намират в цитоплазмата и 66 аминокиселина на белтъка се издават напред върху луменалната-екстрацелуларна страна на ER или плазмената мембрана.

### Пример 3 – Nogo експресия в централната нервна система

Ако Nogo главно допринася за инхибиторните характеристики върху аксоналното нарастване на миелина от централната нервна система, в сравнение с PNS миелин (Caroni & Schwab, (1988) J.Cell Biol. 106, 1281-1288; Spillmann et al., (1998) J.Biol.Chem. 73, 19283-19292; Bregman et al., (1995) Nature 378, 498-501), тогава Nogo трябва да бъде експресиран в зрелия ЦНС миелин, но не в PNS миелин. Проведен е Northern blot анализ на Nogo експресия, като са използвани сонди произхождащи от 5'-Nogo-A/B-сепцифична област и от 3'-Nogo обща област на кДНК. Открита е единична ивица от около 4.1 килобази с 5' сонда в проби от тотална РНК от зрял оптичен нерв на плъх, но не в проби от седалищен нерв. Резултатите показват, че Nogo-A-клонът е пълноразмерна кДНК и са в съответствие с ролята на Nogo като инхибитор на ЦНС-миелин-специфично аксонално нарастване. Northern blot анализ с 3' сонда, разкрива, че зрителният нерв експресира високи нива на Nogo-A мРНК и доста по-ниски нива на Nogo-B и Nogo-C. Цял мозък експресира двата – Nogo-A и Nogo-C, но известен брой периферни

тъкани (включително седалищен нерв) експресират малко или никак Nogo. Nogo-C/Rtn 4-C експресия е демонстрирана в скелетен мускул и адипоцити, както и в мозък (Morris et al., (1991) Biochim.Biophys.Acta 1450, 68-76). В рамките на Rtn семейството, експресия на зрителния нерв изглежда, че е селективна за Nogo, с не откриваема експресия на Rtn1 или Rtn 3. Rtn 2 не е изследван.

*In situ* хибридизация разкрива Nogo мРНК в клетки с морфология на олигодендрцити в зрял пльши зрителен нерв и пирамиден път. В рамките на мозъка, Nogo експресия също е открита в някои невронални популации. За разлика от Nogo, Rtn 1 и Rtn 3 не са експресирани в зрителен нерв, но мРНК е открита в някои невронални популации. Анализирана е локализация на Nogo белтък в култури от гръбначен мозък, третирани с PDGF и ниски концентрации серум, за индуциране диференциация на олигодендрцити, като е използвано анти-Nogo антитяло и олигодендрцит-специфично O4 моноклонално антитяло. В живи клетки, луменално-екстрацелуларната 66 аминокиселинна примка на Nogo и O4 антигенът са открити по повърхността на олигодендрцити. Приблизително половината от O4-положителните клетки в тези култури проявяват Nogo повърхностно оцветяване.

#### Пример 4 – Nogo-медиран колапс на растежния конус

За всички експерименти включващи клетъчна култура, са използвани следните методи. Културата от експланти на ембрионален пилешки E10 и E12 дорзален коренчев ганглий и дисоциирани неврони използва методите описани за култури от E7 дорзален коренчев ганглий (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. 7, 6256-6263). NGF-диференцирани PC12 клетки са култивирани както е



описано (Strittmatter et al., (1994) *J.Neurosci.* 14, 2327-2338). Експлантите от ембрионален гръбначен мозък (плъши E10 или пилешки E5) са култивирани за 7-14 дни в присъствието на PDGF-AA, за индуциране диференциация на някои клетки в зрели олигодендроцити (Vartanian et al., (1999) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 96, 731-735). Процедурата за тестове с колапс на растежен конус е идентична с тази за анализ на Sema3A-индуциран колапс на растежен конус (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). Описан е също метод за анализ на тотално невритно нарастване (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 тестове за нарастване, белтъци и пептиди са добавяни един час след посевка за минимализиране всякакъв ефект върху общия брой адхерирани клетки. За тестиране ефекта на свързания със субстрат GST или GST-Nogo, белтъчните разтвори са изсушавани върху поли-L-лизин покрито стъкло, измивани са и след това са покрити с ламинин. За E12 култури, невроналната идентичност на клетките е верифицирана чрез оцветяване с анти-неврофиламент антитела (2H3, *Developmental Studies Hybridoma Bank*) и неврити са трасирани чрез наблюдение на родамин-фалоидин оцветяване на F-актин в израстъци.

Експресията на рекомбинантен Nogo в HEK293T позволява един точен тест за това дали този белтък има инхибиторни ефекти върху нарастването на аксона. Измити мембранни фракции от вектор- или hNogo-A-Мус- трансфектирани HEK293T клетки са добавени към култури от експлантите на пилешки E12 дорзален коренчев ганглий. Морфологията на растежния конус е определяна след тридесет минути инкубация на 37°C чрез фиксация и родамин-фалоидин оцветяване.

Контролни НЕК мембрани нямат откриваем ефект върху морфологията на растежния конус. Nogo-съдържащи мембранни фракции индуцират колапс на голямата част растежни конуси от дорзален коренчев ганглий. Този колапс на растежния конус показва инхибиторна активност върху аксоналното нарастване и Nogo инхибиране на аксоналното нарастване също може да бъде демонстрирано (виж по-долу). Nogo-C формата също проявява колабираща активност, което показва, че срязаният карбоксилен край на белтъка, включващ хидрофобните сегменти и 66 аминокиселинният луменален-екстрацелуларен домен, съдържа функционално важни остатъци. От тези проучвания не се изключва допълнителна инхибиторна активност в аминокиселинната област на Nogo-A. Чувствителността на по-незрели култури от експланти на E12 пилешки ембриони или от E15 плъщи ембриони (данните не са представени) е значително по-малка. Регулацията на чувствителността по време на развитието е в съответствие с експерименти използващи частично пречистен Nogo (Bandtlow et al., (1997) Eur.J.Neurosci. 9, 2743-2752).

В рамките на растежен конус колабирацията Nogo-C белтък, хидрофилният 66 луменален-екстрацелуларен домен изглежда вероятно да реагира с повърхността на неврони на дорзален коренчев ганглий, отколкото с мембранно-включени хидрофобни домени. За тестиране на тази хипотеза, 66 аминокиселинната област на hNogo е експресирана във и пречистена от *E.coli*. Голямата част от GST-Nogo слетият белтък акумулира във включващи телца, но може да бъде отделен чрез екстракция с урея. Тази ограничена област на Nogo притежава мощна ( $EC_{50} = 50$  nM) растежен конус колабираща активност за неврони от пилешки E12 дорзален коренчев ганглий (данните не са представени). Екстрахираният с урея белтъчен препарат изглежда, че представлява само малка фракция

от Nogo последователността в една активна конформация. Следователно, 10% от GST-Nogo, който е разтворим в *E.coli*, е пречистен с помощта на глутатион-Сефарозна смола. Този препарат е дори по-мощен отколкото урея-екстрахираният белтък като колабиращ фактор, остро променяйки морфологията на растежния конус при ниски концентрации като 1nM.

Наномоларната мощност може да се сравнява с повечето известни физиологични регулатори на аксоналното насочване. Нарастване на аксон от неврони на дорзален коренчев ганглий и NGF-диференцирани PC12 клетки, също е блокирано с този разтворим GST-Nogo белтък в nM концентрации (данни не са представени). Когато GST-Nogo е свързан със субстратни повърхности, аксоналното нарастване от неврони на дорзален коренчев ганглий или PC12 клетки е редуцирано до неоткриваеми нива. Това са селективни ефекти върху аксоналното нарастване повече, отколкото клетъчно преживяване, тъй като GST-Nogo не намалява броя на неврофиламент-положителни адхерентни клетки ( $137 \pm 24\%$  на GST-третиранни култури), нито променя значимо броя на апоптични ядра, идентифицирани с DAPI оцветяване ( $4.0 \pm 1.7\%$  в контролни култури и  $5.2 \pm 1.1\%$  в GST-Nogo- третиранни видове).

Олигодендроцити изглежда експресират Nogo селективно измежду Rtn белтъците. За изследване селективността на Nogo ролята при инхибирането на аксонална регенерация, е разгледана инхибиращата активност върху аксоналното нарастване на други Rtn белтъци. Предвидените луменални-екстрацелуларни 66 аминокиселинни фрагменти на Rtn 1, Rtn 2 и Rtn 3, са експресирани като GST слети белтъци и са пречистени в нативна форма. С концентрации, при които Nogo фрагмент колабира по-голямата част от растежните конуси на E12 дорзален коренчев ганглий, другите Rtn белтъци не променят морфологията на растежните конуси (данните не са

представени). Така, инхибираща активност върху аксоналната регенерация е специфична за Nogo в Rtn семейството.

#### Пример 5 – Nogo рецепторни пептидни агенти

За по-нататъшно определяне активния домен на Nogo, са синтезирани 25 аминокиселинни остатъчни пептиди, съответстващи на сегменти на 66 аминокиселинната последователност. Пептидът съответстващ на остатъци 31-55 на извън клетъчния фрагмент на Nogo проявява колабиране на растежния конус (Фигура 2) и инхибиращи активности върху нарастването (данни не са представени) при концентрации 4 $\mu$ M. Докато тази последователност може да предостави сърцевината на инхибиторния домен, ясно е, че 66 аминокиселинният фрагмент е необходим за пълна мощност. Интересно е, че това е областта в 66 аминокиселинния домен, споделяща най-малко сходство с други Rtn белтъци, което е в съответствие с други членове на семейството, които са неактивни като инхибитори на аксоналната регенерация. Наистина, Rtn 1 31-55 аминокиселинния луменален-екстрацелуларен пептид, не упражнява колабираща активност върху растежния конус (данни не са представени).

Гореспоменатите експериментални данни идентифицират Nogo като олигодендроцит-специфичен член на Rtn семейството и демонстрират, че дискретен домен от Nogo може да инхибира аксоналното нарастване. Други Rtn белтъци не притежават тази активност. Експресията на Nogo в олигодендроцити, но не в Шванови клетки, следователно допринася за неуспеха на аксонална регенерация в зрялата ЦНС на бозайници, в сравнение със зрялата PNS. Относителният принос на Nogo в сравнение с други миелинови компоненти на ЦНС за не-разрешаващата природа на бялото

вещество на ЦНС, може понастоящем да бъде характеризирани на молекулно ниво.

Докато текущите експериментални данни са в съответствие с ролята на Nogo при блокиране аксоналната регенерация на зряла ЦНС след патологично увреждане, това може също да бъде свързано с физиологичната роля на Nogo при не-патологични състояния. Въз основа на локализационни проучвания, се счита, че други Rtn белтъци играят известна роля в ER функция (Van de Velde et al., (1994) J.Cell. Sci. 107, 2403-2416). Една голяма част от Nogo е разпределена в ретикуларен вид в COS-7 клетки и само малка част изглежда е достъпна на клетъчната повърхност.

#### Пример 6 – Инхибиране на Nogo активност

Предишните примери показаха, че една 66 аминокиселинна област близо до карбоксилния край на Nogo инхибира аксоналното нарастване и се експресира по клетъчната повърхност. По-къси 25 аминокиселинни сегменти на този домен, са или инертни като инхибитори на нарастването или са с по-ниска потентност (GrandPre et al., (2000) Nature 403, 439-444). Областта 31-55 от този 66 аминокиселинен сегмент има слаба инхибиторна активност върху колапса на растежния конус и аксоналното нарастване. За блокиране Nogo действието *in vivo*, силно желан би бил един конкурентен антагонист на Nogo, който се свързва специфично със същото рецепторно място, но не упражнява биологичен ефект. Тестирани са различни фрагменти на 66 аминокиселинната област, като блокери на Nogo-медирано инхибиране на аксоналния растеж. За тази цел са използвани два теста. Първият е тест за колапс на растежния конус и вторият е свързващ тест.

При теста за колапс на растежния конус, отговорът спрямо Nogo е измерван в присъствие на различни потенциални

антагонистични пептиди. Три до двадесет и пет аминокиселинни пептиди (1-25, 11-35 и 21-45) от 66 аминокиселинната област, притежават блокираща активност в  $\mu\text{M}$  концентрации (Фигура 2). Комбинацията от всичките три пептиди не променя морфологията на растежния конус при изходни условия, но напълно предотвратява колапс при 15 nM GST-Nogo. Същата смес от пептиди също е способна да блокира индуциран с ниска доза ЦНС миелин колапс на растежен конус. Тази блокада подкрепя хипотезата, че Nogo е първичен инхибиторен компонент на ЦНС миелин. По-нататък, блокадата има свойства, които се очакват за конкурентен антагонизъм, бидейки неефективни при високи дози миелин на ЦНС.

За да се създаде един антагонист с висока специфичност и потентност, е тестиран един по-дълъг фрагмент от Nogo. Предпочитано, такъв пептид сам по себе си няма инхибиторна активност върху аксоналното нарастване, докато конкурентно блокира Nogo действие. Фрагментът 2-41 от Nogo е ацетилиран при карбоксилния край и амидиран при аминокрая и е с най-високата мощност блокатор на Nogo, определена до момента. Per2-41 отменя GST-Nogo-индуциран колапс на растежен конус и притежава видим  $K_i$  от 150nM в свързващия тест (Фигура 3). Фрагментът 2-41 също блокира способността на пречистен Nogo-66 белтък и суров миелин от ЦНС да инхибират невритно нарастване при култивирани неврони (Фигура 4).

#### Пример 7 – Идентифициране на Nogo рецептор

Създаден е Nogo свързващ тест, който използва метод, широко прилаган при изследване аксоналната носочваща функция на semaphorin и ephrin (Flanagan & Vanderhaeghen, (1998) Annu.Rev. Neurosci. 21, 309-345; Takahashi et al., (1999) Cell 99, 59-69). Той включва сливане на секретирана единица алкална фосфатаза (AP)

от плацента с въпросния лиганд, за предоставяне на биологично активен рецептор свързващ агент, който може да бъде откриван с изключително чувствителен колориметричен метод. За Nogo е създаден експресионен вектор, кодиращ сигнален пептид, един His6 tag за пречистване, AP и 66 аминокиселинния активен домен на Nogo. Слетият белтък може да бъде пречистен от кондиционираната среда на трансфектирани клетки в количества от милиграми (Фигура 5). Този белтък е биологично активен като растежен конус колабиращ агент, с  $EC_{50}$  от 1nM. AP-Nogo в действителност е малко по-потентен от GST-Nogo, вероятно поради това, че белтъкът е синтезиран в еукариотна а не в прокариотна клетка. Начални проучвания са разкрили насищащи се, високо афинитетни места по аксони. Свързване е блокирано с GST-Nogo и с антагонистичните 25 аминокиселинни пептиди, което съответствува на конкурентно свързване с невронално рецепторно място. Тъй като видимата  $K_d$  (3 nM) за тези места е близка до  $EC_{50}$  на AP-Nogo в колабиращия тест, вероятно е местата да са физиологично съответни на Nogo рецептори.

Този тест е използван за експресионно клониране на Nogo рецептор. Пулове от кДНК експресионна библиотека от миши зрял мозък, представляваща 250,000 независими клона, са трансфектирани в не-невронални COS-7 клетки. Не-трансфектирани COS-7 клетки не свързват AP-Nogo, но трансфектиране с два пула от 5,000 клона, изявява няколко клетки със силно AP-Nogo свързване. Единични кДНК клонове, кодиращи едно Nogo свързващо място, са изолирани със sib-селекция от всеки от двата положителни пула. Двата независимо изолирани клона са идентични един на друг, с изключение за едно удължение от 100 базови на 5' нетранслираната област в един клон. Трансфектиране на тези клонове в COS-7 клетки води до едно свързващо място с афинитет за AP-Nogo, идентично с

това, наблюдавано при неврони на E13 дорзален коренчев ганглий;  $K_d$  за свързване е около 3nM (Фигура 6). AP сама не се свързва с откриваем афинитет с тези трансфектирани клетки, което показва, че афинитетът се дължи на 66 аминокиселина произхождаща от Nogo. По-нататък, GST-Nogo измества AP-Nogo от тези места.

Тази кДНК кодира един нов 473 аминокиселинен белтък. Не е съобщена кДНК със значима хомология в GenBank. Предсказаният белтък съдържа един сигнален пептид, последван от осем богати на левцин повторни области, един уникален домен и едно предсказано GPI закрепващо място (Фигура 7). Идентифициран е един човешки хомолог на миша кДНК, който споделя 89% аминокиселинна идентичност. Съществуването на тази кДНК е предсказано от структурата на миша кДНК и анализ на човешка геномна последователност, депозирана в GenBank като част от Human Sequencing Project. Екзоните на човешката кДНК са разпределени върху 35 килобази и кДНК не е предварително разпозната в геномната последователност. Белтъчната структура е в съответствие с един белтък на клетъчната повърхност, способен да свързва Nogo. GPI-свързаната природа на белтъка подсказва, че трябва да има втора рецепторна субединица, която се простира върху плазмената мембрана и медира Nogo сигнално предаване.

#### Пример 8 – Тъканно разпределение на Nogo рецептор

Разпределението на мРНК за този Nogo рецептор е в съответствие с известна роля на този белтък при регулиране аксонална регенерация и пластичност в зрялата ЦНС. Northern анализ показва единична ивица от 2.3 килобази в зрелия мозък, което показва, че изолираният Nogo рецепторен клон е пълноразмерен (Фигура 8). Ниски нива от тази мРНК са наблюдавани в сърце и бъбреци, но не и в други периферни тъкани. В мозъка, експресията е



широко разпространена и тези области, които са най-богати в сивото вещество, експресират най-високите нива мРНК.

### Пример 9 – Биологични ефекти на различни Nogo домени

Тестове за Nogo-A функция включват колапс на растежен конус, невритно нарастване и фибробластно разпространение, със субстратно свързани и разтворими белтъчни препарати (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). В тестове за 3Т3 фибробластна морфология, субстратно свързан Nogo-66 не инхибира разстилане (Фигура 1b,e). Тъй като NI250 препарати и пълноразмерен Nogo-A са не-разрешаващи за 3Т3 разстилане, необходимо е да се разгледа дали различни домени на Nogo могат да съдействуват за тази *in vitro* активност. За да се улесни едно сравнение на различни Nogo-A домени, киселинния аминокиселинен терминален 1040 аминокиселинен фрагмент (амино-Nogo) е експресиран като Myc-his tagged белтък в HEK293T клетки (Фигура 1d). Nogo белтък присъствува в цитозолни фракции. Повърхности покрити с пречистен аминокиселинен Nogo белтък не допринасят за 3Т3 фибробластно разстилане (Фигура 1 b,e). Сходни резултати са наблюдавани за произхождаща от бъбрек клетъчна линия, COS-7 (Фигура 1f). Следователно, аминокиселинният домен изглежда отговаря за ефектите на пълноразмерния Nogo-A върху фибробласти. Nogo-66 доменът е специфичен за неврони; той не повлиява не-невронални клетки.

Култури от дорзален коренчев ганглий също са излагани на аминокиселинен Nogo белтък (Фигура 1c,g-l). Както за 3Т3 фибробласти, фибробласт-подобните клетки в култура на дорзален коренчев ганглий, не се разстилат върху този субстрат. По-нататък, аксонално нарастване е редуцирано до ниски нива върху аминокиселинен Nogo покрити

повърхности. Така, докато Nogo-66 ефектите са неврално-специфични, инхибиторното действие на аминок-Ного доменът е по-генерализирано. Когато е представен в разтворима форма при 100 nM, Nogo-66 полипептидът колабира растежни конуси от пилешки E12 дорзален коренчев ганглий и почти премахва аксоналното удължаване, както е описано по-горе (GrandPre et al., (2000) Nature 403, 439-444). Подчертано различно, разтворимият аминок-Ного белтък изглежда неактивен и не модулира значимо морфологията на растежните конуси на дорзален коренчев ганглий или аксонално удължаване на дорзален коренчев ганглий или не-невронално клетъчно разстилане (Фигура 1 с,g-i).

В експерименти на Walsh и колеги (Prinjha et al., (2000) Nature 403, 483-484), са изследвани церебеларни грануларни неврони и разтворим аминок-Ного е представен като Fc слет белтък, вероятно в димерна форма. Следователно, необходимо е да се разглежда дали тези разлики могат да обяснят неактивността на разтворимия аминок-Ного. Миши P4 церебеларни грануларни неврони отговарят на Nого препарати по начин неразличим от неврони от пилешки E13 дорзален коренчев ганглий (Фигура 1i). Аминок-Ного димеризирано с анти-Мус антитяло, инхибира 3T3 и COS-7 разстилане (Фигура 1e,f) и има тенденция да редуцира церебеларното аксонално нарастване (Фигура 1i). По-нататък, агрегирано чрез добавка на анти-мишо IgG антитяло, аминок-Ного значимо редуцира дорзален коренчев ганглий и церебеларно аксонално нарастване (Фигура 1h,i). Докато аминок-Ного белтъкът е съвсем киселинен, електростатичният заряд самостоятелно не отговаря за инхибиторните ефекти, тъй като поли-Asp не променя клетъчното разстилане или аксоналното нарастване (Фигура 1e, f, h). Така, Nogo-66 доменът е мощен и неврон-специфичен инхибитор, докато вътреклетъчният аминок-Ного домен

инхибира множествени клетъчни типове и изглежда функционира само в агрегирано състояние.

#### Пример 10 – Локализация на Nogo рецептор

За по-нататъшно характеризиране експресията на Nogo-66 рецепторен белтък е създаден антисерум срещу GST-Nogo рецепторен слет белтък. Този антисерум открива един 85 kDa белтък селективно в Nogo-66 рецептор-експресиращи HEK293T клетки (Фигура 9a), и специфично оцветява COS-7 клетки, експресиращи Nogo-66 рецептор (Фигура 9b). Имунохистологично оцветяване на култури от пилешки ембрионален гръбначен мозък, локализира белтъка в аксони, в съответствие с медиране на Nogo-66-индуцирано инхибиране на аксонално нарастване. Nogo-66 рецепторна експресия не е открита в O4-положителни олигодендроцити, които експресират Nogo-66. Имунореактивен 85 kDa белтък е експесиран в Nogo-66-отговарящи невронални препарати от пилешки E13 дорзален коренчев ганглий, но в по-малка степен в слабо реагираща тъкан от пилешки E13 дорзален коренчев ганглий и пилешка E7 ретина (Фигура 9a). Общо, картината на Nogo-66 експресията е съответна с белтъка медиращ Nogo-66 аксонално инхибиране.

Това антитяло също е ефективно при локализация на Nogo-66 рецепторен белтък в тъканни срези (Фигура 9c). Тъй като е ясно от проучвания с *in situ* хибридизация, че белтъкът е експесиран в множество класове неврони, имунохистология разкрива белтъка във високи нива в бялото вещество на ЦНС, в профили съответстващи на аксони. Белтък е откриваем в ниски нива в невроналното тяло и невропила. Това осигурява по-нататъшна подкрепа за предлаганата функция на този белтък при медиране взаимодействия с олигодендроцити.

### Пример 11 – Nogo рецептор медира Nogo-66 отговори

Nogo-66 рецепторният белтък е необходим за Nogo-66 действие и не просто едно свързващо място с функцията, която не е свързана с инхибиране на аксоналното нарастване. Първо предсказване е, че третиране с фосфоинозитол специфична-фосфолипаза C (PI-PLC) за отстраняване на гликофосфатидил-инозитол (GPI)-свързани белтъци от невроналната повърхност, би направило невроните нечувствителни спрямо Nogo-66. Това предсказване е вярно за неврони от пилешки E13 дорзален коренчев ганглий; PI-PLC третиране премахва AP-Nogo свързване и GST-Nogo-66-индуциран колапс на растежни конуси (Фигура 10 а-с). Като контрола, Sema3A отговори в паралелни култури не са променени от PI-PLC третиране. Разбира се, PI-PLC третиране се очаква да отстрани известен брой белтъци от аксоналната повърхност, така този резултат остава отворена възможността, че други GPI-свързани белтъци медираят Nogo-66 отговора в нетретирани култури.

За да се демонстрира, че Nogo-66 рецепторът е способен да медира Nogo-66 инхибиране на аксоналното нарастване, белтъкът е експресирал в неврони, у които липсва Nogo-66 отговор. Изследвани са дорзален коренчев ганглий и ретинални неврони от E7 пилешки ембриони. Nogo отговорите при неврони на дорзален коренчев ганглий на този етап от развитието, са слаби, но слаби отговори могат да бъдат открити в някои култури (данни не са представени). Растежни конуси на E7 ретинални ганглийни клетки са равномерно нечувствителни спрямо Nogo-66-индуциран колапс на растежни конуси (Фигура 10e), не свързват AP-Nogo (данни не са представени) и не проявяват 85kDa анти-Nogo-66 рецепторен имунореактивен белтък (Фигура 9a). Експресия на NgR в тези неврони чрез инфекция с рекомбинантни HSV препарати, прави растежните конуси на

ретинална ганглийна клетка чувствителни на Nogo-66-индуциран колапс. Инфектиране с контролен PlexinA1-експресиращ HSV препарат, не променя Nogo отговорите. Взети заедно, тези данни показват, че Nogo рецепторът идентифициран тук, участва в Nogo-66 инхибиране на аксонална регенерация.

#### Пример 12 – Структурен анализ на Nogo-66 рецептор

Nogo-66 рецепторната структура е изследвана за определяне кои области медираат Nogo-66 свързване. Белтъкът просто е разделен на левцин богат повтор и на не-левцин богата повторна област. Анализи с делеция ясно показват, че левцин-богатите повтори са необходими за Nogo-66 свързване, но останалият белтък не е необходим (Фигура 11). В рамките на левцин богатия повтор, два домена поотделно са делетирани. Това е предвидено да поддържа общата структура на домена на левцин богатия повтор и подобен подход е използван за леутропин (leutropin) рецептор. Видимо е, че Nogo-66 свързването изисква всичките осем богати на левцин повтори и насочва, за един значим сегмент на планарната повърхност, създаден от линейни бета ивици на богати на левцин повтори. Богатите на левцин повтор-амино крайни и богатите на левцин повтор-карбокси крайни консервирани, богати на цистеин области, при всеки край на богатите на левцин повтори, също са необходими за Nogo-66 свързване, вероятно те са необходими да създават съответна конформация на богат на левцин повтор.

#### Пример 13 – Блокада на Nogo с разтворим Nogo рецепторен ектодомен белтък

Един метод за блокиране каскада на сигнално предаване, иницириана от Nogo-66 свързване с Nogo рецептора, е да осигури

излишък на разтворим ектодомен на рецептора. Секретиран фрагмент на Nogo рецепторния белтък е получен от HEK293T клетки. КДНК кодиращите аминокиселинни остатъци 1-348 на мишия Nogo рецептор са лигирани в еукариотен експресионен вектор и ДНК е трансфектирана в HEK293T клетки. Кондиционирана среда от тези клетки съдържа високи нива на този Nogo рецепторен фрагмент (NgR-ecto), както е демонстрирано с имуноблотове с едно анти-NgR анти тяло. Кондиционираната среда съдържа приблизително 1mg NgR-ecto белтък в литър. При AP-Nogo свързващия тест за COS-7 клетки, експресиращи пълноразмерен Nogo рецептор или за неврони на дорзален коренчев ганглий, добавката на NgR-ecto кондиционирана среда, намалява свързването на 0.5 nM AP-Nogo-66 с 80%. Комплексна формация между разтворим NgR-ecto и Nogo-66 предотвратява свързване с рецептори по клетъчната повърхност.

За някои рецепторни системи, такива комплекси на разтворим рецепторен лиганд, могат да блокират сигнализирането чрез създаване на неефективно взаимодействие. Например, разтворимият ектодомен на Trk служи да блокира невротрофиновото сигнализиране и усилено е използван за тази цел (Shelton et al., (1995) *J.Neurosci.* 15m 477-491). Алтернативно, Nogo-66/NgR-ecto разтворимият комплекс може да се свързва със и да стимулира вероятна втора трансмембранна Nogo рецепторна субединица. Има предимство за този тип ефект от проучвания на GDNF семейство рецептори (Casalano et al., (1998) *Neuron* 21, 53-62). Nogo-66/NgR-ecto комплексът не предизвиква колапс на растежни конуси в тези неврони (пилешки E7 ретинални ганглийни клетки), които нямат Nogo-66 рецептора, но съдържат други компоненти на Nogo сигналния път. Това показва, че NgR-ecto функционира като блокер на Nogo-66 сигнализирането.

В директни тестове, NgR-ecto белтъкът протектира аксони от инхибиторните ефекти на Nogo-66. NgR-ecto предотвратява Nogo-66-индуциран колапс на растежни конуси и блокира Nogo-66-индуцирано инхибиране на невритно нарастване в пилешки E13 DRG неврони (Фигура 12). По-нататък, наличието на NgR-ecto белтък, блокира способността на миелин на ЦНС да инхибира аксонално нарастване *in vitro* (Фигура 12). Тези данни демонстрират, че NgR-ecto белтък може да стимулира аксонална регенерация *in vivo*.

Въпреки че настоящето изобретение е описано в детайли с цитати към примерите по-горе, разбираемо е, че различни модификации могат да бъдат направени без да се излиза от духа на изобретението. Съответно, изобретението е ограничено само от следните претенции. Всички цитирани патенти и публикации, свързани с тази заявка са включени тук чрез цитат в тяхната цялост. Резултатите на част от експериментите представени тук, могат да бъдат публикувани (GrandPre et al., (2000) Nature 403, 439-444) след датата на представяне на U.S. Provisional Application 60/175,707, от което тази заявка претендира за приоритет, тази публикация е включена тук чрез цитат в нейната цялост.

## ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ

1. Нуклеинова киселина съдържаща нуклеотидна последователност, кодираща полипептид, включващ аминокиселинни остатъци, кодиращи една богата на левцин повтор-амино крайна, консервирана богата на цистеин област (LRRNT), богати на левцин повтори и богата на левцин повтор-карбокси крайна, консервирана богата на цистеин област (LRRCT) на SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO: 4; и където полипептидът не притежава един уникален домен 3' към LRRCT областта и 5' към GPI домена на SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4.
2. Нуклеинова киселина съгласно претенция 1, където кодираният полипептид съдържа 1-20 консервативни аминокиселинни замени.
3. Нуклеинова киселина съгласно претенция 1, където кодираният полипептид съдържа 1-20 естествено срещани се аминокиселинни замени.
4. Нуклеинова киселина, съдържаща нуклеотидна последователност, кодираща полипептид, включващ аминокиселинни остатъци с най-малко деветдесет и пет процента идентичност на аминокиселинната последователност с тази на кодиран пептид съгласно претенция 1.
5. Нуклеинова киселина съдържаща нуклеотидна последователност, кодираща полипептид включващ аминокиселинни остатъци на SEQ ID NO:2 или SEQ ID



NO:4, не придружени от сигнален пептид на SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4; и където полипептидът не притежава един уникален домен 3' към аминокиселина 348 и 5' към GPI домен на SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4.

6. Нуклеинова киселина съгласно претенция 5, където кодираният пептид съдържа 1-20 консервативни аминокиселинни замени.
7. Нуклеинова киселина съгласно претенция 5, където кодираният полипептид съдържа 1-20 естествено срещащи се аминокиселинни замени.
8. Нуклеинова киселина съдържаща нуклеотидна последователност, кодираща полипептид, включващ аминокиселинни остатъци с най-малко деветдесет и пет процента идентичност на аминокиселинната последователност с тази на кодиран полипептид съгласно претенция 5.
9. Нуклеинова киселина съдържаща нуклеотидна последователност, кодираща полипептид, включващ аминокиселинни остатъци 1-348 на SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4; и където полипептидът не съдържа уникален домен 3' към аминокиселина 348 и 5' към GPI домен на SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4.
10. Нуклеинова киселина съгласно претенция 9, където кодираният полипептид съдържа 1-20 консервативни аминокиселинни замени.

11. Нуклеинова киселина съгласно претенция 9, където кодираният полипептид съдържа 1-20 естествено срещащи се аминокиселинни замени.
12. Нуклеинова киселина съдържаща нуклеотидна последователност, кодираща полипептид включващ аминокиселинни остатъци с най-малко деветдесет и пет процента идентичност на аминокиселинната последователност с тази на кодиран полипептид, съгласно претенция 9.
13. Нуклеинова киселина съгласно претенция 9, където кодираният полипептид включва аминокиселинни остатъци 1-348 на SEQ ID NO:2.
14. Нуклеинова киселина съгласно претенция 9, където кодираният полипептид включва аминокиселинни остатъци 1-348 на SEQ ID NO:4
15. Нуклеинова киселина съдържаща нуклеотидна последователност, кодираща полипептид състоящ се от аминокиселинни остатъци кодиращи една LRRNT област, богати на левцин повтори и LRRCT област на SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4.
16. Нуклеинова киселина съгласно претенция 15, където кодираният полипептид съдържа 1-20 консервативни аминокиселинни замени.

17. Нуклеинова киселина съгласно претенция 15, където кодиращият полипептид съдържа 1-20 естествено срещани се аминокиселинни замени.
18. Нуклеинова киселина съдържаща нуклеотидна последователност кодираща полипептид, включващ аминокиселинни остатъци с най-малко деветдесет и пет процента идентичност на аминокиселинната последователност с тази на кодиран полипептид, съгласно претенция 15.
19. Нуклеинова киселина съгласно всяка от претенции 1 до 18, където споменатата нуклеинова киселина е оперативно свързана с един или повече контролни елементи на експресията.
20. Вектор съдържащ нуклеинова киселина, съгласно всяка от претенции 1 до 19.
21. Клетка съдържаща нуклеинова киселина, съгласно всяка от претенции 1 до 19.
22. Клетка съдържаща вектор, съгласно претенция 20.
23. Метод за получаване полипептид, характеризиращ се с това, че има етап за култивиране на клетка, съдържаща нуклеинова киселина, съгласно всяка от претенции 1 до 19, в условия, при които белтъкът кодиран от споменатата нуклеинова киселина е експресиран.
24. Полипептид получен с метода съгласно претенция 23.

25. Полипептид съдържащ аминокиселинни остатъци, кодиращи една LRRNT област, богати на левцин повтори и LRRCT област на SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4; и където полипептидат не притежава уникален 3' домен към LRRCT областта и 5' на GPI домен на SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4.
26. Полипептид съгласно претенция 25, където полипептидът съдържа 1-20 консервативни аминокиселинни замени.
27. Полипептид съгласно претенция 25, където полипептидът съдържа 1-20 естествено срещащи се аминокиселинни замени.
28. Полипептид съдържащ аминокиселинни остатъци с най-малко деветдесет и пет процента идентичност на последователността с тази на полипептид съгласно претенция 25.
29. Полипептид съдържащ аминокиселинни остатъци на SEQ ID NO:2 или DEQ ID NO:4, не придружен от сигнален пептид на SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4; и където полипептидът не притежава уникален домен 3' при аминокиселина 348 и 5' при GPI домен на SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4.
30. Полипептид съгласно претенция 29, където полипептидът съдържа 1-20 консервативни аминокиселинни замени.

31. Полипептид съгласно претенция 29, където полипептидът съдържа 1-20 естествено срещащи се аминокиселинни замени.
32. Полипептид съдържащ аминокиселинни остатъци с най-малко деветдесет и пет процента идентичност на последователността с полипептид съгласно претенция 29.
33. Полипептид съдържащ аминокиселинни остатъци 1-348 на SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4; където полипептидът не притежава уникален домен 3' при аминокиселина 348 и 5' при един GPI домен на SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4.
34. Полипептид съгласно претенция 33, където полипептидът съдържа 1-20 консервативни аминокиселинни замени.
35. Полипептид съгласно претенция 33, където полипептидът съдържа 1-20 естествено срещащи се аминокиселинни замени.
36. Полипептид съдържащ аминокиселинни остатъци с най-малко деветдесет и пет процента идентичност на последователността с тази на полипептид съгласно претенция 33.
37. Полипептид съгласно претенция 33, където полипептидът съдържа аминокиселинни остатъци 1-348 на SEQ ID NO:2.
38. Полипептид съгласно претенция 33, където полипептидът съдържа аминокиселинни остатъци 1-348 на SEQ ID NO:4.

39. Полипептид състоящ се от LRRNT област, богати на левцин повтори и една LRRCT област на SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4.
40. Полипептид съгласно претенция 39, където полипептидът съдържа 1-20 консервативни аминокиселинни замени.
41. Полипептид съгласно претенция 39, където полипептидът съдържа 1-20 естествено срещащи се аминокиселинни замени.
42. Полипептид съдържащ аминокиселинни остатъци с най-малко деветдесет и пет процента идентичност на последователността с тази на полипептид, съгласно претенция 39.
43. Химерен полипептид съдържащ един полипептид, съгласно всяка една от претенции 24 до 42.
44. Фармацевтичен състав съдържащ полипептид, съгласно всяка една от претенции 24 до 42.
45. Антитяло, което се свързва с полипептид, съгласно всяка една от претенции 24 до 42.
46. Трансгенно животно, което не е човек, съдържащо нуклеинова киселина съгласно всяка една от претенции 1 до 19.

47. Нуклеинова киселина съдържаща нуклеотидна последователност, кодираща полипептид включващ аминокиселинни остатъци на SEQ ID NO: 8, 10, 12, 14, 16, 18 или 20.
48. Нуклеинова киселина съгласно претенция 47, където кодираният полипептид съдържа 1-20 консервативни аминокиселинни замени.
49. Нуклеинова киселина съгласно претенция 47, където кодираният полипептид съдържа 1-20 естествено срещащи се аминокиселинни замени.
50. Нуклеинова киселина съдържаща нуклеотидна последователност, кодираща полипептид включващ аминокиселинни остатъци с най-малко деветдесет и пет процента идентичност на последователността с тази на кодиран полипептид, съгласно претенция 47; и където кодираният полипептид модулира Nogo-медирано инхибиране на аксоналния растеж.
51. Нуклеинова киселина съгласно претенция 47, 48, 49 или 50, където споменатата нуклеинова киселина е оперативно свързана с един или повече контролни елементи на експресията.
52. Вектор съдържащ нуклеинова киселина, съгласно всяка от претенции 47 до 51.

53. Клетка съдържаща нуклеинова киселина, съгласно всяка една от претенции 47 до 51.
54. Клетка съдържаща вектор, съгласно претенция 52.
55. Метод за получаване на полипептид характеризиращ се с това, че включва етап на култивиране на клетка, съдържаща нуклеинова киселина, съгласно всяка една от претенции 47 до 51 в условия, при които белтъкът кодиран от споменатата нуклеинова киселина е експресиран.
56. Полипептид получен с метода, съгласно претенция 55.
57. Полипептид съдържащ аминокиселинни остатъци на SEQ ID NO:8, 10, 12, 14, 16, 18 или 20.
58. Полипептид съгласно претенция 57, където полипептидът съдържа 1-20 консервативни аминокиселинни замени.
59. Полипептид съгласно претенция 57, където полипептидът съдържа 1-20 естествено срещащи се замени на аминокиселинната последователност.
60. Полипептид съдържащ аминокиселинни остатъци с най-малко деветдесет и пет процента идентичност на последователността с тази на полипептид, съгласно претенция 57; и където полипептидът модулира Nogo-медирано инхибиране на аксоналния растеж.



61. Химерен полипептид съдържащ един полипептид, съгласно всяка една от претенции 56 до 60.
62. Фармацевтичен състав съдържащ полипептид, съгласно всяка една от претенции 56 до 60.
63. Антитяло, което се свързва с полипептид, съгласно всяка една от претенции 56 до 60.
64. Трансгенно животно, което не е човек, съдържащо нуклеинова киселина, съгласно всяка една от претенции 47 до 51.
65. Метод за идентифициране на агент, който модулира Nogo експресия или Nogo рецепторна експресия, характеризиращ се с това, че включва етапите на:
  - (a) предоставяне на клетка експресираща Nogo или Nogo рецептор;
  - (b) поставяне на клетката в контакт с кандидат агент; и
  - (c) откриване повишение или намаление в нивото на Nogo експресия или Nogo рецепторна експресия в присъствието на кандидат агент, в сравнение с нивото на Nogo или Nogo рецепторна експресия в отсъствието на кандидат агента.
66. Метод за идентифициране агент, който модулира Nogo-медирано инхибиране на аксоналния растеж, характеризиращ се с това, че включва етапите на:

- (a) предоставяне на клетка съдържаща Nogo белтък или клетка съдържаща Nogo рецепторен белтък;
  - (b) поставяне на клетката в контакт с кандидат агент; и
  - (c) откриване повишение или намаление в нивото на Nogo-медирано инхибиране на аксоналния растеж в присъствието на кандидат агента, в сравнение с нивото на Nogo-медирано инхибиране на аксоналния растеж в отсъствието на кандидат агента.
67. Метод за модулиране Nogo-медирано инхибиране на аксоналния растеж характеризиращ се с това, че неврон се поставя в контакт с ефективно количество полипептид съгласно всяка една от претенции 24 до 43.
68. Метод за модулиране Nogo-медирано инхибиране на аксонален растеж, характеризиращ се с това, че неврон се поставя в контакт с ефективно количество (a) антитяло, което се свързва с полипептид, съдържащ последователността на SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4; или (b) антитяло съгласно претенция 45.
69. Метод за идентифициране на свързващ участник за Nogo рецепторен белтък, характеризиращ се с това, че включва етапите на:
- (a) предоставяне на Nogo рецепторен белтък;
  - (b) поставяне в контакт на Nogo рецепторен белтък с кандидат за свързващ участник; и
  - (c) откриване свързване на кандидата за свързващ участник с Nogo рецепторния белтък, където свързващият се

участник може да модулира Nogo-медирано инхибиране на аксоналния растеж, когато се свързва с Nogo рецептор.

70. Метод за инхибиране свързване на Nogo-полипептид с Nogo рецептор, характеризиращ се с това, че Nogo рецептор се поставя в контакт с ефективно количество полипептид, съгласно всяка една от претенции 24 до 43.
71. Метод съгласно претенция 70, където полипептидът е разтворим Nogo рецептор.
72. Метод за инхибиране свързване на Nogo полипептид с Nogo рецептор, характеризиращ се с това, че Nogo рецептор се поставя в контакт с ефективно количество от (a) антияло, което се свързва с полипептид, съдържащ аминокиселинни остатъци на SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:4; или (b) антияло съгласно претенция 45.
73. Метод за инхибиране свързване на Nogo полипептид с Nogo рецептор, характеризиращ се с това, че Nogo рецептор се поставя в контакт с ефективно количество полипептид съдържащ аминокиселинни остатъци на SEQ ID NO:8, 10, 12 или 18.
74. Метод за лечение нарушение на централната нервна система у бозайник, характеризиращ се с това, че се въвежда ефективно количество агент, който модулира Nogo-медирано инхибиране на аксонален растеж.

## СПИСЪК НА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТИТЕ

<110> Strittmatter, Stephen M.

<120> Nogo рецептор-медирана блокада на аксонален растеж

<130> 44574-5073-WO

<140>

<141>

<150> US 60/175,707

<151> 2000-01-12

<150> US 60/207,366

<151> 2000-05-26

<150> US 60/236,378

<151> 2000-09-29

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1719

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (166)..(1584)

<223> Предсказан човешки Nogo рецепторен ген

<400> 1

agcccagcca gagccgggagc gagccggagcgc cgcggagcct cgtcccgcgg ccgggcccggg 60

gcccgggcccgt agcggcgggagc cctggatgagc gaccgcggccc cggggagagc ggcgcccggc 120

ccgaaacgac tttcagtcgcc cgacgcgccc cgcccaacct 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 ggt 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 tcg 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 cgc 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 cggacacaag agcgtgctca gcagccaggt 1624  
 Val Leu Gly Pro Cys  
 470  
 gtgtgtacat acgggggtctc tctccacgcc gccaaagccag ccggggcggcc gaccctgtggg 1684  
 gcaggccagg ccaggtcctc cctgatggac gcctg 1719

<210> 2  
 <211> 473  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 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

<210> 3  
<211> 1866  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<220>  
<221> CDS  
<222> (178)..(1596)  
<223> Миша Nogo рецепторна кДНК

<400> 3  
agccgcagcc cgcgagccca gcccgccccg gtagagcgga gcgcccggagc ctcgccccgc 60  
ggccggggcc ggaccgggccc ggagcagcgg cgctggatg cggaccggc cgcgcgcaga 120



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

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

gggtgtgtgta catatgggggt ctcctccac gccgccagcc agagccaggg acaggctctg 1676  
aggggcaggc caggccctcc ctgacagatg cctccccacc agcccacccc catctccacc 1736  
ccatcatgtt tacagggttc cgggggtggc ggttggttca caacccaac ttccaccgg 1796  
atcgccgcat atagacatat gaaatttatt ttacttgcgt aaaatatcgg atgacgtgga 1856  
ataaacagct 1866

<210> 4  
<211> 473  
<212> PRT  
<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> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (135)..(3710)  
<223> Човешка мРНК за Ного белтък! (K1AA0886, GenBank  
Accession No. AB020693)

<400> 5  
caccacagta ggtccctcgg ctcagtcggc ccagccctc tcagtcctcc ccaacccccca 60  
caaccgcccc cggtcttgag acgcggcccc ggcggcggcg gcagcagctg cagcâtcate 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 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 ccg 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 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 got 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 catctttaa ggggatattc atttgattat acgggggagg 3780

gtcaggaag aacgaacctt gacgttcag tgcagttca cagatcgttg ttagatcttt 3840

atttttagcc atgcactgtt gtgaggaaaa attacctgtc ttgactgcc tgtgttcac 3900

atcttaagta ttgtaagctg ctatgtatgg atttaaaccg taatcatatc ttttcttat 3960

ctgaggcact ggtggaataa aaaacctgta tattttactt tgttgcagat agtcttgccg 4020

catcttgcca agttgcagag atggtggagc tag 4053

<210> 6  
 <211> 1192  
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 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> DNA  
<213> Изкуствена последователност

<220>  
<223> Описание на изкуствена последователност: кДНК кодираща  
рецептор свързващ инхибитор Per1

<400> 7  
tttaggatat acaaggggtgt gatccaagct atccagaaat cagatgaagg ccaccattc 60  
agggcataatc tggaa 75

<210> 8  
<211> 40  
<212> PRT  
<213> Изкуствена последователност

<220>  
<223> Описание на изкуствена последователност: Per1 – Nogo  
Белтъчен инхибитор

<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> DNA  
<213> Изкуствена последователност

<220>  
<223> Описание на изкуствена последователност: кДНК кодираща  
Рецептор свързващ инхибитор Per2

<400> 9  
atccagaaat cagatgaagg ccaccattc agggcataatc tggaatctga agttgctata 60  
tctgaggagt tgggt 75

<210> 10  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> Изкуствена последователност

<220>

<223> Описание на изкуствена последователност: Pep2 – Nogo  
белтъчен инхибитор

<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> PRT

<213> Изкуствена последователност

<220>

<223> Описание на изкуствена последователност: кДНК кодираща  
Рецептор свързващ инхибитор Pep 3

<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> PRT

<213> Изкуствена последователност

<220>

<223> Описание на изкуствена последователност: Pep3 – Nogo  
белтъчен инхибитор

<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> DNA  
<213> Изкуствена последователност

<220>  
<223> Описание на изкуствена последователност: кДНК кодираща  
рецептор свързващ инхибитор Per4

<400> 13  
tctgaggagt tgggtcagaa gtacagtaat tctgctcttg gtcattgtgaa ctgcacgata 60  
aaggaactca ggcgc 75

<210> 14  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> Изкуствена последователност

<220>  
<223> Описание на изкуствена последователност: Per4 – Nogo  
белтъчен инхибитор

<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> DNA  
<213> Изкуствена последователност

<220>  
<223> Описание на изкуствена последователност: кДНК кодираща  
рецептор свързващ инхибитор Per 5

<400> 15  
gctcttggtc atgtgaactg cacgataaag gaactcaggc gcctcttctt agttgatgat 60  
ttagttgatt ctctg 75

<210> 16  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> Изкуствена последователност

<220>  
<223> Описание на изкуствена последователност: Per5 – Nogo  
белтъчен инхибитор

<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> DNA  
<213> Изкуствена последователност

<220>  
<223> Описание на изкуствена последователност: кДНК кодираща  
Рецептор свързващ инхибитор Per2-41

<400> 17  
aggatataca aggggtgat ccaagctatc cagaatcag atgaaggcca cccattcagg 60  
gcatactcgg aactcgaagt tgctatatct gaggagtgg ttcagaagta cagtaattct 120

<210> 18  
<211> 40  
<212> PRT  
<213> Изкуствена последователност

<220>  
<223> Описание на изкуствена последователност: Per2-41 – Nogo  
белтъчен инхибитор

<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> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(198)  
<223> Пълна рецептор свързваща област на Nogo ген

<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

gag ttg gtt cag aag tac agt aat tct gct ctt ggt cat gtg aac tgc 144  
Glu Leu Val Gln Lys Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Gly His Val Asn Cys  
35 40 45

acg ata aag gaa ctc agg cgc ctc ttc tta gtt gat gat tta gtt gat 192  
Thr Ile Lys Glu Leu Arg Arg Leu Phe Leu Val Asp Asp Leu Val Asp  
50 55 60

tct ctg 198  
Ser Leu  
65

<210> 20

<211> 66

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Phe Arg Ile Tyr Lys Gly Val Ile Gln Ala Ile Gln Lys Ser Asp Glu  
1 5 10 15

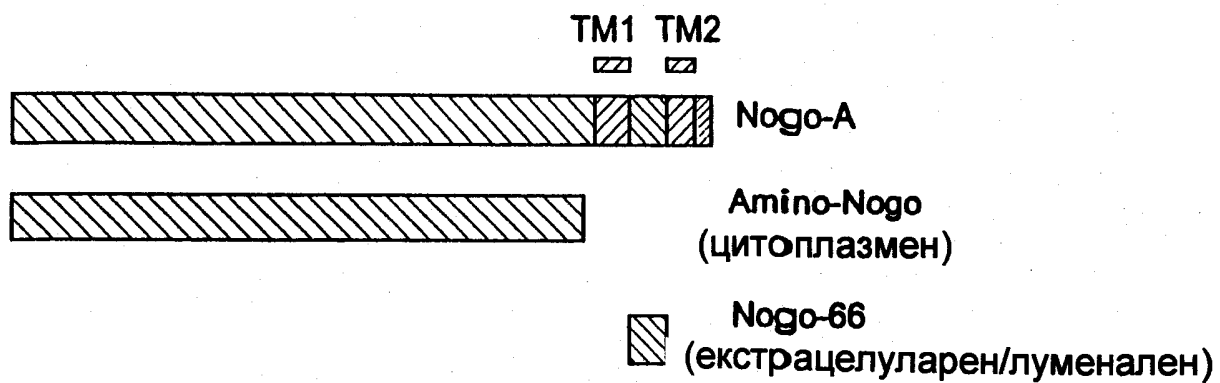
Gly His Pro Phe Arg Ala Tyr Leu Glu Ser Glu Val Ala Ile Ser Glu  
20 25 30

Glu Leu Val Gln Lys Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Gly His Val Asn Cys  
35 40 45

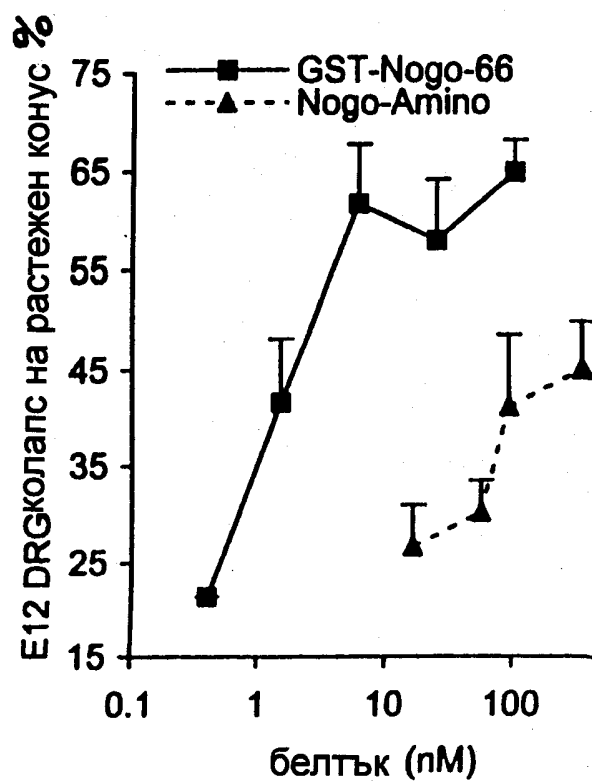
Thr Ile Lys Glu Leu Arg Arg Leu Phe Leu Val Asp Asp Leu Val Asp  
50 55 60

Ser Leu  
65

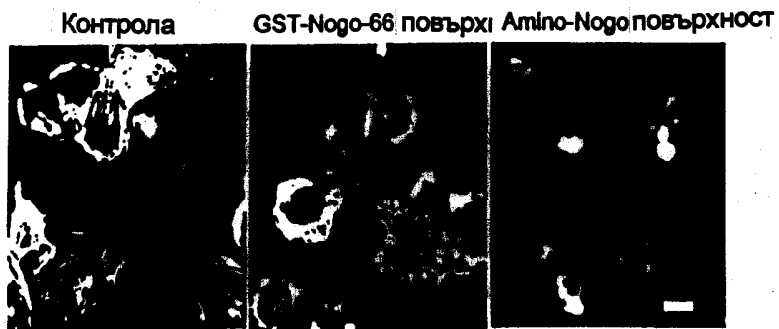
Фиг. 1а



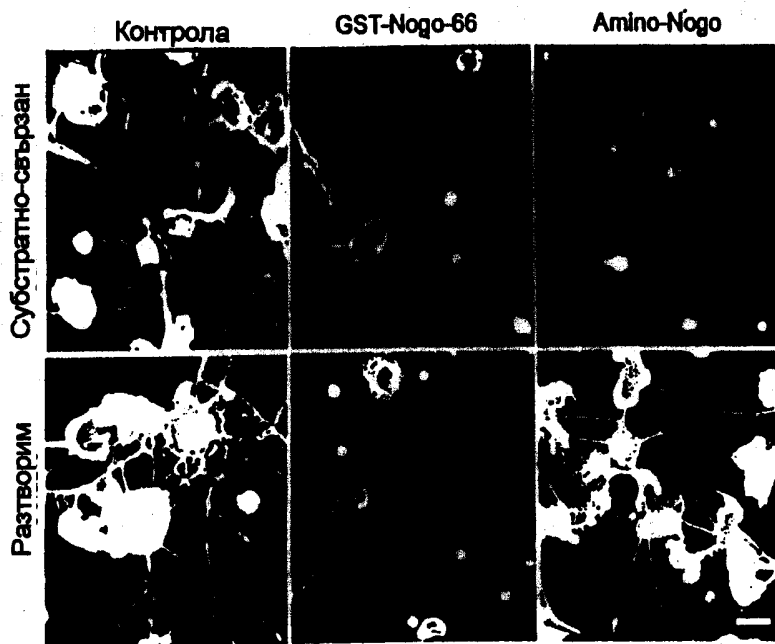
ФИГ. 1g



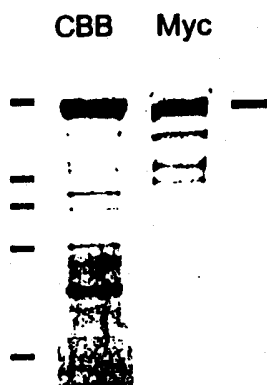
**ФИГ. 1b**



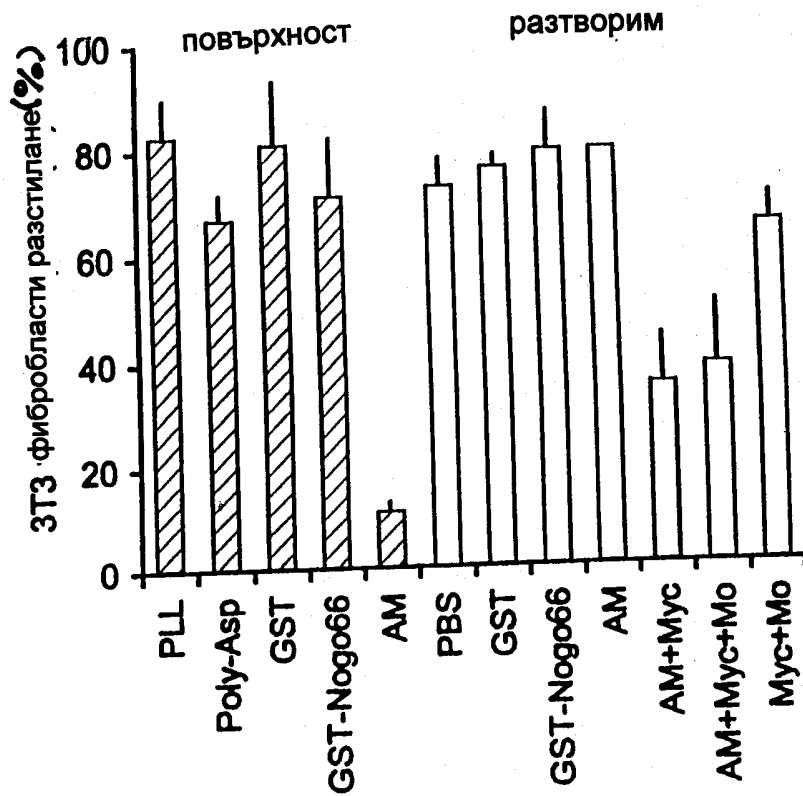
**ФИГ. 1c**



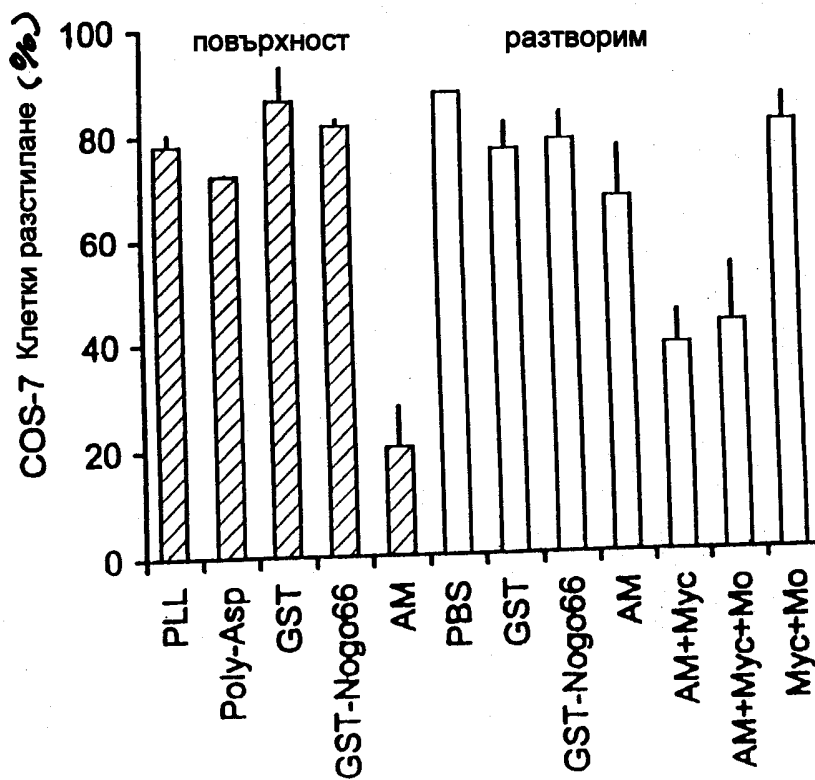
**ФИГ. 1d**



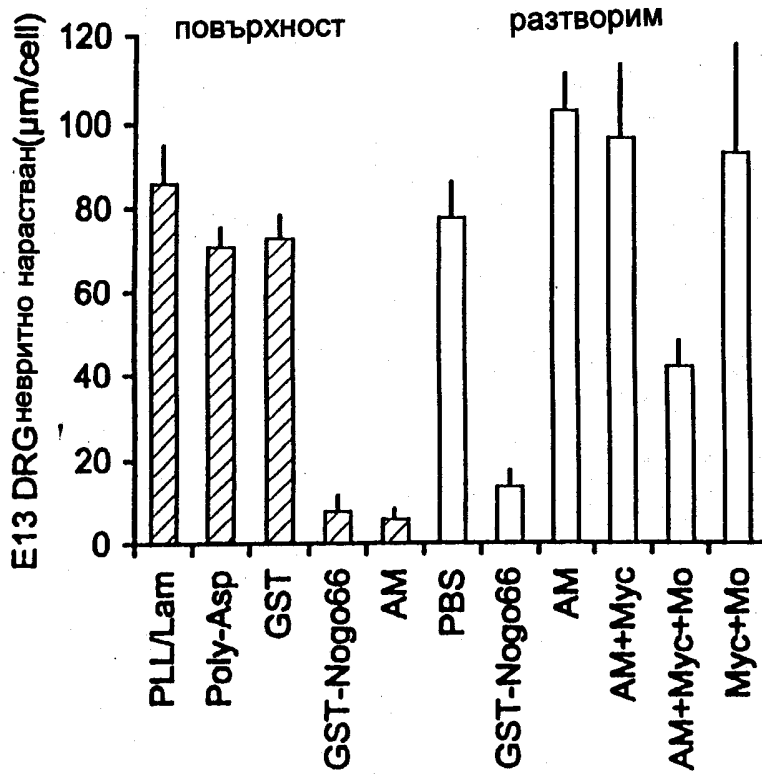
ФИГ.1е



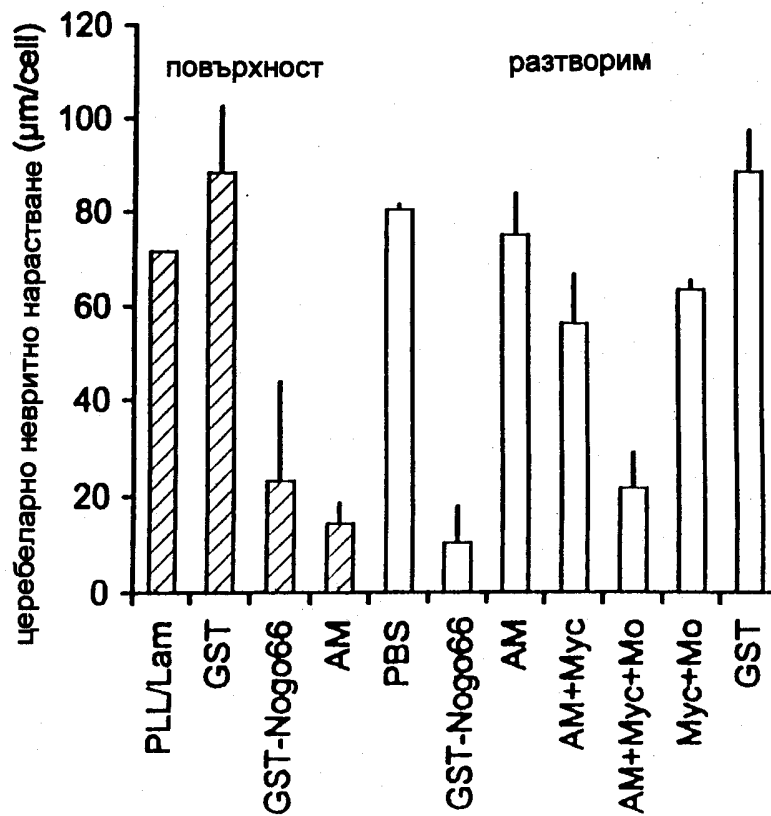
ФИГ. 1f



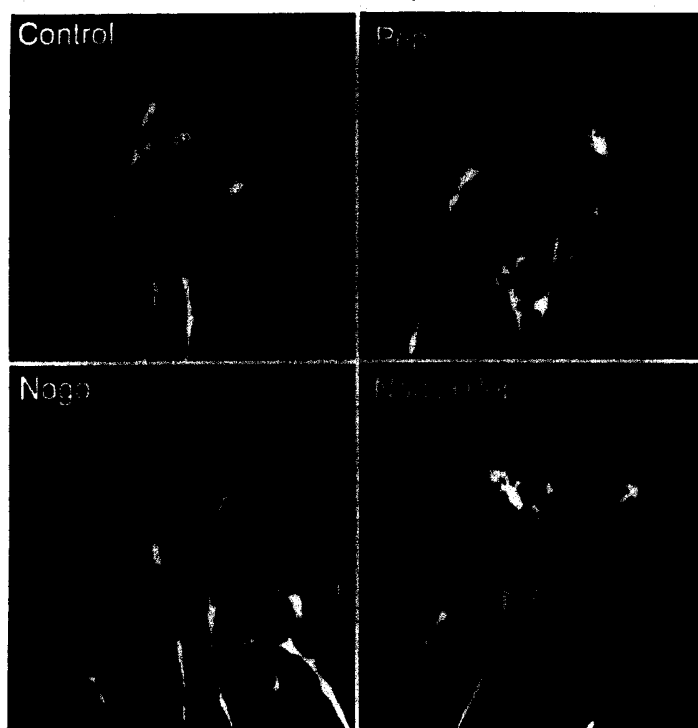
ФИГ. 1i



ФИГ. 1h

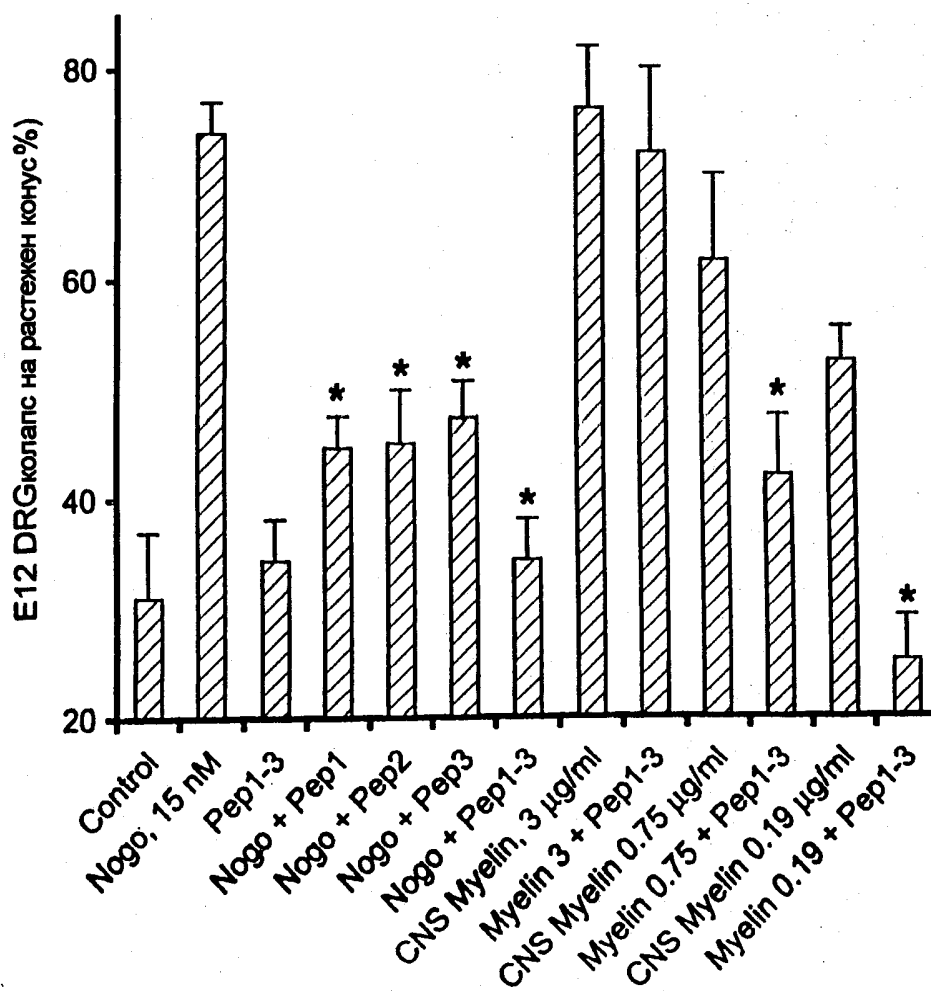


ФИГ. 2А

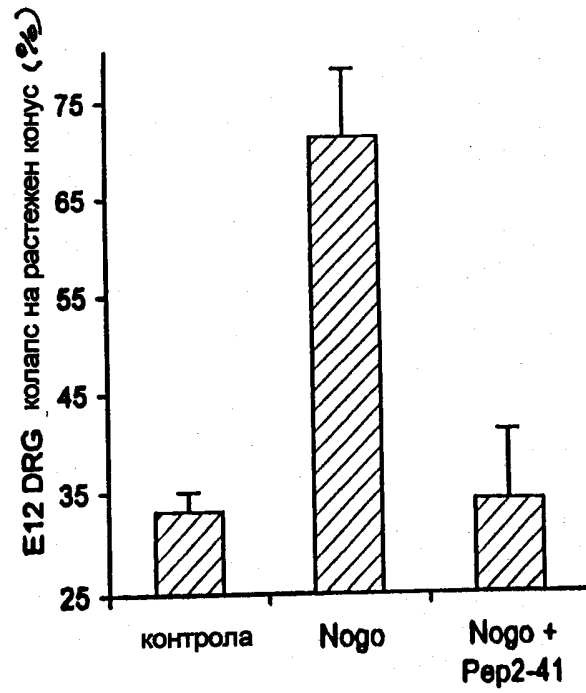




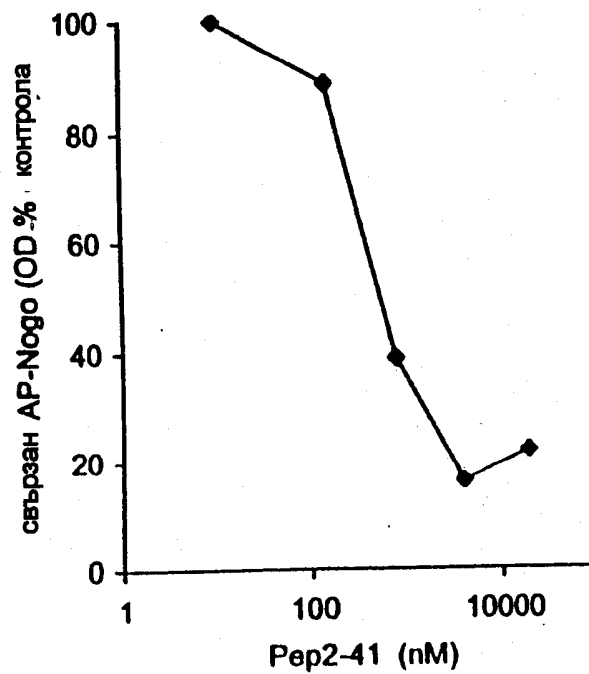
ФИГ. 2В



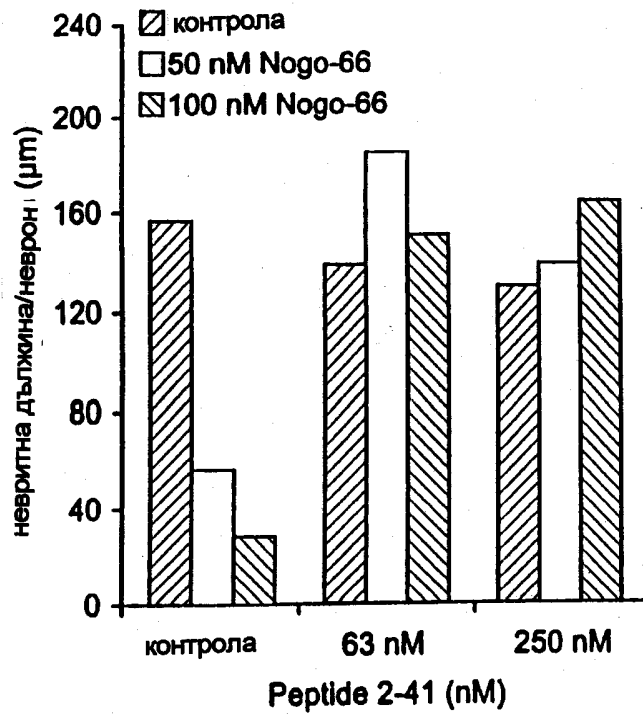
ФИГ. 3А



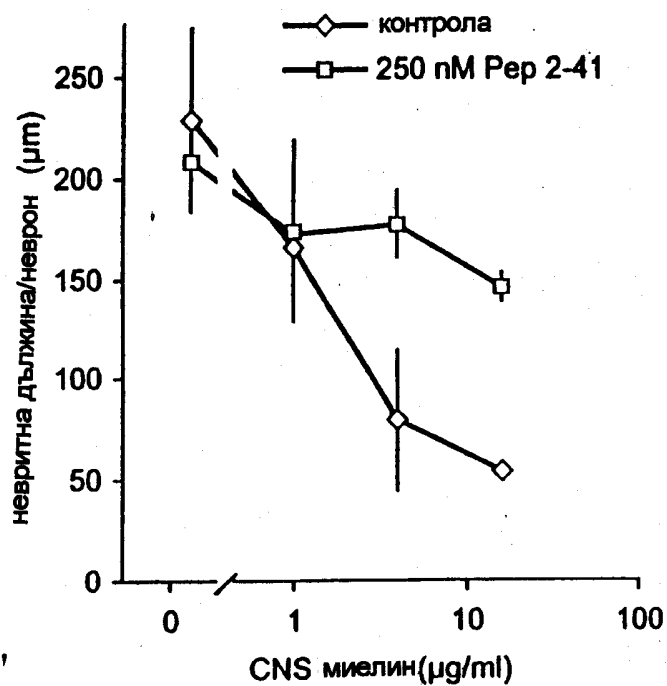
ФИГ. 3В



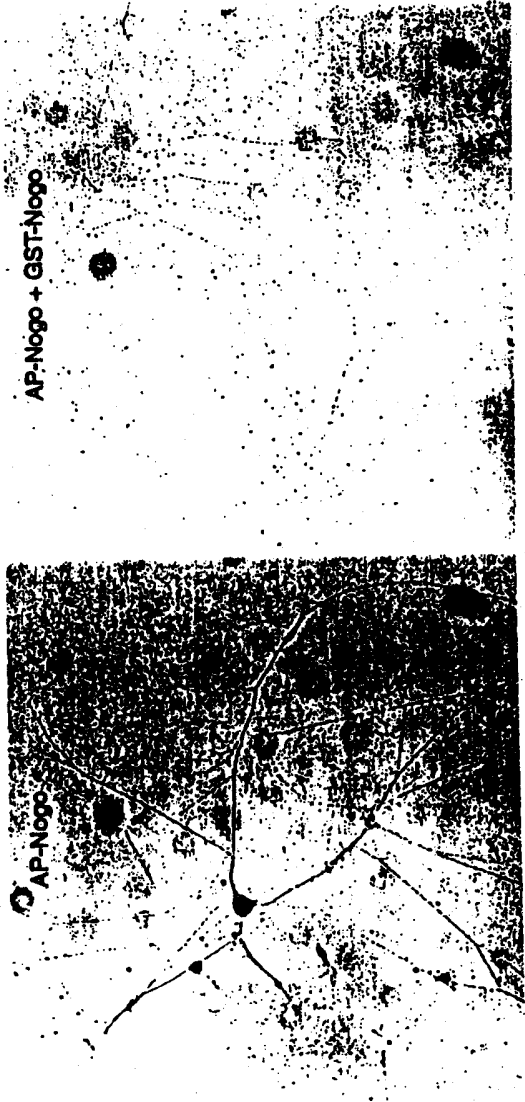
ФИГ. 4А



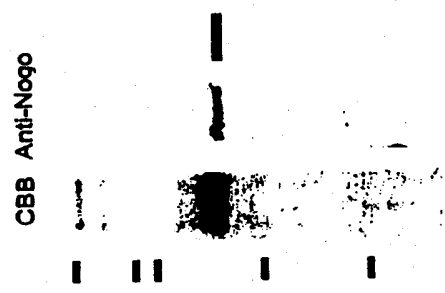
ФИГ. 4В



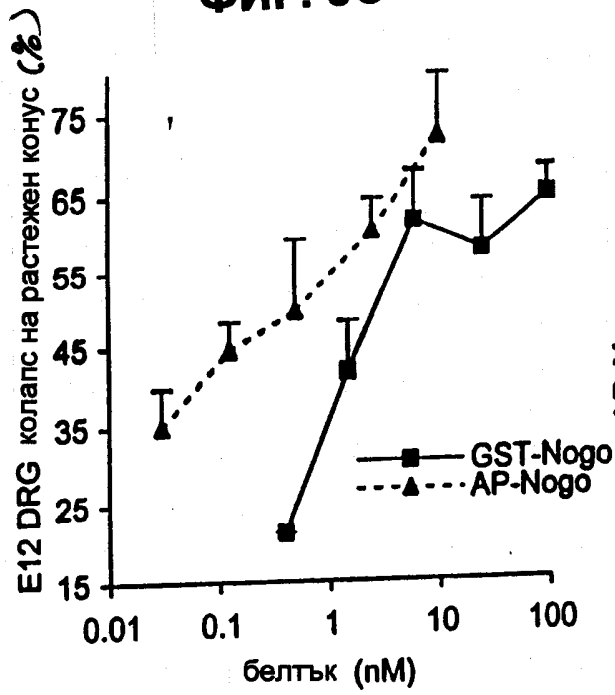
ФИГ. 5B



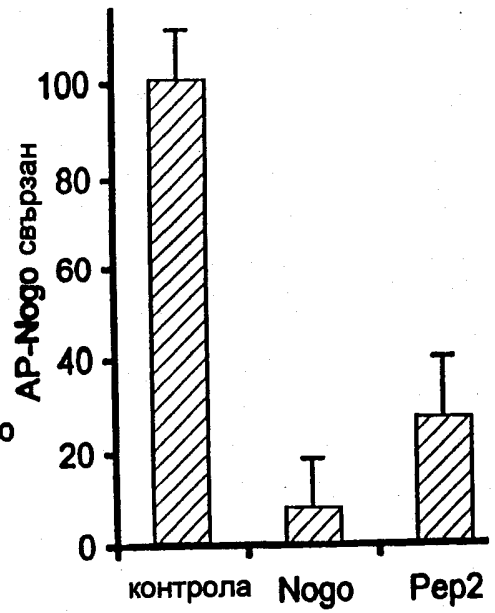
ФИГ. 5A



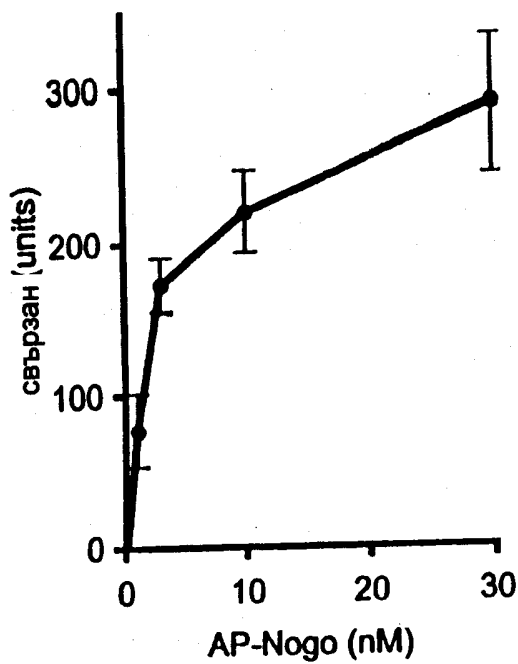
**ФИГ. 5С**



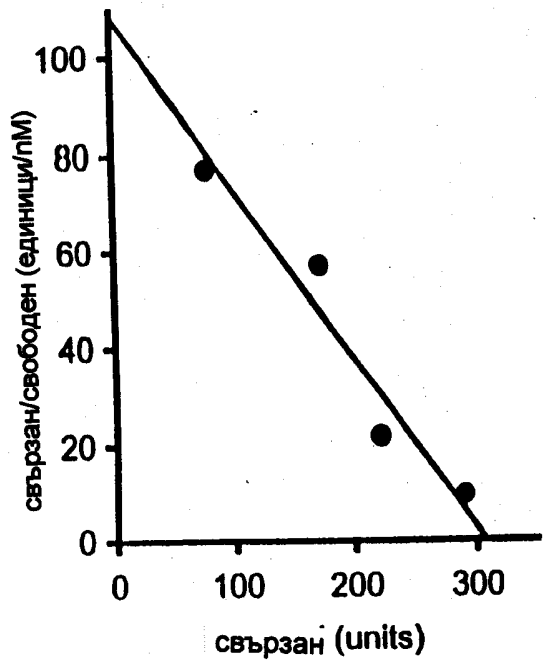
**ФИГ. 5D**



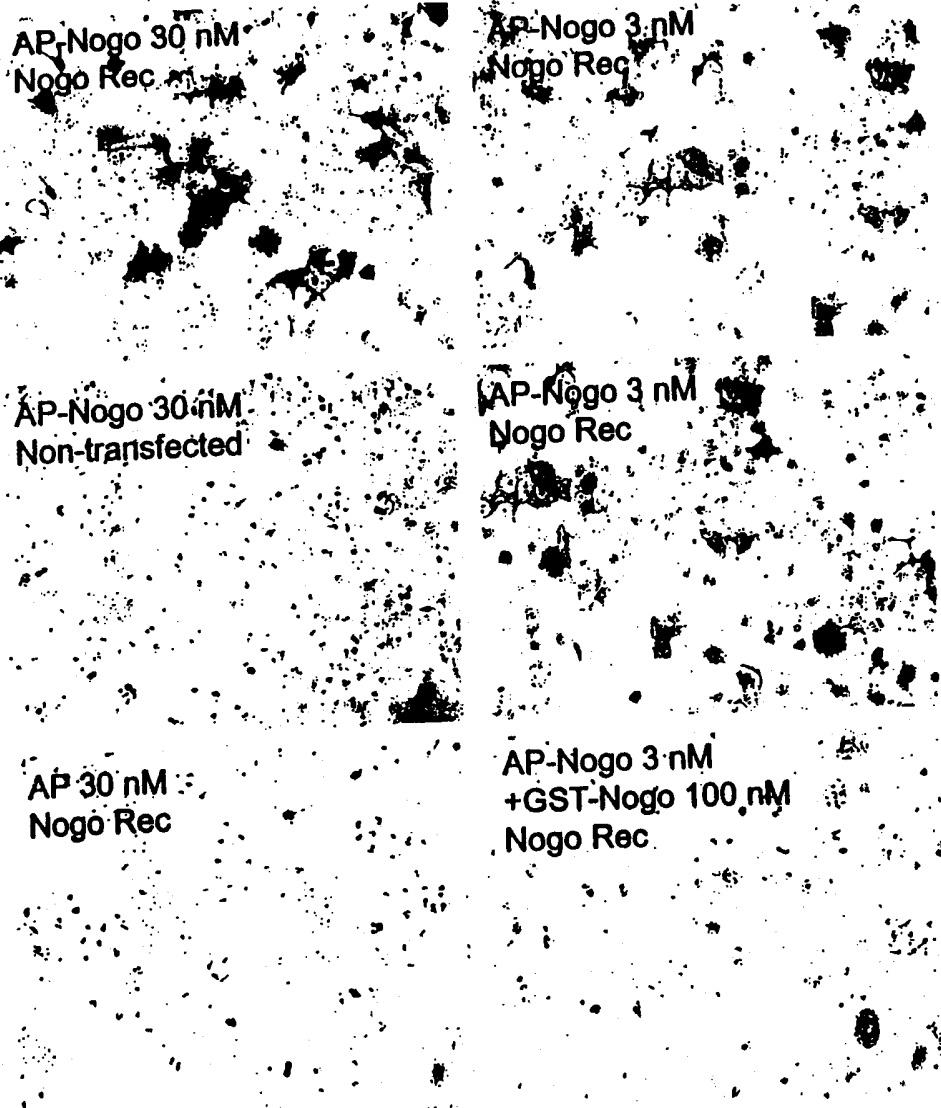
**ФИГ. 5E**



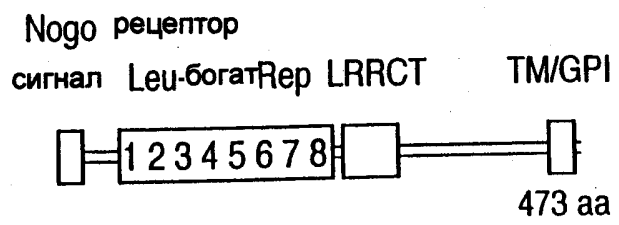
**ФИГ. 5F**



ФИГ. 6



**ФИГ. 7**





1

2

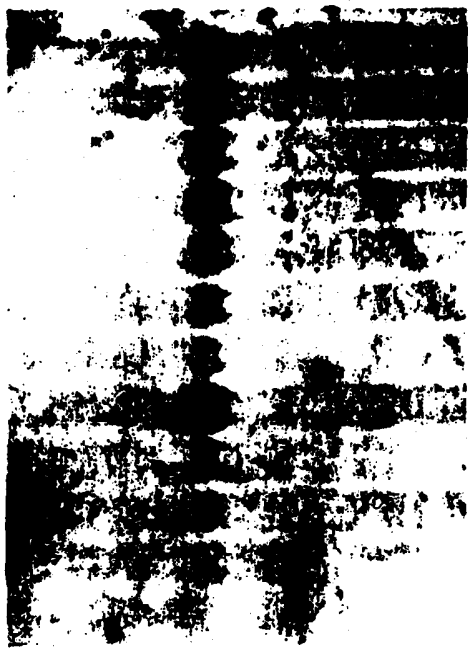
3

4

5

6

- мозък
- сърце
- бъбрек
- черен дроб
- бял дроб
- мускул
- кожа
- тънко черво
- далак
- стомах
- тестис
- тимус

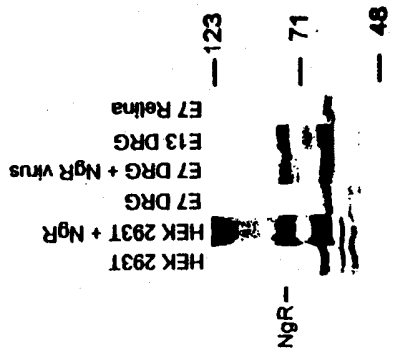


- фронтална кора
- париетална кора
- ент.рин.кора
- хипокамп
- обонятелна луковица
- Striatum
- Thalamus
- малък мозък
- среден мозък
- мост
- Medulla
- гръбначен мозък

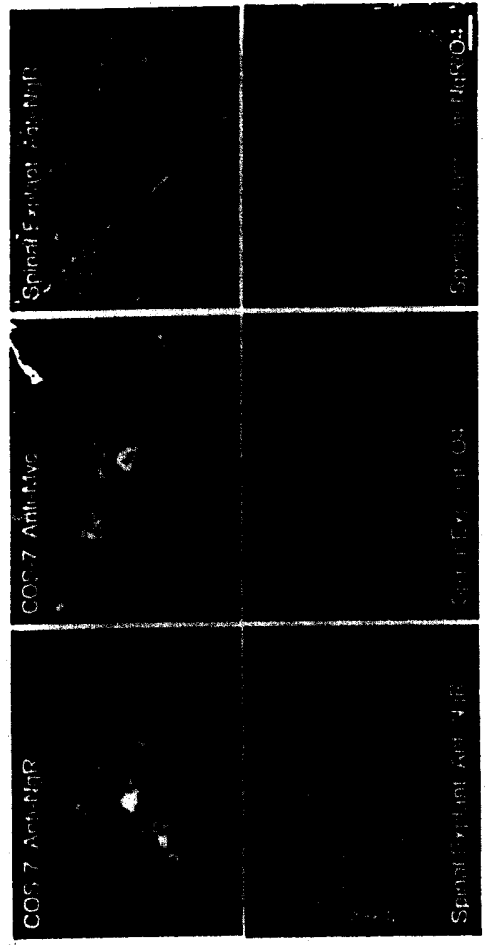
ФИГ. 8



ФИГ. 9А



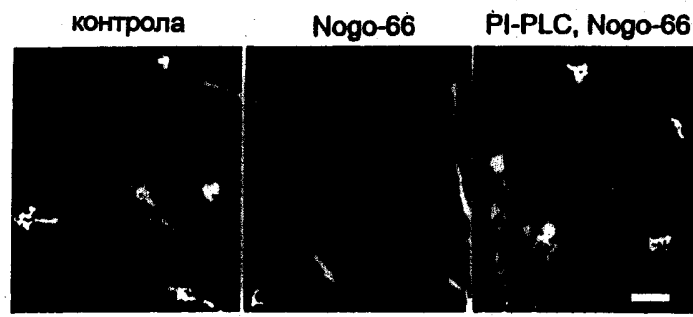
ФИГ. 9В



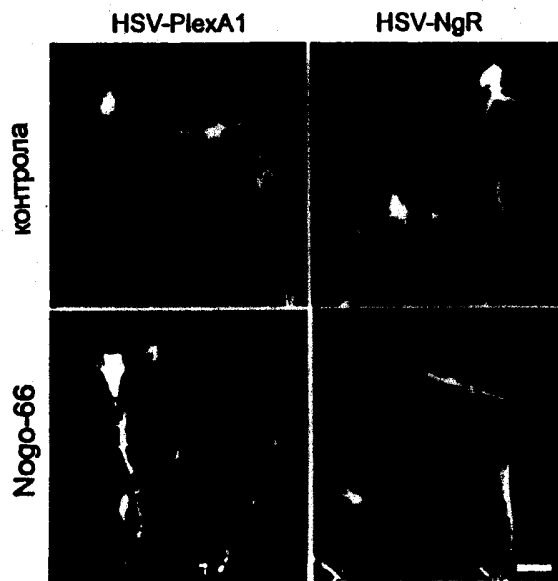
ФИГ. 9С

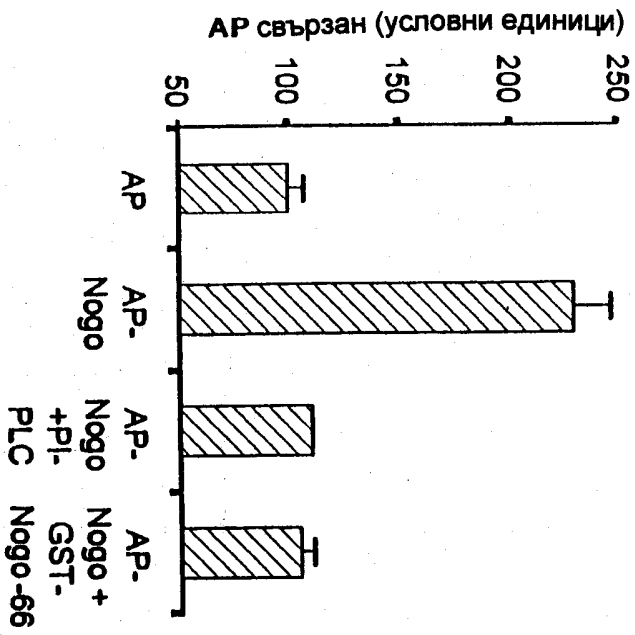


ФИГ. 10а

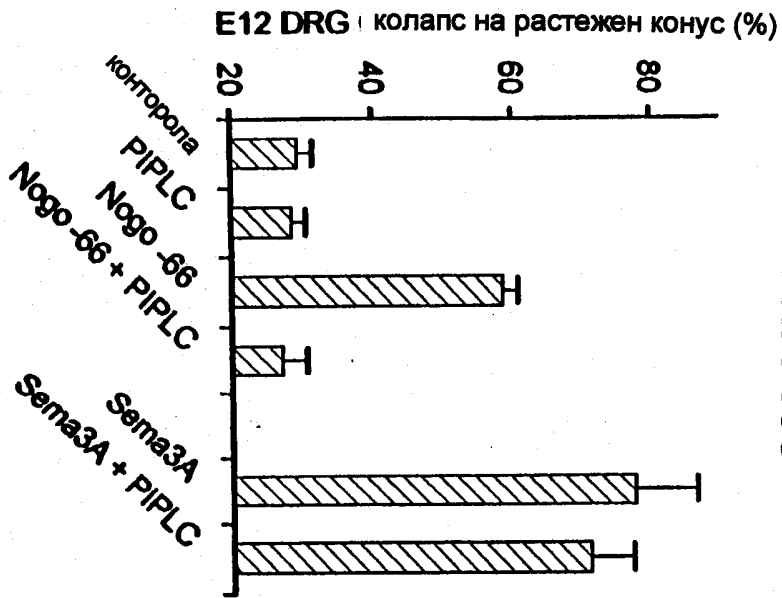


ФИГ. 10d

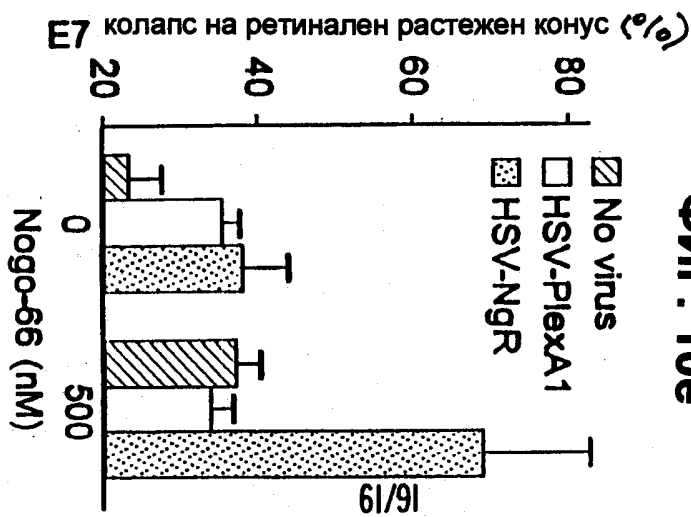




ФИГ. 10b



ФИГ. 10c



ФИГ. 10e

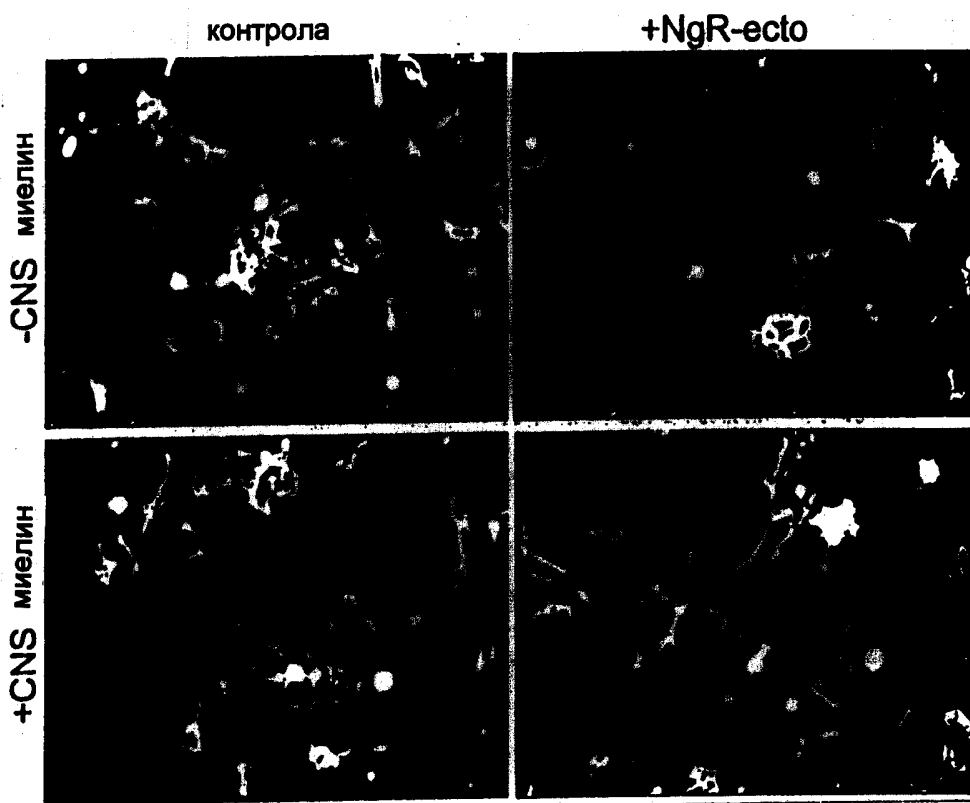
ФИГ. 11b



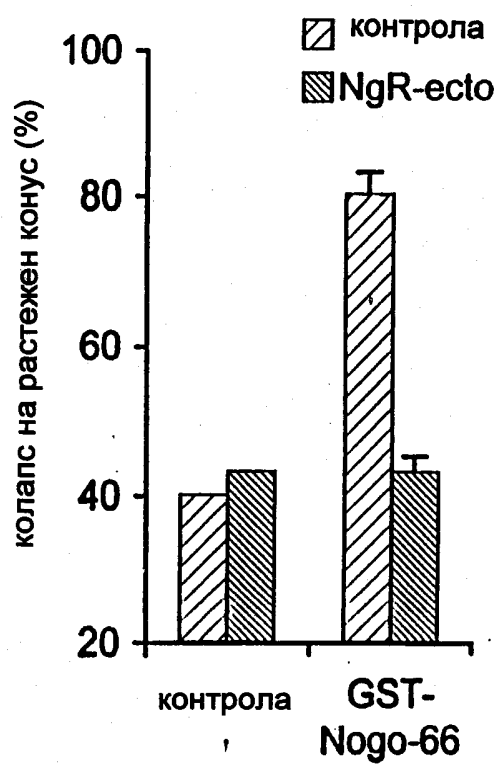
ФИГ. 11a

сигнал	Leu-богатРер	LRCT	TM/GPI	експресионно ниво	Ного свързване
[ ]	[12345678]	[ ]	[ ]	++	++
[ ]	[12345678]	[ ]	[ ]	++	++
[ ]	[12345678]	[ ]	[ ]	++	++
[ ]	[345678]	[ ]	[ ]	++	.
[ ]	[5678]	[ ]	[ ]	++	.
[ ]	[123456]	[ ]	[ ]	++	.
[ ]	[12345678]	[ ]	[ ]	++	.
[ ]	[12345678]	[ ]	[ ]	++	.

ФИГ. 12А



ФИГ. 12В



ФИГ. 12С

