

PŘÍHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: 12.01.2001

(32) Datum podání prioritní přihlášky: 12.01.2000 26.05.2000
29.09.2000

(31) Číslo prioritní přihlášky: 2000/175707 2000/207366
2000/236378

(33) Země priority: US US US

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: 16.10.2002
(Věstník č. 10/2002)

(86) PCT číslo: PCT/US01/01041

(87) PCT číslo zveřejnění: WO01/51520

(21) Číslo dokumentu:

2002 - 2438

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 K 14/705

A 61 K 38/17

A 61 P 25/00

(71) Přihlašovatel:

YALE UNIVERSITY, New Haven, CT, US;

(72) Původce:

Stritimatter Stephen M., New Haven, CT, US;

(74) Zástupce:

Hakr Eduard Ing., Přístavní 24, Praha 7, 17000;

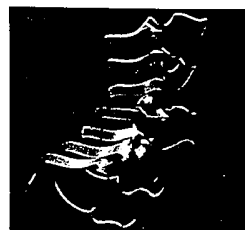
(54) Název přihlášky vynálezu:

**Nukleová kyselina kódující receptor Nogo,
izolovaný polypeptid a farmaceutický přípravek
pro stimulaci růstu axonů**

(57) Anotace:

Řešení se týká receptoru proteinu Nogo a biologicky aktivních fragmentů (ligandů) proteinu Nogo. Řešení se dále týká přípravků vhodných k modulaci exprese nebo aktivity proteinu Nogo nebo receptoru proteinu Nogo. Dalším předmětem řešení jsou peptidy, které blokují Nogo-zprostředkovanou inhibici prodlužování axonů. Přípravky podle řešení jsou užitečné k léčení poranění mozku a lebky, poranění míchy, mrtvice a všech onemocnění doprovázených demyelinizací.

Signální peptid	Repetice bonata na Leu LRACT	TM/GPI	Hladina exprese	Vazba Nogo
[12345678]	[12345678]	[12345678]	++	++
[12345678]	[12345678]	[12345678]	++	++
[12345678]	[12345678]	[12345678]	++	++
[12345678]	[12345678]	[12345678]	++	-
[12345678]	[12345678]	[12345678]	++	-
[12345678]	[12345678]	[12345678]	++	-
[12345678]	[12345678]	[12345678]	++	-
[12345678]	[12345678]	[12345678]	++	-



12.07.02

180 738/HK

1

PV 2002 - 243 f

**Nukleová kyselina kódující receptor Nogo, izolovaný polypeptid
a farmaceutický přípravek pro stimulaci růstu axonů**

Tato přihláška souvisí s prozatímní přihláškou U.S.A. č. 60/175,707 podanou 12. ledna 2000; č. 60/207,366 podanou 26. května 2000 a č. 60/236,378 podanou 29. září 2000, které jsou formou odkazu zahrnuty do předkládané přihlášky.

Předkládaný vynález byl z části podpořen vládou U.S.A., a sice grantem Národních ústavů pro lékařský výzkum (National Institute of Health) č. 5-R01-NS33020.

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká specificky nových humánních a myších genů, které kódují receptor proteinu Nogo. Tento receptor má schopnost regulovat růst axonů. Geny pro Nogo receptor jsou selektivně exprimovány v axonech a dendritech neuronů v centrálním nervovém systému v průběhu růstu axonů. Vynález se také týká přípravků a způsobů užitečných pro selektivní blokování inhibice růstu axonů zprostředkované Nogo receptory tím, že se blokuje interakce Nogo s receptorem Nogo. Blokování interakce Nogo s jeho receptorem vede k zablokování inhibičního účinku Nogo růst axonů a v důsledku toho umožňuje následné zvýšení růstu axonů.

Dosavadní stav techniky

Axony a dendrity neuronů jsou dlouhé buněčné výběžky neuronů. Na distálních koncích prodloužených axonů nebo

neuritů jsou specializované úseky známé jako růstový vrchol. Růstové vrcholy jsou zodpovědné za vnímání lokálního prostředí a za pohyb směrem k cílové buňce daného neuronu. Růstové vrcholy mají tvar ruky, s několika dlouhými filopodii, která diferenciálně adherují na povrchu embrya. Růstové vrcholy mohou vnímat několik různých impulsů, které je směřují, jako např. adhezivnost povrchu, růstové faktory, neurotransmitery (nervové přenašeče) a elektrické pole. Vedení (směrování) růstu špičky závisí na různých třídách adhezních molekul, intercelulárních signálech, a také faktorech, které stimulují a inhibují růstové vrcholy. Růstové vrcholy lokalizované na konci rostoucího neuritu se pohybují různými rychlostmi, typicky však rychlostí 1 až 2 milimetry za den. Špička sestává z široké a ploché rozšiřujících se oblasti s četnými dlouhými mikrovýběžky filopodií, která se hrotovitě protahují. Tato filopodia jsou soustavně aktivní. Zatímco se některá stahují zpět do růstové špičky, jiná se prodlužují a pokračují v prorůstání substrátu. Výběžky mezi různými filopodii vytvářejí lamelipodia.

Růstový vrchol může využít prostor, který má před sebou a na obou stranách, pro svá lamelipodia a filopodia. Když se výběžek dostane do kontaktu s povrchem, který není příznivý pro růst, stáhne se zpět. Když se výběžek dostane do kontaktu s povrchem, který je příznivý pro růst, pokračuje v prodlužování a může ovlivňovat i růstovou špičku pohybující se tímto směrem. Takže růst je směrován malými rozdíly ve vlastnostech povrchů substrátu. Když růstová špička dosáhne vhodné cílové buňky, vytvoří se synaptický spoj (synapse).

Neurony v centrálním nervovém systému (CNS) poškozené úrazem nebo nemocí neregenerují. Nemožnost regenerace axonů po poškození je připisována přítomnosti inhibitorů růstu axonů.

Tyto inhibitory jsou především spojeny s myelinem a tvoří podstatnou překážku v regeneraci. Inhibitory růstu axonů jsou přítomny v myelinu v CNS a v plazmatických membránách oligodendrocytů, které syntetizují myelin v CNS (Schwab et al., (1993) Ann. Rev. Neurosci. 16, 565-595).

Myelin v CNS představuje složité pokračování buněčné membrány oligodendrocytu. Jeden oligodendrocyt myelinizuje až třicet různých segmentů axonů CNS. Extenze oligodendrocytové membrány se obalí kolem axonů koncentrickým způsobem a vytvoří tak myelinovou pochvu. Kompaktní zralý myelin sestává z paralelních bimolekulárních vrstev lipidů s protivrstvami hydratovaných proteinů. Aktivní syntéza myelinu začíná již *in utero* a pokračuje po první dva roky lidského života. Pomalejší syntéza pokračuje ještě v průběhu dětství a adolescence, avšak metabolický obrat myelinu se v dospělosti zpomaluje. Jak vyvíjející se myelin tak i jeho zralá forma jsou náchylné k poškození v důsledku onemocnění nebo úrazu, které vedou k degradaci myelinu obklopujícího axony.

Inhibitory spojené s myelinem se zdají být primární příčinou selhání regenerace axonů v CNS *in vivo* po přerušení kontinuity axonu, zatímco jiné inhibitory růstu axonů, které nejsou spojeny s myelinem, hrají v CNS menší roli. Tyto inhibitory blokuji regeneraci axonů po poškození neuronů v důsledku úrazu, mrtvice nebo virové infekce.

Byly již charakterizovány četné inhibitory růstu axonů získané z myelinu (viz např. pro přehled David et al., (1999) W0995394547; Bandman et al., (1999) U.S. Patent 5,858,708; Schwab, (1996) Neurochem. Res. 21, 755-761). Bylo také popsáno několik složek bílé hmoty CNS, např. NI35, NI250 (Nogo) a glykoproteiny asociované s myelinem (MAG), které projevují

inhibiční aktivitu na prodlužování axonů (Schwab et al., (1990) W09005191; Schwab et al., (1997) U.S.Patent 5,684,133).

Konkrétně Nogo je s myelinem asociovaný inhibitor růstu axonů velikosti 250 kDa, který již byl klonován a charakterizován (Nagase et al., (1998) DNA Res. 5, 355-364; Schwab, (1990) Exp. Neurol. 109, 2-5). Nogo cDNA byla nejdříve identifikována náhodnou analýzou cDNA z mozku a nebyla jí přiřazena žádná předpokládaná funkce (Nagase et al., (1998) DNA Res. 5, 355-364).

Schwab s kolegy publikovali sekvence šesti peptidů náhodně získaných proteolytickým štěpením předpokládaného bovinního NI250 (Nogo) proteinu (Spillmann et al., (1998) J. Biol. Chem. 273, 19283-19293). Pravděpodobně úplná cDNA sekvence tohoto proteinu byla nedávno uložena o databáze GenBank. Tento humánní klon cDNA KIAA0886 velikosti 4,1 kilobáze, pochází z ústavu Kazusa DNA Research Institute jako důsledek snahy o náhodné sekvencování cDNA s vysokou molekulovou hmotností pocházející z mozku (Nagase et al., (1998) DNA Res. 31, 355-364). Nový cDNA klon kóduje protein velikosti 135 kDa, který obsahuje všech šest peptidových sekvencí pocházejících z bovinního Nogo.

Humánní sekvence Nogo-A sdílí vysokou míru homologie ve třetině směrem ke karboxylovému konci s proteinovou rodinou retikulonu (Rtn). Rtn1 byl označen jako neuro-endokrinní specifický protein (NSP), protože je exprimován výlučně v neuro-endokrinních buňkách (Van de Velde et al., (1994) J. Cell. Sci. 107, 2403-2416). Všechny proteiny Rtn sdílejí úsek sekvenční podobnosti velikosti 200 aminokyselinových zbytků na karboxylovém konci proteinu (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). Příbuzné sekvence byly nalezeny také v genomech much a červů (Moreira *et al.*, (1999) *Genomics* 58, 73-81). Tento úsek sdílí přibližně 70% identitu v rámci rodiny Rtn. Aminokoncové úseky nejsou navzájem příbuzné a pocházejí zřejmě z různých alternativně sestřižených RNA.

Z analýz sekvencí uložených v databázi GenBank a z homologie s publikovanými Rtnl isoformami byly predikovány tři formy Nogo proteinu (Nogo-A, Nogo-B, Nogo-C). Nogo-B velikosti 37 kDa by mohl odpovídat NI35, a vysvětlovat tak antigenní příbuznost NI35 a také inhibiční aktivitu NI250 (Nogo-A) na růst axonů. Nogo-C-Myc vykazuje elektroforetickou mobilitu odpovídající 25 kDa na SDS-PAGE a byl dříve popsán jako Rtn4 a vp2015. Schopnost proteinu Nogo-A inhibovat regeneraci axonů byla rozpoznána teprve v současné době (GrandPre *et al.*, (2000) *Nature* 403, 439-444; Chen *et al.*, (2000) *Nature* 403, 434-439; Prinjha *et al.*, (2000) *Nature* 403, 483-484).

Nemožnost obnovení růstu axonů v lézích CNS po poranění byla přičítána permanentnímu škodlivému účinku spojenému s úrazem, mrtvicí nebo poruchou vedoucí k demyelinizaci. Modulace NI250 byla popsána jako možný prostředek k léčení a regeneraci neuronů poškozených při úrazu, infarktu, degenerativním onemocnění CNS (Schwab *et al.*, (1994) W09417831; Tatagiba *et al.*, (1997) *Neurosurgery* 40, 541-546) nebo maligních nádorech CNS jako jsou glioblastomy (Schwab *et al.*, (1993) U.S. Patent 5,250,414; Schwab *et al.*, (2000) U.S. Patent 6,025,333).

Protilátky rozpoznávající NI250 byly popsány jako užitečné při diagnostice i léčení poškození nervů po úrazech, infarktu nebo při degenerativních onemocněních CNS (Schnell & Schwab, (1990) Nature 343, 269-272; Schwab et al., (1997) U.S. Patent 5,684,133). V axonech, které jsou myelinizovány, existuje korelace mezi vývojem myelinu a výskytem Nogo. Po zablokování Nogo pomocí protilátky, neurony se mohou opět prodlužovat i přes léze způsobené poškozením nervu (Varga et al., (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 10959-10963).

Mechanismus účinku, jak Nogo inhibuje růst axonů, nebyl dosud objasněn. Identifikace a charakterizace tohoto mechanismu účinku biochemických drah spojených s působením Nogo by byly velmi užitečné k léčení nemocí spojených s poškozením axonů a demyelinizací axonů.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález je založen na objevu receptorů Nogo proteinů a biologicky aktivních fragmentů Nogo proteinu (ligandů). Vynález poskytuje molekulu izolované nukleové kyseliny vybrané ze skupiny sestávající z molekuly izolované nukleové kyseliny kódující aminokyselinovou sekvenci uvedenou v seznamu sekvencí jako SEKVENCE ID. Č. 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 nebo 20; molekuly izolované nukleové kyseliny kódující fragment obsahující alespoň šest, například deset, patnáct, dvacet, pětadvacet, třicet, čtyřicet, padesát, šedesát nebo sedmdesát aminokyselin ze SEKVENCE ID. Č. 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 nebo 20; molekuly izolované nukleové kyseliny hybridizující s molekulou nukleové kyseliny obsahující komplement (tj. komplementární sekvenci) k sekvenci uvedené v seznamu sekvencí jako SEKVENCE ID. Č. 1, 3, 7, 9, 11, 13,

15, 17 nebo 19 v podmínkách vysoké stringence; a molekuly izolované nukleové kyseliny s alespoň 75%, například 80%, 85%, 90% nebo 95% aminokyselinovou sekvenční identitou k SEKVENCI ID. Č. 1, 3, 7, 9, 11, 13, 15, 17 nebo 19. Výhodné provedení vynálezu obsahuje molekulu izolované nukleové kyseliny obsahující nukleotidy 166 až 1584 ze SEKVENCE ID. Č. 1 nebo nukleotidy 178 až 1596 ze SEKVENCE ID. Č. 3.

Předkládaný vynález se dále týká molekul nukleové kyseliny operativně spojených s jedním nebo více expresními kontrolními prvky (tj. prvky, které regulují expresi), a vektorů obsahujících molekuly izolované nukleové kyseliny. Vynález se dále týká transformovaných hostitelských buněk, které obsahují molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu a způsobů přípravy proteinu, který zahrnuje krok kultivace hostitelských buněk transformovaných molekulou nukleové kyseliny podle vynálezu v podmínkách, kdy je tento protein exprimován.

Předkládaný vynález se týká izolovaného polypeptidu vybraného ze skupiny obsahující izolovaný polypeptid obsahující aminokyselinovou sekvenci uvedenou v seznamu sekvencí jako SEKVENCE ID. Č. 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 nebo 20; izolovaný polypeptid obsahující fragment, který obsahuje alespoň šest, například deset, patnáct, dvacet, pětadvacet, třicet, čtyřicet, padesát, šedesát nebo sedmdesát aminokyselin ze SEKVENCE ID. Č. 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 nebo 20; izolovaný polypeptid obsahující aminokyselinovou sekvenci uvedenou v seznamu sekvencí jako SEKVENCE ID. Č. 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 nebo 20 obsahující alespoň jednu, například pět, deset, patnáct nebo dvacet konzervativních aminokyselinových substitucí; izolovaný polypeptid obsahující aminokyselinovou sekvenci uvedenou v seznamu sekvencí SEKVENCE

ID. Č. 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 nebo 20 obsahující alespoň jednu, například pět, deset, patnáct nebo dvacet přirozeně se vyskytujících aminokyselinových substitucí, izolovaný polypeptid mající alespoň 75%, například 80%, 85%, 90% nebo 95% aminokyselinovou sekvenční identitu se sekvencí uvedenou v seznamu sekvencí jako SEKVENCE ID. Č. 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 nebo 20. Vynález se dále týká chimérických polypeptidů, které obsahují aminokyselinovou sekvenci uvedenou zde jako SEKVENCE ID. Č. 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 nebo 20.

Vynález dále poskytuje protilátky, které váží Nogo protein a protilátky, které váží Receptor Nogo proteinu. Protilátky podle vynálezu jsou buďto monoklonální nebo polyklonální protilátky.

Navíc protilátka podle vynálezu může být humanizovaná protilátka. Předkládaný vynález se také týká protilátkových fragmentů, která projevují vazebnou aktivitu k antigenu.

Vynález se dále týká způsobu identifikace agens, které moduluje expresi Nogo proteinu nebo receptoru Nogo proteinu, kterýžto způsob zahrnuje kroky, kdy se poskytnou buňky exprimující Nogo protein nebo receptor Nogo proteinu; buňky se přivedou do kontaktu s kandidátním agens; a detekuje se zvýšení nebo snížení hladiny exprese Nogo proteinu nebo receptoru Nogo proteinu v přítomnosti kandidátního agens vzhledem k hladině exprese Nogo proteinu nebo receptoru Nogo proteinu v nepřítomnosti kandidátního agens.

Vynález se dále týká způsobu identifikace agens, které moduluje alespoň jednu aktivitu Nogo proteinu nebo receptoru Nogo proteinu, kterýžto způsob zahrnuje kroky, kdy se poskytnou buňky exprimující Nogo protein nebo receptor Nogo proteinu; tyto buňky se přivedou do kontaktu s kandidátním

agens; a detekuje se zvýšení nebo snížení hladiny aktivity Nogo proteinu nebo receptoru Nogo proteinu v přítomnosti kandidátního agens vzhledem k hladině aktivity Nogo proteinu nebo receptoru Nogo proteinu aktivit v nepřítomnosti kandidátního agens. V jednom provedení vynálezu je aktivitou pohyb růstového vrcholu. V jiném provedení vynálezu je agens vybrán ze skupiny sestávající z fragmentů Nogo proteinu, anti-Nogo protilátky (tj. protilátky proti Nogo proteinu) anti-Nogo receptor protilátky (tj. protilátky proti receptoru Nogo proteinu).

Vynález se dále týká způsobu identifikace vazebného partnera pro receptor Nogo proteinu, kterýžto způsob zahrnuje kroky, kdy se poskytne receptor Nogo proteinu; Nogo receptor se uvede do kontaktu s kandidátním vazebným partnerem; a detekuje se vazba kandidátního vazebného partnera k receptoru Nogo proteinu. V jednom provedení je vazebný partner vybrán ze skupiny sestávající z fragmentů Nogo proteinu, anti-Nogo protilátky, fragmentu anti-Nogo receptor protilátky, a humanizované protilátky anti-Nogo receptor.

Vynález se dále týká léčení nemocí centrálního nervového systému u savců, které zahrnuje krok, kdy se savci podává účinné množství agens, které moduluje expresi Nogo proteinu nebo receptoru Nogo proteinu. V některých provedeních vynálezu je exprese snížena, zatímco v jiných provedeních je zvýšena.

Vynález se dále týká léčení nemocí centrálního nervového systému u savců, které zahrnuje krok, kdy se savci podává účinné množství agens, které moduluje aktivitu Nogo proteinu nebo receptoru Nogo proteinu. V některých provedeních vynálezu je aktivita snížena, zatímco v jiných provedeních je zvýšena.

Pokud je aktivita snížena, agens je například polypeptid obsahující aminokyselinovou sekvenci uvedenou v seznamu sekvencí jako SEKVENCE ID. Č. 8, 10, 12, 18 nebo 20; úplný receptor Nogo proteinu, fragment receptoru Nogo proteinu; rozpustný fragment receptoru Nogo proteinu; nebo protilátka anti-Nogo receptor nebo její aktivní fragment. Jestliže je aktivita zvýšena, agens je polypeptid vybraný ze skupiny sestávající ze SEKVENCÍ ID. Č. 14 a 16.

Rozpustný receptor Nogo proteinu obsahuje fragment alespoň šesti aminokyselin, například deset, patnáct, dvacet, pětadvacet, třicet, čtyřicet, padesát, šedesát nebo sedmdesát aminokyselin ze SEKVENCE ID. Č. 2 nebo 4; aminokyselinovou sekvenci uvedenou v seznamu sekvencí jako SEKVENCE ID. Č. 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 nebo 20; aminokyselinovou sekvenci uvedenou v seznamu sekvencí jako SEKVENCE ID. Č. 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 nebo 20 obsahující alespoň jednu, například pět, deset, patnáct nebo dvacet konzervativních aminokyselinových substitucí; aminokyselinovou sekvenci uvedenou jako SEKVENCE ID. Č. 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 nebo 20 obsahující alespoň jednu, tedy například pět, deset, patnáct nebo dvacet přirozeně se vyskytujících substitucí aminokyselinové sekvence.

V některých provedeních je porucha centrálního nervového systému důsledkem úrazu lebky nebo mozku, poranění míchy, infarktu (mrtvice) nebo nemoci doprovázené demyelinizací. K příkladům nemocí, při kterých dochází k demyelinizaci, patří roztroušená skleróza mozko-míšň (sclerosis multiplex), monofázická demyelinizace, encefalomyelitida, multifokální leukoencefalopatie, panencefalopatie, Marchiafava-Bignamiho nemoc, myelinolýza (Varolova) mostu, adrenoleukodystrofie, Pelizaeus-Merzbacherova nemoc, spongiózní degenerace,

Alexanderova nemoc, Canavanova nemoc, metachromatická leukodystrofie, Krabbeho nemoc.

Vynález se dále týká izolovaného peptidu, který se specificky váže na receptor Nogo proteinu. Specifická vazba peptidu na receptor Nogo proteinu má výhodně alespoň jeden z následujících účinků: inhibice vazby Nogo proteinu na receptor Nogo proteinu, blokování Nogo-zprostředkované inhibice růstu axonů, modulace exprese Nogo proteinu nebo modulace exprese receptoru Nogo proteinu. V některých provedeních izolovaný peptid obsahuje aminokyselinovou sekvenci uvedenou v seznamu sekvencí jako SEKVENCE ID. Č. 8, 10, 12, 14, 16, 18 nebo 20, nebo jednu z výše uvedených, s alespoň jednou, tedy například pěti, deseti, patnácti nebo dvaceti postupnými aminokyselinovými substitucemi nebo přirozeně se vyskytujícími aminokyselinovými substitucemi.

Popis obrázků

Obrázek 1 - Srovnání domén Nogo

(a) je schéma shrnující vlastnosti Nogo proteinů, které byly použity v předkládané studii. (b) je fotografie NIH-3T3 fibroblastů kultivovaných na povrchu potaženém Amino-Nogo, GST-Nogo-66 nebo bez proteinu, a barvených na přítomnost vláknitého aktinu (měřítko: úsečka je 40 μm). (c) je fotografie kuřecích E12 ganglií dorzálních kořenů kultivovaných na povrchu potaženém Amino-Nogo, GST-Nogo-66 nebo bez proteinu (vázané na substrát) nebo 100 nM Nogo proteinu (rozpuštěný) (měřítko: úsečka je 40 μm). (d) je fotografie gelu a

"imunoblotu" (membrány s přeneseným proteinem), kde byl purifikovaný Amino-Nogo-Myc-His protein analyzován SDS-PAGE a obarven modří Commassie Brilliant Blue (CBB) nebo imunochemicky detekován užitím anti-Myc protilátky (Myc) (markery molekulové hmotnosti odpovídající 200, 116, 97, 65 & 45 kDa jsou vlevo). (e) je graf ukazující experimentální data, kde bylo měřeno procento 3T3 fibroblastů s plochou větší než $1200 \mu\text{m}^2$ (rozprostřenou) v experimentech jako v (b) na Nogo-potaženém povrchu (černě) nebo s rozpustným 100 nM Nogo preparátem (modře) (AM, Amino-Nogo; AM+Myc, Amino-Nogo preinkubovaný s anti-Myc protilátkou; AM+Myc+Mo, AM+Myc preinkubovaný s anti-myší IgG protilátkou; Myc+Mo, anti-Myc protilátka a anti-myší IgG protilátka). (f) je graf ukazující experimentální data, kde bylo stanoveno procento rozprostřených COS-7 buněk po kultivaci na Nogo-potaženém povrchu nebo s rozpustným 100 nM Nogo preparátem. (g) je graf ukazující experimentální data, kde byl hodnocen účinek purifikovaných preparátů GST-Nogo-66 nebo Amino-Nogo na morfologii růstového vrcholu u kultur E 12 ganglií dorzálních kořenů při uvedených koncentracích po třiceti minutách. To ukazuje, že GST-Nogo-66 byl v tomto testu o dva řády účinnější než Amino-Nogo. (h) je graf ukazující experimentální data, kde byl kvantifikován růst neuritů na buňku u kultur E 13 ganglií dorzálních kořenů jako v experimentech v (c) na Nogo-potaženém povrchu nebo s rozpustným 100 nM Nogo preparátem. (i) je graf ukazující experimentální data, kde byl měřen účinek Nogo preparátů na růst neuritů v granulárních neuronech mozečku.

Obrázek 2 - fragmenty Nogo antagonizují působení Nogo a myelinizaci CNS

(a) je fotografie explantátů kuřecích ganglií dorzálních kořenů E12, které byly kultivovány a bylo hodnoceno hroucení růstového vrcholu jak je popsáno u obrázku 4. Kultury byly vystaveny na 30 minut působení následujících preparátů a pak byly fixovány a barveny rhodaminem-faloidinem: samotný pufr (kontrola); 15 nM GST-Nogo (Nogo); 1 μ M každého z Pep1, Pep2 a Pep3 (Pep); 15 nM GST-Nogo a 1 μ M každého z Pep1, Pep2 a Pep3 (Nogo + Pep). Zhroucení růstového vrcholu účinkem Nogo bylo blokováno přidáním peptidu. Pep1, aminokyselinové zbytky 1-25 extracelulární domény, Pep2, zbytky 11-35; a Pep3, zbytky 21-45. (b) je graf kvantifikující výsledky testů hroucení růstového vrcholu jako v (a). Jednotlivé peptidy byly použity jako 4 μ M, a směsi peptidů 1-3 byly 1 μ M pro každý peptid. CNS myelin byl připraven jak je popisováno, a uvedené koncentrace celkového myelinu byly přidány ke kulturám. Všechny uvedené výsledky jsou průměrné hodnoty $\pm$ střední chyba průměru (s.e.m.) vypočtené ze sedmi opakování. Hodnoty statisticky významně odlišné od odpovídajících hodnot pro Nogo nebo myelin bez peptidu jsou označeny hvězdičkou ($p < 0,05$, Studentův dvoustranný t test).

Obrázek 3 - Nogo antagonist Pep2-41

(a) je graf ukazující výsledky testů hroucení růstového vrcholu kuřecích ganglií dorzálních kořenů E12. Tyto testy byly prováděny a kvantifikovány postupem, který publikovali GrandPre et al., (2000) Nature 403, 439-444. Testy byly provedeny bez přidání jakékoliv látky (kontrola), s 15 nM

GST-Nogo (Nogo) nebo 15 nM GST-Nogo a 1 μ M Pep2-41 (Nogo-Pep). Uvedené hodnoty jsou průměrné hodnoty $\pm$ střední chyba průměru (s.e.m.) vypočtené ze čtyř opakování. (b) je graf ukazující výsledky vazebných experimentů, kde byla měřena vazba 10 nM AP-Nogo na neurony kuřecích ganglií dorzálních kořenů E12 postupem podle obr. 4 za přidání uvedených koncentrací Pep2-41.

Obrázek 4 - Nogo Pep2-41 brání inhibici růstu neuritů jak Nogo tak CNS myelinem

Tento obrázek je graf znázorňující výsledky růstových (expanzních) testů, kdy neurony byly kultivovány za přítomnosti uvedených koncentrací Pep2-41, purifikovaného GST-Nogo (GST-Nogo-66) protein a surového CNS myelinového proteinu. Neurony kuřecích ganglií dorzálních kořenů E13 byly kultivovány za standardních podmínek. Pro růstové (expanzní) testy byly neurony kultivovány v přítomnosti Pep2-41, purifikovaného GST-Nogo (GST-Nogo-66) protein a surového CNS myelinového proteinu. Výsledek ukazuje, že Pep2-41 je schopen zvrátit inhibici růstu (expanze) neuritu způsobenou buďto GST-Nogo nebo celkovým CNS myelinem.

Obrázek 5 - Ligandový vazebný test pro axonové receptory Nogo

(a) je fotografie gelu a imunoblotu (membrány po imunopřenosu), kde His-AP-Nogo (66 aminokyselin) protein byl exprimován v buňkách HEK293T, purifikován prostřednictvím His značky (His-tag) z kondiciovaného média na pryskyřici obsahující nikl. Purifikovaný protein byl analyzován na SDS-

PAGE a barven na celkový protein CBB nebo imunochemicky detekován po přenosu na membránu užitím anti-Nogo protilátky (anti-Nogo). Marker molekulové hmotnosti pro velikosti 200, 116, 97, 65 a 45 kDa je ukázán vlevo, migrace AP-Nogo vpravo.

(b) je fotografie disociovaných neuronů kuřecích ganglií dorzálních kořenů E12, které byly inkubovány s 10 nM AP-Nogo nebo 10 nM AP-Nogo + 160 nM GST-Nogo po šedesát minut při 23 °C. buňky byly opláchnuty, fixovány a inkubovány při 60 °C, aby se inaktivovala endogenní AP. Navázaný AP-Nogo byl detekován inkubací s tetrazoliovou nitromodří. Bylo patrné, že intenzivní zbarvení neuronů AP-Nogo bylo nahrazeno neznačeným ligandem. (c) je graf ukazující experimentální data, kde byl hodnocen účinek AP-Nogo a GST-Nogo na kolaps růstových vrcholů neuronů kuřecích ganglií dorzálních kořenů E12, jak je podrobněji popsáno v příkladech. Hodnota EC_{50} pro AP-Nogo byla stanovena jako 1 nM nebo nižší. Na obrázku jsou uvedeny hodnoty průměru $\pm$ střední chyba průměru (s.e.m.) vypočtené z pěti až osmi opakování. (d) je graf ukazující experimentální data, kde byla hodnocena vazba 10 nM AP-Nogo na kuřecí neurony ganglií dorzálních kořenů E12, buďto samotná nebo za přítomnosti 100 nM GST-Nogo nebo za přítomnosti 4 μ M Pep2, která byla kvantifikována jako v (b) postupem, který je podrobně popsán v příkladech. Hodnoty průměru $\pm$ střední chyba průměru (s.e.m.) vypočtené z osmi opakování jsou uvedeny). (e) je graf ukazující experimentální data, kde byla měřena vazba AP-Nogo na neurony ganglií dorzálních kořenů jako funkce koncentrace AP-Nogo. Ukázán je jeden ze šesti experimentů, které poskytly podobné výsledky. (f) je graf v souhrnu prezentující data z (e) znovu vynesená v podobě Scatchardova grafu. Hodnota zjevné K_a pro vazbu AP-Nogo na kuřecí neurony ganglií dorzálních kořenů E12 byla stanovena na 3 nM.

Obrázek 6 - vazba Nogo na buňky COS-7 exprimující Nogo receptor

Tento obrázek je fotografie COS-7 buněk, které byly transfekovány expresním vektorem kódujícím myší Nogo receptor. Dva dny po transfekci byla vazba AP-Nogo nebo AP vyhodnocena postupem, který je podrobně popsán v příkladech pro neurony ganglií dorzálních kořenů. Byla detekována selektivní vazba AP-Nogo na buňky exprimující Nogo receptor. Vazba byla silně redukována v přítomnosti nadbytku Nogo peptidu, který nebyl fúzován s AP.

Obrázek 7 - Struktura Nogo receptoru

Tento schematický diagram ilustruje hlavní strukturní rysy Nogo receptoru.

Obrázek 8 - distribuce mRNA pro Nogo receptor.

Tento obrázek je fotografie Northern blot analýzy vzorků polyA+ RNA na mRNA Nogo receptoru na myších tkáních (uvedeno vlevo) a vzorků celkové RNA z různých oblastí mozku laboratorních potkanů (uvedeno vpravo). Migrace velikostního markeru RNA je ukázána vlevo.

Obrázek 9 - imunohistologická analýza Nogo-66 receptoru

(a) je fotografie imunoblotu, kde membránová frakce (10 µg proteinu) z uvedených buněk nebo kuřecí tkáně byla analyzována pomocí imunoblotování s protilátkou anti-Nogo-66 receptor (marker molekulární hmotnosti v kDa je vpravo).

(b) je fotografie COS-7 buněk exprimujících Myc-Nogo-66 receptor nebo explantátů E5 kuřecí míchy (osm dnů *in vitro*) po obarvení pomocí protilátky anti-Nogo-66 receptor, anti-Myc nebo oligodendrocyt-specifické protilátky O4. Dolní tři panely ukazují dvojité imunohistochemické značení stejných oblastí (měřítko: úsečka je 40 μm pro tři horní panely a 80 μm pro tři spodní panely).

(c) je fotografie vibratomových řezů z paraformaldehydem fixovaných dospělých mozků nebo míchy obarvených pomocí preparátu protilátky anti-Nogo-66 receptor. To ukazuje značení axonálních profilů (šipky) jak v oblasti mostu (*pons*) tak i míchy. Značení bylo významně sníženo v přítomnosti 10 $\mu\text{g/ml}$ antigenu GST-Nogo-66 receptoru.

Obrázek 10 - Nogo-66 receptor zprostředkovává zhroucení (kolaps) růstového vrcholu působením Nogo-66

(a) je fotografie kuřecích E12 DRG explantátů exponovaných Nogo-66 po předchozím ošetření PI-PLC nebo pufrem. Značení F-aktinu v axonech je ilustrováno (měřítko: úsečka je 40 μm).

(b) je graf shrnující experimentální výsledky vazby 3 nM AP nebo AP-Nogo na disociované neurony kuřecích ganglií dorzálních kořenů E12. Kde je to uvedeno, kultury byly předem ošetřeny PI-PLC nebo byl při inkubaci s AP-Nogo přidán 1 nM GST-Nogo-66.

(c) je graf shrnující měření kolapsu růstového vrcholu z experimentů uvedených v (a). Kuřecí kultury E12 DRG byly podrobeny působení PI-PLC nebo byly bez před expozicí 30 nM GST-Nogo-66 nebo 100 pM Sema3A.

(d) je fotografie E7 buněčných explantátů ganglií retiny

infikovaných kontrolním virem (HSV-PlexinA1) nebo HSV-Myc-Nogo-66 receptorem, a pak inkubovaných s nebo bez Nogo-66. Značení faloidinem růstových vrcholů axonů je zobrazeno (měřítko: úsečka je 25 μm).

(e) je graf kvantifikující zhroucení růstových vrcholů v neinfikovaných nebo virem infikovaných E7 neuronech retiny jako v (d).

Obrázek 11 - Strukturně-funkční analýza Nogo-66 receptoru

(a) je schematický diagram různých delečních mutantů Nogo-66 receptoru. Tyto mutanty byly pomocí imunoblotu hodnoceny na vazbu AP-Nogo a z hlediska míry exprese. Repetice bohaté na leucin a repetice bohaté na leucin na karboxylovém konci jsou nezbytné pro vazbu Nogo, ale zbytek proteinu není. Druhý protein byl testován po purifikaci a imobilizaci.

(b) je diagram predikované trojrozměrné struktury úseků prvních sedmi repetitivních bohatých na leucin z Nogo-66 receptoru. Model pochází z počítačového modelování na základě predikované struktury příbuzných repetitivních (opakovaných sekvencí) bohatých na leucin z leutropinového receptoru (Jiang *et al.*, (1995) Structure 3, 1341-1353). Modelování bylo provedeno pomocí programu Swiss-Model dostupného na www.expasy.ch/spdbv. Jsou ukázány také úseky se sekundární strukturou beta-listu a alfa-šroubovice.

Obrázek 12 - Rozpustný Nogo receptor blokuje Nogo-66

Kuřecí E13 DRG neurony byly kultivovány za standardních podmínek. V analýze kolapsu růstového vrcholu bylo přidáno kondicionované médium z buněk 293T secernujících ektodoménový fragment zahrnující aminokyseliny 1-348 myšího Nogo receptoru

nebo kontrolní kondicionované médium spolu se 100 nM Nogo-66. Na levém dolním panelu jsou v grafu uvedena data demonstrující, že Nogo-indukovaný kolaps je blokován pomocí rozpustného receptorového fragmentu. Pro růstové testy byly neurony kultivovány v přítomnosti kontrolního nebo kondicionovaného média s Nogo receptorovou ektodoménou spolu s Nogo-66 proteinem (50 nM) nebo myelinem z centrálního nervového systému (15 µg celkového proteinu/ml). Čtyři horní panely ukazují fotografie demonstrující, že myelin centrálního nervového systému inhibuje růst (expanzi) a že je tato inhibice blokována v přítomnosti ektodoménového proteinu Nogo receptoru. Růst je kvantifikován v grafu na dolním panelu vpravo.

I. Definice

Pokud není výslovně definováno jinak, všechny technické a vědecké termíny použité v tomto popisu mají stejný význam, jaký je obecně srozumitelný odborníkům z oboru, do kterého spadá předkládaný vynález. Ačkoliv při realizaci vynálezu lze užít jakékoliv metody nebo materiály podobné nebo ekvivalentní s těmi, které jsou popsány zde, v předkládané přihlášce jsou popsána výhodná provedení.

Termín "axon" použitý v tomto textu se týká dlouhých buněčných výběžků neuronů, které vedou eferentní (vycházející) akční potenciály z těla nervové buňky směrem k cílovým buňkám.

Termín "růst axonů" použitý v tomto textu se týká prodlužování výběžků nebo axonů, které vycházejí z těla buňky a končí růstovým vrcholem.

Termín "porucha/nemoc centrálního nervového systému" použitý v tomto textu se týká jakéhokoliv patologického stavu spojeného s abnormální funkcí centrálního nervového systému (CNS). Termín zahrnuje, avšak není takto omezen, změny funkce CNS v důsledku fyzického traumatu mozkové tkáně, v důsledku virové infekce, autoimunitních mechanismů, genetických mutací, neurodegenerativních onemocnění nebo poruch.

Termín "chimérní protein" (příp. „chimérický protein“) použitý v tomto textu se týká jakéhokoliv polypeptidu, který není plně homologní s aminokyselinovou sekvencí divokého typu nebo je kódován nukleovou kyselinou, která je získána sestřihem dvou odlišných zdrojových nukleových kyselin. Termín zahrnuje, ale není tak omezen, fúzní proteiny a proteiny konstruované tak, že obsahují jednu nebo více aminokyselinových substitucí, které odlišují jejich aminokyselinovou sekvenci od aminokyselinové sekvence divokého typu.

Termín "demyelinizační nemoc" použitý v tomto textu se týká patologického stavu (poruchy, nemoci), který je charakterizován degradací myelinové pochvy membrány oligodendrocytů.

Termín "růstový vrchol" použitý v tomto textu se týká specializovaného úseku špičky (vrcholu) rostoucího neuritu, který je zodpovědný za vnímání (detekci) lokálního prostředí a za pohyb axonu směrem k vhodné synaptické cílové buňce.

Termín "pohyb růstového vrcholu" použitý v tomto textu se týká prodlužování (extenze) nebo hroucení (příp. zpětného stahování) neboli kolapsu růstového vrcholu ve směru k cílové buňce neuronu.

Termín "neurit" použitý v tomto textu se týká obecně jakéhokoliv výběžku vyrůstajícího z neuronu. Jelikož je někdy

obtížné v kultuře odlišit dendrit od axonu, termín neurit je používán pro oba typy.

Termín "oligodendrocyt" použitý v tomto textu se týká neurogliových buněk CNS, jejichž funkcí je myelinizovat axony CNS.

Termín "polypeptid" použitý v tomto textu se týká peptidu, který po hydrolýze poskytne více než dvě aminokyseliny, a je nazýván tripeptid, tetrapeptid, atd. podle počtu aminokyselin v polypeptidu obsažených. Termín "polypeptid" je v tomto textu používán jako synonymum s termíny "protein" a "peptid".

II. Specifická provedení vynálezu

A. Receptor Nogo proteinu a peptidová agens pro receptor Nogo proteinu

Předkládaný vynález poskytuje izolovaný protein, alelické varianty tohoto proteinu a konzervativní aminokyselinové substituce tohoto proteinu. Protein nebo polypeptid se v tomto textu týká proteinového receptoru Nogo, který má humánní aminokyselinovou sekvenci uvedenou v seznamu sekvencí jako SEKVENCE ID. Č. 2 nebo myší aminokyselinovou sekvenci uvedenou zde jako SEKVENCE ID. Č. 4. Protein nebo polypeptid se také týká peptidů identifikovaných jako peptidové agens Nogo receptoru, které má aminokyselinovou sekvenci uvedenou v seznamu sekvencí jako SEKVENCE ID. Č. 8, 10, 12, 14, 16, 18 a 20. Vynález také zahrnuje přirozeně se vyskytující alelické varianty proteinů, které mají mírně odlišnou aminokyselinovou sekvenci, než která je specificky uvedena výše, avšak uchovávají si stejnou nebo podobnou biologickou funkci spojenou s humánním nebo myším proteinovým Nogo receptorem a

peptidovým agens Nogo receptoru uvedeným v seznamu sekvencí jako SEKVENCE ID. Č. 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 a 20.

Jak se užívá v tomto textu, proteinová rodina příbuzná proteinovým receptorům Nogo se týká proteinů, které byly izolovány z dalších organismů navíc k člověku a myši. Metody použité k identifikaci a izolaci další členů proteinové rodiny receptoru Nogo jsou popsány níže.

Peptidová agens proteinového Nogo receptoru podle předkládaný vynález jsou výhodně v izolované formě. Jak se v tomto textu užívá, protein nebo ligand je v izolované formě nebo izolovaný, když byly použity fyzikální, mechanické nebo chemické metody k odstranění buněčných složek, které jsou normálně s proteinem spojeny. Odborník snadno užije standardní purifikační metody pro získání izolovaného proteinu nebo ligandu.

K proteinům podle předkládaného vynálezu dále patří konzervativní varianty proteinových ligandů popsaných v tomto textu. V kontextu předkládaného popisu konzervativní varianta se týká změn v aminokyselinové sekvenci, které nemají nežádoucí škodlivý účinek na biologickou funkci proteinu. Substituce, inserce nebo delece má škodlivý účinek, jestliže změněná sekvence zabraňuje nebo ruší biologickou funkci spojenou s proteinem. Například celkový náboj, struktura nebo hydrofobní-hydrofilní vlastnosti proteinu mohou být změněny, aniž by došlo ke škodlivému ovlivnění biologické aktivity. Tudiž aminokyselinová sekvence může být změněna, například tak, že peptid je více hydrofobní nebo hydrofilní, aniž by se negativně ovlivnila biologická aktivita proteinu.

Zpravidla alelické varianty, konzervativně substituované varianty a členové proteinové rodiny mají aminokyselinovou sekvenci mající alespoň 75% sekvenční aminokyselinovou

identitu s humánními a myšími sekvencemi uvedenými v seznamu sekvencí jako SEQUENCE ID. Č. 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 a 20, výhodně alespoň 80%, ještě výhodněji alespoň 90%, nejvýhodněji alespoň 95% sekvenční aminokyselinovou identitu. Identita nebo homologie vzhledem k takovým sekvencím je definována v tomto textu jako procento aminokyselinových zbytků v kandidátní sekvenci, které je identické se známým peptidem, po porovnání ("alignement") sekvencí se zavedením mezer ("gaps"), pokud je to nutné k dosažení co nejlepší (maximální) homologie, přičemž konzervativní substituce se nepovažují za součást sekvenční identity. N-koncové, C-koncové nebo interní extenze, delece nebo inserce v peptidové sekvenci nemají být vykládány jako ovlivňující homologii.

Takže k proteinům a peptidům podle předkládaného vynálezu patří molekuly obsahující aminokyselinovou sekvenci uvedenou v seznamu sekvencí jako SEQUENCE ID. Č. 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 nebo 20, její fragmenty obsahující souvislou sekvenci alespoň 3, 4, 5, 6, 10, 1 S. 20, 25, 30, 35 nebo více aminokyselinových zbytků proteinového Nogo receptoru nebo peptidového agens, varianty aminokyselinové sekvence, kde alespoň jeden aminokyselinový zbytek byl vložen do nebo na N- nebo C-konec uvedené sekvence: varianty popsané aminokyselinové sekvence nebo jejich fragmenty, jak byly definovány výše, které byly substituovány dalším zbytkem. K uvažovaným variantám patří také ty, které obsahují predeterminované mutace získané například homologní rekombinací, místně cílenou mutagenezí nebo PCR mutagenezí, a odpovídající proteiny dalších živočišných biologických druhů, jako je např. králík, laboratorní potkan, prase, kráva, ovce, kůň nebo non-humánní primáti, aniž by však tento výčet vynález omezoval, alely nebo další přirozeně se vyskytující varianty proteinové rodiny, a deriváty, kde protein byl kovalentně

modifikován substitucí, chemickým nebo enzymatickým způsobem nebo dalším vhodným způsobem další skupinou jinou než je přirozeně se vyskytující aminokyselina (například detekovatelnou skupinou, markerem, jako je například enzym nebo radioisotop).

Jak je dále podrobněji popsáno, členy proteinové rodiny mohou být použity: (1) k identifikaci agens, která modulují alespoň jednu aktivitu proteinu, (2) ve způsobech identifikace vazebných partnerů proteinu, (3) jako antigeny k indukci polyklonálních nebo monoklonálních protilátek, a 4) jako terapeutická agens.

B. molekuly nukleové kyseliny

Předkládaný vynález dále poskytuje molekuly nukleové kyseliny, které kódují proteiny a peptidy obsahující aminokyselinovou sekvenci uvedenou v seznamu sekvencí jako SEQUENCE ID. Č. 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 a 20 a příbuzné proteiny v tomto textu popsané, výhodně v izolované formě. Termín "nukleové kyseliny", jak se v tomto textu používá, zahrnuje genomovou DNA, cDNA, mRNA, „antisense“ molekuly, a také nukleové kyseliny založené na alternativní kostře (základním řetězci) nebo alternativních bázích, ať již přírodního nebo syntetického původu.

Homologie nebo identita je určována pomocí analýzy BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) užívající algoritmy v počítačových programech "blastp", "blastn", "blastx", "tblastn" a "tblastx" (viz Karlin et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 2264-2268 Altschul, (1993) J. Mol. Evol. 36, 290-300, plně zahrnutý formou odkazu), které jsou určeny pro vyhledávání a určování sekvenční podobnosti. Postup využitý v programovém systému BLAST nejdříve srovnává podobné

segmenty mezi zkoumanou sekvencí a sekvencemi v databázi, pak vyhodnocuje statistickou významnost všech identifikovaných shod a nakonec sumarizuje jen ty shody, které jsou v souladu s předem daným prahem významnosti. Podrobnější diskuse základů metod prohledávání databází a vyhledávání podobnosti viz Altschul et al., (1994) Nature Genetics 6, 119-129 (plně zahrnuto formou odkazu). Prohledávací parametry pro hodnoty "histogram", "descriptions", "alignments", "expect" (tj. statistická významnost prahové hodnoty pro shodu s databázovou sekvencí), "cutoff", "matrix" a "filtr" byly ponechány jak jsou původně v programu nastaveny. Původně nastavená skórovací matice ("scoring matrix") užívaná v programech blastp, blastx, tblastn a tblastx byla matice "BLOSUM62" (Henikoff et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 10915-10919, plně zahrnuto formou odkazu). Čtyři parametry programu "btastn" byly nastaveny následovně: Q=10 („gap creation penalty", "trestné body" za mezeru), R=10 („gap extension penalty", "trestné body" za rozšíření mezery), wink=1 (generuje "zásahy slov", "word hits" v každém "záblesku" podél zkoumané sekvence), gapw=16 (nastavuje šířku prohledávacího úseku, tzv. okna, „window", v rámci kterého se tvoří přiřazení s mezerou/mezerami). Ekvivalentní nastavení parametrů pro program "Blastp" bylo Q=9, R=2, wink=1, gapw=32. Srovnání sekvencí pomocí programu "Bestfit", který je k dispozici v programovém balíku GCG verze 10,0, užívá pro DNA parametry GAP=50 ("gap creation penalty") a LEN=3 ("gap extension penalty"), ekvivalentní parametry pro srovnání proteinů byly GAP=8 a LEN=2.

Termín "podmínky s vysokou stringencí" nebo "vysoce stringentní podmínky" ("high stringency conditions"), jak se užívá v tomto textu, znamená hybridizaci v podmínkách charakterizovaných následovně: 42°C v přítomnosti 50%

formamidu, pak první promytí 65°C s 2X SSC obsahujícím 1% SDS, a následně druhé promytí v 65°C s 0,1 x SSC.

Termín "izolovaná", jak se užívá v tomto textu pro molekulu nukleové kyseliny, znamená, že molekula nukleové kyseliny je v podstatě oddělena od kontaminujících nukleových kyselin, kódujících další polypeptidy ze zdrojové nukleové kyseliny.

Předkládaný vynález dále poskytuje fragmenty molekul kódující nukleové kyseliny. Termín "fragment molekuly kódující nukleové kyseliny" se v tomto textu týká části nebo celé sekvence, která kóduje protein. Velikost takového fragmentu je určena jeho zamýšleným použitím. Například jestliže je fragment vybrán tak, aby kódoval aktivní úsek proteinu, musí být fragment dostatečně dlouhý, aby kódoval funkční úsek/úseky proteinu. Pokud má být fragment použit jako sonda nukleové kyseliny nebo jako PCR primer, pak je délka fragmentu vybrána tak, aby nemohlo dojít ke vzniku velkého počtu falešně pozitivních výsledků při použití takové sondy nebo primeru.

Fragmenty kódující molekuly nukleové kyseliny podle předkládaného vynálezu (tj. umělé oligonukleotidy), které jsou použity jako sondy nebo specifické primery pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR) nebo k syntéze sekvence genu kódujícího proteiny podle vynálezu, mohou být snadno syntetizovány pomocí chemických postupů, jako je například metoda užívající fosfotriestery (viz Matteucci et al., (1981) J. Am. Chem. Soc. 103, 3185-3191) nebo pomocí automatizovaných metod syntézy. Kromě toho delší segmenty DNA mohou být snadno připraveny dobře známými postupy, jako je například syntéza skupin oligonukleotidů, které definují různé modulární segmenty genu, a po které následuje ligace oligonukleotidů tak, že se sestaví kompletní modifikovaný gen.

Kódující molekuly nukleové kyseliny podle předkládaného vynálezu mohou být ještě dále modifikovány, např. aby obsahovaly detekovatelnou značku pro účely diagnostické sondy. Různé typy značek jsou v oboru známy a mohou být snadno použity s kódující molekulou podle vynálezu. K vhodným značkám patří, aniž by však tento výčet byl omezující, biotin, radioaktivně značené nukleotidy apod. Odborník snadno užije v oboru známé značky pro přípravu značené molekuly kódující nukleové kyseliny.

Modifikace samotné primární struktury pomocí delece, adice nebo alterace aminokyselin vložených do proteinové sekvence v průběhu translace může být provedena, aniž by došlo k poškození funkce/aktivity proteinu. Takové substituce nebo další alterace vedou k proteinu, který má aminokyselinovou sekvenci kódovanou nukleovou kyselinou spadající také do rozsahu předkládaného vynálezu.

C. Izolace dalších příbuzných molekul nukleové kyseliny

Jak bylo již popsáno výše, identifikace humánní molekuly nukleové kyseliny mající sekvenci uvedenou v popisu v seznamu sekvencí jako SEKVENCE ID. Č. 1, 3, 7, 9, 11, 13, 15, 17 a 19 dovoluje odborníkovi izolovat molekuly nukleové kyseliny, které kódují další členy rodiny proteinového receptoru Nogo kromě těch, které již jsou v předkládaném popisu uvedeny. A dále, molekuly nukleové kyseliny zde popsané dovolují odborníkovi izolovat molekuly nukleové kyseliny, které kódují další členy rodiny proteinů receptoru Nogo a peptidová agens.

V podstatě odborník může snadno použít aminokyselinové sekvence uvedené zde v seznamu sekvencí jako SEKVENCE ID. Č. 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 a 20 nebo jejich fragmenty obsahující epitop k vytvoření protilátkové sondy pro screening

expresních knihoven připravených z vhodných buněk. Typicky, polyklonální antisérum ze savců, například z králíka, imunizovaných purifikovaným proteinem (jak bude popsáno dále), nebo monoklonální protilátky mohou být použity ke screeningu savčích cDNA nebo genomových expresních knihoven, jako je například knihovna ve fágu lambda gt11, čímž se získají odpovídající kódující sekvence pro další členy proteinové rodiny. Klonované cDNA sekvence mohou být exprimovány jako fúzní proteiny nebo exprimovány přímo s využitím jejich vlastních kontrolních sekvencí, a nebo exprimovány pomocí konstruktů s využitím kontrolních sekvencí vhodných k expresi enzymu v konkrétním hostiteli.

Alternativně, úsek kódující sekvence podle vynálezu může být syntetizován a pak použit jako sonda pro identifikaci a získání DNA kódující členy proteinové rodiny z jakéhokoli savčího organismu. Oligomery obsahující například přibližně 18 až 20 nukleotidů (kódující úsek zahrnující přibližně šest až sedm aminokyselin) může být připraven a použit ke screeningu genomové DNA nebo cDNA knihovny, kdy se dosáhne hybridizace za vysoce stringentních podmínek nebo za dostatečně stringentních podmínek pro eliminaci nežádoucí hladiny falešně pozitivních výsledků.

Navíc mohou být připraveny dvojice oligonukleotidových primerů pro použití v polymerázové řetězové reakci (PCR) k selektivnímu klonování molekul kódující nukleové kyseliny. PCR cykly sestávající z denaturace/nasednutí primerů/prodlužování řetězce s využitím těchto PCR primerů jsou odborníkům dobře známy a mohou být snadno upraveny pro použití k izolaci další kódujících molekul nukleové kyseliny.

D. Rekombinantní DNA molekuly obsahující molekulu nukleové kyseliny

Předkládaný vynález dále poskytuje rekombinantní DNA molekuly (rDNA), které obsahují kódující sekvence. Termín "rDNA molekula", jak se v tomto textu používá, označuje DNA molekulu, která byla podrobena molekulární manipulaci (tj. byla připravena nebo modifikována metodami genového inženýrství). Metody přípravy rDNA molekul jsou v oboru dobře známy, viz například základní laboratorní příručky Sambrook et al., (1989) Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Ve výhodných rDNA molekulách je kódující DNA sekvence operativně spojena s expresní kontrolní sekvencí a sekvencí vektoru.

Výběr vektoru a expresní kontrolní sekvence, se kterými se operativně spojí jedna ze sekvencí kódujících protein podle předkládaný vynálezu, závisí přímo, jak je odborníkům známo, na požadovaných funkčních vlastnostech (například exprese proteinu, hostitelské buňky, které mají být transformovány atd.). Vektor podle předkládaného vynálezu musí být alespoň schopen řídit replikaci nebo inzerci do hostitelského chromozómu, a výhodně také expresi, strukturního genu vloženého v rDNA molekule

Expresní kontrolní prvky, které jsou použity pro regulaci exprese operativně spojené sekvence kódující protein jsou v oboru známy, patří k nim, aniž by výčet byl omezující, např. indukovatelné promotory, konstitutivní promotory, sekretorické signály a další regulační prvky. Výhodné jsou indukovatelné promotory, které jsou snadno regulovatelné, například promotory reagující na živiny v kultivačním médiu hostitelských buněk.

V jednom provedení vynálezu vektor obsahující molekulu

kódující nukleové kyseliny obsahuje prokaryotický replikon, tj. DNA sekvenci, která má schopnost řídit autonomní replikaci a udržovat rekombinantní DNA molekulu mimo chromozóm v prokaryotické hostitelské buňce, jako je například bakteriální hostitelská buňka transformovaná příslušným vektorem. Takové replikony jsou odborníkům dobře známy. Kromě toho vektory, které obsahují prokaryotický replikon, mohou také obsahovat gen, jehož exprese poskytuje detekovatelný marker jako je například rezistence k léčivu. Typické bakteriální geny rezistence k léčivu jsou geny poskytující rezistenci k ampicilinu nebo tetracyklinu.

Vektory, které obsahují prokaryotický replikon, mohou dále obsahovat prokaryotický nebo bakteriofágový promotor schopný řídit expresi (transkripci a translaci) kódující genové sekvence v bakteriální hostitelské buňce jako je například *E. coli*. Promotor je expresní kontrolní element tvořený DNA sekvencí, která dovoluje, aby došlo k navázání RNA polymerázy a transkripci. Promotorové sekvence kompatibilní s bakteriálními hostiteli jsou typicky v plazmidových vektorech, které obsahují vhodná restriční místa pro inzerci (vlození) DNA segmentu podle předkládaného vynálezu. Příklady takových vektorových plazmidů jsou pUCB, pUC9, pBR322 a pBR329 (Biorad Laboratories), pPL a pKK223 (Pharmacia). Pro expresi molekuly rekombinantní DNA kódující protein podle vynálezu může být použit jakýkoliv vhodný prokaryotický hostitel.

Expresní vektory kompatibilní s eukaryotickou buňkou, výhodně vektory kompatibilní s buňkami obratlovců, mohou být také použity pro vytvoření rDNA molekuly, která obsahuje kódující sekvence. Expresní vektory pro eukaryotické buňky jsou odborníkům dobře známy a jsou k dispozici z několika komerčních zdrojů. Typicky takové vektory obsahují výhodná

restrikční místa pro inzerci požadovaného DNA segmentu. Příklady takových vektorů jsou pSVL pKSV-10 (Pharmacia), pBPV-1, pML2d (International Biotechnologies), pTDT1 (ATCC 31255) a podobné eukaryotické expresní vektory.

Eukaryotické expresní vektory použité ke konstrukci rDNA molekul podle předkládaného vynálezu mohou dále obsahovat selekční marker, který je účinný v eukaryotické buňce, výhodně selekční marker rezistence vůči léčivu. výhodným marker rezistence k léčivu je gen, jehož exprese vede k rezistenci k neomycinu, tj. gen pro neomycinfosfotransferázu (*neo*) (Southern et al., (1982) J. Mol. Anal. Genet. 1, 327-341). Alternativně může být selekční marker přítomný na jiném, samostatném plazmidu, přičemž oba dva vektory se společnou transfekcí, tzv. kotransfekcí, vnášejí do hostitelských buněk, a transfekované buňky (transfektanty) se selektují na základě kultivace v médiu obsahujícím léčivo odpovídající užitému markeru.

E. Hostitelské buňky obsahující exogenně podávanou molekulu nukleové kyseliny

Předkládaný vynález dále poskytuje hostitelské buňky transformované molekulou nukleové kyseliny kódující protein podle předkládaného vynálezu. Hostitelské buňky jsou buďto prokaryotické nebo eukaryotické buňky. Eukaryotické buňky použitelné pro expresi proteinu podle vynálezu nejsou omezeny, pokud je buněčná linie kompatibilní s metodami buněčných kultur a je kompatibilní s propagací (množením) expresního vektoru exprimujícího genový produkt. K výhodným eukaryotickým hostitelským buňkám patří, ale tento výčet není omezující, kvasinky, hmyzí a savčí buňky, výhodně buňky obratlovců jako například buňky myši, laboratorního potkana, opice nebo buňky

z humánní buněčné linie. K příkladům vhodných eukaryotických hostitelských buněk patří buňky vaječníků čínského křečka (CHO), které jsou k dispozici v ATCC jako položka CCL61, buňky NIH myších embryí NIH-3T3 jsou k dispozici v ATCC jako položka CRL1658, ledvinné buňky křeččích embryí (BHK), a tkáňové kultury eukaryotických buněčných linií.

Transformace vhodných hostitelských buněk molekulou rDNA podle předkládaného vynálezu se provádí metodami, které jsou odborníkům dobře známy, a které typicky závisejí na typu vektoru hostitelském systému, které byly použity.

Pokud jde o transformaci prokaryotických hostitelských buněk, může být použita např. elektroporace nebo metody užívající sůl (viz například Sambrook et al., (1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, nebo Cohen et al., (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 2110-2114). Pokud jde o transformace buněk obratlovců vektory obsahujícími rDNA, může být použita elektroporace nebo metody užívající kationtové lipidy nebo sůl (viz například Graham et al., (1973) *Virology* 52, 456-467, Wigler et al., (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 1373-1376).

Úspěšně transformované buňky, tj. buňky, které obsahují rDNA molekulu podle předkládaného vynálezu, mohou být identifikovány známými postupy, včetně selekce na selekční marker. Například buňky vzniklé vnesením rDNA podle předkládaného vynálezu mohou být klonovány, aby vytvořily jednotlivé kolonie. Buňky z těchto kolonií se pak sklídí, lyzují a jejich DNA se vyšetří na přítomnost rDNA, a sice známými metodami, např. například jak byly popsány v Southern, (1975) *J. Mol. Biol.* 98, 503-517, nebo se proteiny produkované buňkami testují pomocí imunologických metod.

F. Produkce rekombinantních proteinů pomocí molekul rDNA

Předkládaný vynález dále poskytuje způsoby produkce proteinů podle vynálezu s použitím molekuly nukleové kyseliny popsané ve vynálezu. obecně produkce rekombinantní formy proteinu typicky zahrnuje následující kroky:

Nejdříve se získá molekula nukleové kyseliny kódující protein podle vynálezu, jako je například molekula nukleové kyseliny uvedená v seznamu sekvencí jako SEKVENCE ID. Č. 1, 3, 7, 9, 11, 13, 15, 17 nebo 19, nebo nukleotidy 166 až 1584 ze SEKVENCE ID. Č. 1 nebo nukleotidy 178 až 1596 ze SEKVENCE ID. Č. 3. jestliže kódující sekvence není přerušována introny, je vhodná přímo pro expresi v jakémkoliv hostiteli.

Výhodně je molekula nukleové kyseliny pak operativně spojena s vhodnou kontrolní/regulační sekvencí, jak bylo již popsáno výše, a tak se připraví expresní jednotka obsahující proteinový otevřený čtecí rámec. Expresní jednotka se použije k transformaci vhodného hostitele a transformovaný hostitel se pěstuje v podmínkách, které dovolují produkci rekombinantního proteinu. Volitelně se rekombinantní protein izoluje z kultivačního média nebo z buněk, přičemž ani není nutná izolace a purifikace v některých případech, kdy určité nečistoty lze tolerovat.

Každý z výše zmíněných kroků může být proveden mnoha různými způsoby. Například, požadovaná kódující sekvence může být získána z genomového fragmentu a pak použita přímo ve vhodném hostiteli. Konstrukce expresních vektorů, které jsou operativní v různých hostitelích, se provádí pomocí vhodných replikonů a kontrolních sekvencí, jak bylo již zmíněno výše. Kontrolní sekvence, expresní vektory a metody transformace jsou závislé na typu hostitelských buněk použitých pro expresi, jak již bylo diskutováno dříve v textu. Vhodná

restrikční místa mohou být, pokud nejsou normálně k dispozici, přidána na konce kódující sekvence, aby tak vznikl "vystřihnutelný" gen pro vložení do takového vektoru. Odborník snadno může adaptovat jakýkoliv hostitelský/expresní systém v oboru známý pro produkci rekombinantních proteinů pomocí molekul nukleové kyseliny podle vynálezu.

G. Způsoby identifikace vazebných partnerů

Předkládaný vynález poskytuje také způsoby pro identifikaci a izolaci vazebných partnerů proteinů podle vynálezu. V některých provedeních je protein podle vynálezu smíchán s potenciálním vazebným partnerem nebo extraktem nebo frakcí buněk v podmínkách, které dovolují spojení/navázání potenciálního vazebného partnera a proteinu podle vynálezu. Po smíchání peptidy, polypeptidy a proteiny nebo jiné molekuly, které jsou asociovány s proteinem podle vynálezu jsou separovány ze směsi. Vazebný partner navázaný na protein podle vynálezu je pak izolován a dále analyzován. Pro identifikaci a izolaci vazebného partnera lze užít celý protein, např. celý receptor Nogo proteinu se SEKVENCÍ ID. Č. 2 nebo 4 nebo celý protein Nogo se SEKVENCÍ ID. Č. 6. Alternativně lze užít fragment z uvedených proteinů. Příkladem užitečného fragmentu receptoru Nogo proteinu je rozpustný receptor Nogo, tj. polypeptid postrádající transmembránovou doménu (viz obr. 7).

Termín "buněčný extrakt", jak se užívá v tomto textu, se týká preparátu nebo frakce, která je získána lyzováním nebo jiným rozrušením buněk. Výhodným zdrojem buněčných extraktů jsou buňky pocházející z lidského mozku nebo míchy, např. z tkáně lidského mozku. Alternativně lze buněčné extrakty připravit z jakékoliv nervové tkáně nebo dostupných linií nervových buněk, zejména buněčných linií odvozených

z oligodendrocytů.

Pro získání buněčných extraktů lze užít mnoha různých metod. Buňky mohou být rozrušeny chemickými nebo fyzikálními metodami. K příkladům fyzikálních metod, aniž by byly omezující, patří sonikace a mechanické "rozbití". K příkladům chemických metod patří, aniž by byly omezující, lýze pomocí detergentu nebo lýze pomocí enzymů. Odborník snadno najde a adaptuje postupy pro získání extraktů pro realizaci vynálezu.

Jakmile je jednou připraven buněčný extrakt, smíchá se s proteinem podle vynálezu v podmínkách, které umožňují, aby došlo ke spojení s vazebným partnerem. Mohou být užity různé podmínky, nejvýhodnější jsou podmínky blízké podmínkám, které jsou v cytoplazmě humánních buněk. Takové charakteristiky jako je osmolalita, pH, teplota a koncentrace buněčného extraktu se mohou měnit pro optimalizaci spojení proteinu s jeho vazebným partnerem.

Po smíchání za vhodných podmínek se navázaný komplex separuje ze směsi. Pro tuto separaci ze směsi lze užít řadu různých postupů. Tak např. lze užít protilátky specifické pro protein podle vynálezu k imunoprecipitaci komplexu s vazebným partnerem. Alternativně lze užít standardní chemické separační techniky jako je např. chromatografie a hustotně-sedimentační centrifugace.

Po odstranění nenavázaných buněčných složek vyskytujících se v extraktu se vazebný partner disociuje z komplexu obvyklými metodami. Např. se disociace provede změnou koncentrace solí nebo změnou pH ve směsi.

Aby se napomohlo separaci komplexů s navázaným vazebným partnerem ze směsi extraktu, protein podle vynálezu může být imobilizován na pevném nosiči. Například protein může být navázán na nitrocelulózovou matrix nebo akrylátové perličky.

Navázání proteinu na pevný nosič napomáhá separaci párů peptid-vazebný partner od ostatních složek extraktu. Identifikovaným vazebným partnerem může být buďto jednoduchý protein nebo komplex vytvořený ze dvou nebo více proteinů. Alternativně lze vazebné partnery identifikovat pomocí fúzního testu s alkalickou fosfatázou, jak ho popsali Flanagan & Vanderhaeghen, (1998) *Annu. Rev. Neurosci.* 21, 309-345 nebo Takahashi et al., (1999) *Cell* 99, 59-69, nebo testem "Far-Western" podle Takayama et al., (1997) *Methods Mol. Biol.* 69, 171-184 nebo Sauder et al., *J. Gen. Virol.* (1996) 77, 991-996, nebo je lze identifikovat použitím proteinů se značkovacím epitopem nebo fúzních GST proteinů.

Alternativně molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu mohou být použity v kvasinkovém dvouhybridním ("two-hybrid") systému pro identifikaci dalších párů proteinových partnerů a tento systém může být odborníkem adaptován tak, že užívá molekuly nukleové kyseliny v tomto textu popsané (viz dvouhybridní systém Hybrizap® firmy Stratagene).

H. Způsoby identifikace agens, která moduluje expresi

Předkládaný vynález poskytuje způsoby identifikace agens, která moduluje expresi nukleových kyselin kódujících receptor Nogo proteinu. Předkládaný vynález také poskytuje způsoby identifikace agens, která moduluje expresi nukleových kyselin kódujících Nogo protein. Takové způsoby například mohou využít jakékoliv dostupné prostředky k monitorování změny v hladině expresi nukleových kyselin podle vynálezu. V kontextu popisu předkládaného vynálezu agens moduluje expresi nukleové kyseliny podle vynálezu, například nukleové kyseliny kódující protein mající sekvenci uvedenou zde jako SEKVENCE ID. Č. 2, 4 nebo 6, pokud je schopno zvýšit nebo

snížit ("up-regulation" nebo "down-regulation") expresi nukleové kyseliny v buňce.

V jednom formátu takového testu se připraví buněčné linie, které obsahují reportérový gen fúzovaný mezi otevřený čtecí rámec definovaný nukleotidy 166 až 1584 v SEKVENCI ID. Č. 1, nebo nukleotidy 178 až 1596 v SEKVENCI ID. Č. 3, nebo nukleotidy 135 až 3713 v SEKVENCI ID. Č. 5, a jakéhokoli testovatelného partnera. Lze připravit mnoho různých testovatelných fúzí s vazebným partnerem. K dispozici je mnoho molekul použitelných pro tento účel, včetně genu pro luciferázu ze světlušky a genu kódujícího chloramfenikol-acetyltransferázu (Alam et al., (1990) Anal. Biochem. 188, 245-254). Buněčné linie obsahující fúzovaný reportérový gen jsou pak vystaveny působení agens, které je testováno, a sice ve vhodných podmínkách a po vhodnou dobu. Rozdíly v expresi reportérového genu mezi vzorky vystavenými vlivu agens a kontrolními vzorky vedou k identifikaci agens, které moduluje expresi nukleové kyseliny kódující protein mající sekvence uvedenou zde jako SEKVENCE ID. Č. 2, 4 nebo 6.

Další formáty testů mohou být použity ke sledování schopnosti agens modulovat expresi nukleové kyseliny kódující receptor Nogo proteinu podle vynálezu, jako je například protein mající aminokyselinovou sekvenci uvedenou zde jako SEKVENCE ID. Č. 2 nebo 4 nebo Nogo protein mající aminokyselinovou sekvenci uvedenou zde jako SEKVENCE ID. Č. 6. Tak například exprese mRNA může být monitorován přímo pomocí hybridizace s nukleovou kyselinou podle vynálezu. buněčné linie se vstaví působení agens, které je testováno za vhodných podmínek a po vhodnou dobu a pak se izoluje celková RNA nebo mRNA standardními postupy, např. podle Sambrook et al., (1989) Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor

Laboratory Press.

Sondy pro detekci rozdílů v hladině exprese RNA mezi buňkami exponovanými agens a kontrolními buňkami mohou být připraveny z nukleových kyselin podle vynálezu. Výhodné je, avšak nikoliv nezbytné, připravit takové sondy, které hybridizují pouze s cílovou nukleovou kyselinou v podmínkách vysoké stringence. Pouze vysoce komplementární nukleové kyseliny vytvářejí hybridy v podmínkách vysoké stringence. Tudiž stringence testovacích podmínek určuje míru komplementarity, která by měla existovat mezi dvěma řetězci nukleové kyseliny, aby došlo ke vzniku hybridu. Stringence musí být zvolena tak, aby se maximalizoval rozdíl ve stabilitě mezi hybridy sonda:cílová sekvence a potenciální sonda:jiná než cílová sekvence.

Sondy mohou být konstruovány z nukleových kyselin podle vynálezu postupy, které jsou odborníkům známy. Například obsah G+C v sondě a délka sondy ovlivňují vazbu k její cílové sekvenci. Metody pro optimalizaci specifičnosti sond jsou obecně známy a jsou popsány např. v Sambrook et al., (1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, nebo Ausubel et al., (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing.

Hybridizační podmínky se modifikují pomocí známých metod, například jak byly popsány v Sambrook et al., (1989) Ausubel et al., (1995), jak je to třeba pro každou použitou sondu. Hybridizace celkové buněčné RNA nebo RNA obohacené o polyA⁺ RNA může být provedena v jakémkoliv dostupném formátu. Tak například celková buněčná RNA nebo RNA obohacená o polyA⁺ RNA může být fixována na pevném nosiči a pak přivedena do kontaktu s alespoň jednou sondou obsahující alespoň jednu sekvenci podle vynálezu nebo její část, a sice v podmínkách, ve kterých

sonda bude specificky hybridizovat. Alternativně se fragmenty nukleové kyseliny obsahující alespoň jednu sekvenci podle vynálezu nebo její část, mohou fixovat k pevnému nosiči, jako je například malá podložní destička ("čip") na bázi silikonu nebo "čip" z porézního skla. Takový "čip" pak může být exponován celkové buněčné RNA nebo polyA⁺ RNA ze vzorku v podmínkách, kde na čipu fixovaná sekvence bude specificky hybridizovat. Takové hybridizace na čipech jsou dnes běžně k dispozici, například postupy popsány v Beattie, (1995) W09511755. Zkoumání schopnosti dané sondy specificky hybridizovat s RNA vzorkem z neošetřené buněčné populace a z buněčné populace exponované agens umožní identifikovat agens, které up-reguluje nebo down-reguluje expresi nukleové kyseliny kódující receptor Nogo proteinu mající sekvenci uvedenou zde jako SEKVENCE ID. Č. 2 nebo 4.

Hybridizace pro kvalitativní i kvantitativní analýzu mRNA může být také provedena pomocí testu s chráněním před Rnázou („Rnase Protection Assay“, RPA, viz Ma et al., Methods (1996) 10, 273-238). Stručně shrnuto, expresní nosič obsahující cDNA kódující genový produkt a fágový promotor DNA závislé RNA polymerázy (například T7, T3 nebo SP6 RNA polymerázy) je linearizován na 3' konci cDNA molekuly, po směru ("downstream") od fágového promotoru, a tato linearizovaná molekula je následně použita jako templát pro syntézu značeného "antisense" transkriptu cDNA pomocí *in vitro* transkripce. Značený transkript je pak hybridizován se směsí izolované RNA (tj. celkovou nebo frakcionovanou mRNA) pomocí inkubace ve 45 °C přes noc v pufru obsahujícím 80% formamid, 40mM Pipes, pH 6,4, 0,4M NaCl a 1mM EDTA. Výsledné hybridy jsou pak štěpeny v pufru obsahujícím 40 µg/ml ribonukleázy A a 2 µg/ml ribonukleázy. Po deaktivaci a extrakci externích proteinů se vzorky pro analýzu nanášou na polyakrylamidový

gel s močovinou.

V další testovém formátu se pro agens, které působí na expresi daného genového produktu, se nejdříve identifikují buňky nebo buněčné linie, které za fyziologických podmínek exprimují daný genový produkt. Lze očekávat, že takto identifikované buňky nebo buněčné linie obsahují nezbytné buněčné mechanismy, takže je zachována věrnost modulace transkripčního aparátu vzhledem ke kontaktu exogenního agens s příslušným povrchovým transdukčním mechanismem a odpovídající kaskádou v cytosolu. Dále jsou tyto buňky nebo buněčné linie transdukovány nebo transfekovány konstruktem expresního nosiče (např. plazmidem nebo virovým vektorem), který obsahuje netranslatovný 5'-konec obsahující promotor ze strukturního genu kódujícího požadovaný genový produkt operativně fúzovaný s jedním nebo více antigenními fragmenty, které jsou cizorodé vůči požadovanému genovému produktu, přičemž fragmenty jsou pod transkripční kontrolou tohoto promotoru a jsou exprimovány jako polypeptidy, jejichž molekulová hmotnost je rozlišitelná od molekulové hmotnosti přirozeně se vyskytujících polypeptidů nebo obsahují imunologicky odlišitelnou značku. Tyto postupy jsou odborníkům dobře známy (viz Sambrook et al., (1989) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Buňky nebo buněčné linie transdukové nebo transfekované postupem zmíněným výše jsou pak přivedeny do kontaktu s agens ve vhodných podmínkách: tak např. agens obsahující farmaceuticky přijatelný excipient je přivedeno do kontaktu s buňkami ve vodném fyziologickém pufru jako je například fosfátem pufrovaný solný (fyziologický) roztok (PBS) při fyziologickém pH, vyvážený solný roztok podle Eaglese (BSS) při fyziologickém pH, PBS nebo BSS obsahující sérum nebo

kondicionované médium obsahující PBS nebo BSS a sérum a inkubovaná při 37 °C. Uvedené podmínky mohou být modifikovány podle potřeby, což závisí na posouzení odborníka a je rutinní záležitostí. Následně po kontaktu buněk s agens jsou buňky rozrušeny a z této buněčné "kaše" jsou frakcionovány polypeptidy tak, že polypeptidové frakce jsou sloučeny a přivedeny do kontaktu s protilátkou, aby pak byly dále zpracovány v imunologických testech. (například ELISA, imunoprecipitace nebo Western blot). Sloučené proteinové frakce izolované ze vzorku "kontaktovaného agens" se pak srovnávají s kontrolním vzorkem, kde byl s buňkami kontaktován pouze excipient, a na základě zvýšení nebo snížení imunologicky získaného signálu ze vzorku "kontaktovaného agens" ve srovnání s kontrolním vzorkem se pak určí účinnost zkoumaného agens.

I. Způsoby identifikace agens, která modulují aktivitu

Předkládaný vynález poskytuje metody pro identifikaci agens, která modulují alespoň jednu aktivitu receptoru Nogo proteinu. Vynález také poskytuje způsoby identifikace agens, která modulují alespoň jednu aktivitu Nogo proteinu. Takové způsoby nebo testy mohou využívat jakýkoliv známý způsob k monitorování nebo detekci sledované aktivity.

V jednom formátu testu je testována specifická aktivita receptoru Nogo proteinu nebo Nogo proteinu, normalizovaná na standardní jednotku, mezi buněčnou populací, která byla exponována testovanému agens, a neexponovanou kontrolní buněčnou populací. Buněčná linie nebo populace jsou vystaveny působení testovaného agens ve vhodných podmínkách a po vhodnou dobu. Mohou být připraveny buněčné lyzáty z exponovaných a kontrolních neexponovaných buněčných linií nebo populací.

Buněčné lyzáty se pak analyzují pomocí sondy.

Protilátkové sondy mohou být připraveny pomocí imunizace vhodného savčího hostitele/příjemce s využitím vhodných imunizačních postupů, kdy se použije receptor Nogo proteinu, Nogo protein, peptidové agens Nogo receptoru nebo jejich antigenní fragmenty. Ke zvýšení imunogenicity mohou být tyto proteiny nebo jejich fragmenty konjugovány (kondenzovány) s vhodným nosičem. Metody přípravy imunogenních konjugátů s nosičem, jako je například BSA, KLH nebo další nosičové proteiny, jsou odborníkům dobře známy. V některých případech je možná přímá konjugace, například karbodiimidového činidla, v jiných případech s použitím vazebných činidel komerčně dostupných od firmy Pierce Chemical Co., která zlepšují přístupnost haptenu. Haptenové peptidy mohou být prodlouženy buďto na aminokonci nebo karboxykonci cysteinovým zbytkem nebo "proloženy" cysteinovými zbytky, například pro usnadnění navázání k nosiči. Podávání imunogenů se provádí obecně pomocí injekcí po vhodné období, s využitím vhodného adjuvans, jak je obecně odborníkům známo. V průběhu procesu imunizace se stanovují titry protilátky, aby se určilo, zda se tvoří adekvátní protilátka.

Zatímco polyklonální antiséra připravená výše popsáním způsobem mohou být uspokojivé pro některé aplikace, pro farmaceutické přípravky je výhodné použití monoklonálních protilátek. Imortalizované buněčné linie, které secernují požadovanou monoklonální protilátku, mohou být připraveny standardními postupy, viz např. Kohler & Milstein, (1992) Biotechnology 24, 524-526, nebo modifikacemi, které působí imortalizaci lymfocytů nebo buněk sleziny, jak je obecně známo. Imortalizované buněčné linie secernující požadované protilátky mohou pak být screenovány pomocí imunotestu

(imunoassay), ve kterém je antigenem peptidový haptén, polypeptid nebo protein. Když je vhodná imortalizovaná buněčná kultura secernující požadovanou protilátku identifikována, buňky se pak mohou kultivovat buďto *in vitro* nebo získávat z tekutiny akumulované v ascitu.

Požadované monoklonální protilátky mohou být izolovány ze supernatantu po kultivaci nebo ze supernatantu z ascitu. Intaktní protilátky anti-Nogo nebo anti-Nogo receptor, nebo jejich fragmenty, které obsahují imunologicky významný úsek, mohou pak být použity například jako antagonisté vazby mezi Nogo (ligandem) a Nogo receptorem. Použití imunologicky reaktivních (účinných) fragmentů, jako jsou například fragmenty Fab, Fab' nebo $F(ab')_2$ je často výhodné, zejména při terapeutickém použití, neboť tyto fragmenty jsou obecně méně imunogenní než celé imunoglobuliny.

Protilátky nebo jejich fragmenty mohou také být produkovány pomocí moderních rekombinantních technologií. Úseky protilátky, které se váží specificky k požadovaným úsekům proteinu, mohou být také připraveny jako chiméry sestavené z částí pocházejících z více biologických druhů.

Úseky protilátky, které se váží specificky k požadovaným úsekům proteinu, mohou být také připraveny jako chiméry sestavené z částí pocházejících z více biologických druhů, např. jako tzv. humanizované protilátky. Tudiž protilátka je humanizovaná protilátka nebo humánní protilátka, jak bylo popsáno v patentu USA č. 5,585,089 nebo v Riechmann *et al.*, (1988) *Nature* 332, 323-327.

Agens, která jsou testována výše popsanými způsoby, mohou být vybírána náhodně nebo na základě racionální selekce nebo návrhu. V kontextu popisu předkládaného vynálezu je agens náhodně vybráno, když je agens vybráno bez uvažování o jeho

specifických sekvencích účastnících se vazby se samotnými proteiny podle vynálezu nebo s nimi spojenými substráty, vazebnými partnery apod. Příkladem náhodného výběru agens je použití tzv. chemických nebo peptidových kombinačních knihoven, a nebo růstového média určitého organismu.

V kontextu popisu předkládaného vynálezu je agens racionálně vybráno nebo navrženo, když je agens vybráno nikoliv náhodným způsobem, přičemž se bere do úvahy sekvence cílového místa nebo jeho konformace v souvislosti s účinky agens. Agens může být racionálně vybrané nebo racionálně navržené s využitím peptidových sekvencí, které tvoří tato místa. Tak například racionálně vybrané peptidové agens může být peptid, jehož aminokyselinové sekvence je identická s vazebnou doménou (SEKVENCE ID. Č. 20) proteinu Nogo, která interaguje s Nogo receptorem. Alternativně to může být fragment vazebné domény, například SEKVENCE ID. Č. 8, 10, 12, 14, 16 a 18.

Agens podle předkládaného vynálezu mohou být například peptidy, protilátky, fragmenty protilátky, tzv. malé molekuly, deriváty vitaminů, a také sacharidy. Peptidová agens podle vynálezu mohou být připravena užitím standardních postupů syntézy peptidů na pevné fázi (nebo v roztoku), což je odborníkům dobře známo. Kromě toho, DNA kódující tyto peptidy může být syntetizován pomocí komerčně dostupných zařízení pro syntézu oligonukleotidů, a pak produkována rekombinantně užitím standardních rekombinantních produkčních systémů. Příprava agens s využitím syntézy na pevné fázi je nutná v případě, kdy mají být součástí peptidu aminokyseliny, které nejsou genově kódovány.

Další třídou agens podle předkládaného vynálezu jsou protilátky nebo jejich fragmenty, které se vážou na Nogo

protein nebo na receptor Nogo proteinu. Protilátková agens mohou být připravena tak, že se vhodný savec imunizuje peptidy, které obsahující jakožto antigenní úseky části proteinu, proti kterému má být specificky protilátka namířena.

J. Testy s vysokou kapacitou

Pro vyhledávání nových sloučenin, které jsou schopné interagovat s receptorem Nogo proteinu, se využívají moderní vysoce účinné testy ("High-throughput Screening") s velkou kapacitou zpracovaných vzorků. Pro obecnou informaci o vysokokapacitním screeningu viz např. Devlin, (1998) High Throughput Screening, Marcel Dekker, nebo Patent USA č. 5,763,263). Vysokokapacitní screeningové metody užívají jeden nebo více různých způsobů testování.

Imunodiagnostika a imunotesty

Tyto testy představují skupinu metod používaných pro měření specifických biochemických látek, obecně při velmi nízké koncentraci, v komplexních směsích, jako jsou například biologické tekutiny, které jsou závislé na specifičnosti a vysoké afinitě, kterou vykazují vhodně připravené a vybrané protilátky s jejich komplementárními antigeny. Látka, která má být takto měřena, musí nutně být antigenní - tedy buďto imunogenní makromolekula nebo malá molekula působící jako haptén (hapténová malá molekula). Ke každému vzorku se přidá známé omezené množství specifické protilátky a frakce antigenu, která se ní kombinuje, je často vyjadřovaná poměrem vázaná:volná, když se užívá jako indikátor antigen značený radioisotopem ("radioimmunoassay"), fluorescenční molekula ("fluoroimmunoassay"), stabilní volný radikál ("spin

immunoassay"), enzym ("enzyme immunoassay"), nebo další snadno detekovatelné zánčky.

Protilátky mohou být značeny různými způsoby: užívají se pak různé názvy pro příslušné testy jako ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay"), RIA ("radioimmuno-assay"), FIA ("fluorescent immunoassay"), CLIA ("chemiluminescent immunoassay") nebo značení protilátky částicemi koloidního zlata ("imunogold"), které jsou odborníkům známy.

K obecně známým formátům výše uvedených testů patří tzv. sandwich test, kompetitivní test, latexový aglutinační test, homogenní test, test na mikrotitrační destičce nebo test užitím mikročástic.

ELISA ("Enzyme-linked immunosorbent assay")

ELISA je imunochemický postup, který má výhodu, že nepotřebuje nebezpečné radiochemické a drahé fluorescenční detekční systémy. Místo toho test využívá enzymy jakožto indikátory. ELISA je forma kvantitativního imunotestu, který je založen na použití protilátky (nebo antigenu), která je navázána na povrch nerozpustného nosiče, který je pak využit k zachycení relevantního antigenu (nebo protilátky) z testovaného roztoku. Komplex antigen-protilátka je pak detekován pomocí měření aktivity vhodného enzymu, který byl předtím kovalentně navázán na antigen (nebo protilátku).

Pro podrobnější informace o metodách ELISA viz například Crowther, (1995) ELISA - Theory and Practice (Methods in Molecular Biology), Humana Press, Challacombe & Kemeny, (1998) ELISA and Other Solid Phase Immunoassays - Theoretical and Practical Aspects, John Wiley, Kemeny, (1991) Practical Guide to ELISA, Pergamon Press, Ishikawa, (1991) Ultrasensitive

Rapid Enzyme Immunoassay (Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology), Elsevier.

Kolorimetrické testy pro enzymy

Kolorimetrie je v podstatě jakýkoliv způsob kvantitativní chemické analýzy, ve které se stanovuje koncentrace nebo množství sloučeniny pomocí srovnání zabarvení vytvořeného pomocí reakce činidla se standardním množstvím a testovaným množstvím sloučeniny, například použitím kolorimetru nebo spektrofotometru.

Standardní kolorimetrický test na enzymatickou aktivitu beta-galaktosidázy je odborníkům dobře znám (viz například Norton et al., (1985) Mol. Cell. Biol. 5, 281-290). Kolorimetrické testy se mohou provádět na lyzátech z celých buněk s použitím O-nitrofenyl-beta-D-galaktopyranosidu (ONPG, Sigma) jako substrátu ve standardním kolorimetrickém beta-galaktosidázovém testu (Sambrook et al., (1989) Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Pro detekci beta-galaktosidázové aktivity jsou také k dispozici automatizované kolorimetrické testy (viz například Patent USA č. 5,733,720).

Imunofluorescenční testy

Imunofluorescence nebo imunofluorescenční mikroskopie jsou techniky, při kterých je antigen nebo protilátka ošetřen tak, aby byl fluorescenční, obvykle pomocí konjugace (kondenzace) s fluorescenčním barvivem, a pak se ponechá reagovat s komplementární protilátkou nebo antigenem přímo v řezu z tkáně nebo v roztěru na podložním sklíčku. Lokalizace antigenu nebo protilátky se pak provádí např. přímým

pozorováním fluorescence v mikroskopu pod ultrafialovým světlem.

Pro obecné informace o imunofluorescenčních technikách viz například Knapp et al., (1978) Immunofluorescence and Related Labeling Techniques, Elsevier, Allan, (1999) Protein Localisation by Fluorescent Microscopy - Practical Approach (Practical Approach Series) Oxford University Press, Caul, (1993) Immunofluorescence Antigen Detection Techniques in Diagnostic Microbiology, Cambridge University Press. Pro detailní vysvětlení imunofluorescenčních technik použitelných v předkládaném vynálezu viz např. patenty USA č. 5,912,176, 5,869,264, 5,866,319 a 5,861,259.

K. Použití agens, která modulují aktivitu

Jak je uvedeno v příkladech, Nogo a receptory Nogo proteinu a nukleové kyseliny, jako jsou například proteiny mající aminokyselinovou sekvenci sekvence id. č. 2, 4 nebo 6, jsou exprimovány v myelinu pocházejícím z axonu a dendritů. Agens, která modulují nebo up- či down-regulují (zvyšují či snižují počet receptorů) expresi Nogo nebo receptoru Nogo proteinu nebo agens, jako jsou například agonisté nebo antagonisté alespoň jedné aktivity Nogo nebo Nogo receptorového proteinu, mohou být použity k modulaci biologických a patologických procesů sdružených s funkcí a aktivitou proteinu. Vynález je obzvláště použitelný pro léčení humánních subjektů.

Patologické procesy se týkají kategorie biologických procesů, které mají škodlivý účinek. Například exprese proteinu podle vynálezu může být sdružena s inhibicí axonové regenerace po kraniálním, cerebrálním nebo spinálním traumatu,

mozkové mrtvici nebo demyelinizačním onemocnění. Tato demyelinizační onemocnění zahrnují, avšak bez omezení, *sclerosis multiplex*, monofázickou demyelinizaci, encefalomyelitidu, multifokální leukoencefalopatii, panencefalitidu, Marchiafava-Bignamiho nemoc, myelinolýzu mostu, adrenoleukodystrofii, Pelizaeus-Merzbacherovu nemoc, spongiózní degeneraci, Alexanderovu nemoc, Canavanovu nemoc, metachromatickou leukodystrofii a Krabbeho nemoc. Jak se v tomto textu používá, agens moduluje patologický proces, když agens redukuje stupeň nebo závažnost procesu. Například demyelinizační nemoci může být zabráněno nebo progresi nemoci může být modulována podáváním agens, která redukuje, podporují nebo modulují některým způsobem expresi nebo alespoň jednu aktivitu proteinu podle vynálezu.

V jednom příkladu může být použito podávání Nogo peptidových agens ukázaných na sekvenci id. č. 8, 10, 12, 14, 16, 18 a 20 k léčení demyelinizační nemoci sdružené s Nogo nebo Nogo receptorovým proteinem. V dalším příkladu mohou být buňky, které exprimují peptidová agens podle vynálezu transplantovány do místa poranění míchy, aby zde usnadnily růst axonů tímto místem poranění. Takové transplantované buňky by poskytly prostředek pro znovunastolení funkce míchy po poranění nebo traumatu.

V ještě dalším příkladu může být použito podávání rozpustného Nogo receptorového proteinu, který se váže na Nogo k léčení demyelinizační nemoci sdružené s Nogo nebo Nogo receptorovým proteinem. Toto agens může být použito k zabránění vazby Nogo k receptoru Nogo vázanému na buňku a působí jako antagonist Nogo. Rozpustné receptory byly použity k vazbě cytokinů nebo dalších ligandů k regulaci jejich funkce (Thomson, (1998) Cytokine Handbook, Academic Press). Rozpustný

receptor se vyskytuje v roztoku nebo vně membrány. Rozpustné receptory se mohou vyskytovat díky tomu, že chybí segment molekuly, který přemostuje nebo se spojuje s membránou. Tento segment je v oboru obecně nazýván transmembránová doména genu, nebo membránový vazebný segment proteinu. V některých provedeních podle vynálezu tedy rozpustný receptor obsahuje fragment nebo analog receptoru vázaného na membránu. Výhodně fragment obsahuje alespoň šest, například deset, patnáct, dvacet, pětadvacet, třicet, čtyřicet, padesát, šedesát nebo sedmdesát aminokyselin, za předpokladu, že si podrží požadovanou aktivitu.

V dalším provedení podle vynálezu je modifikována struktura segmentu, který se sdružuje s membránou (například DNA sekvenční polymorfismus nebo mutace v genu), takže receptor není vložen do membrány, nebo receptor je vložen, ale není v membráně zadržen. Rozpustný receptor se tedy na rozdíl od odpovídající na membránu vázané formy liší v jednom nebo více segmentech genu nebo receptorového proteinu, které jsou důležité pro jeho spojení s membránou.

Agens podle předkládaného vynálezu mohou být poskytnuta samotná nebo v kombinaci, nebo v sekvenční kombinaci s dalšími agens, která modulují konkrétní patologický proces. Například agens podle předkládaného vynálezu mohou být podávána v kombinaci s protizánětlivými agens po mozkové mrtvici jako prostředek blokující další neuronové poškození a inhibici axonové regenerace. Jak se v tomto textu používá, dvě agens jsou podávána v kombinaci, když tato dvě agens jsou podávána současně nebo jsou podávána nezávisle tak, že tato agens působí současně.

Agens podle předkládaného vynálezu mohou být podávána parenterálně, subkutánně, intravenózně, intramuskulárně, intraperitoneálně, transdermálně nebo bukálně. Například agens mohou být podávána lokálně do místa poranění mikroinfúzí. Typická místa zahrnují bez omezení poškozené úseky míchy v důsledku poranění nebo poškozená místa mozku v důsledku mozkové mrtvice. Alternativně nebo souběžně může být podávání perorálně. Podávaná dávka závisí na věku, zdravotním stavu a hmotnosti příjemce, druhu souběžné léčby, je-li nějaké, častosti léčení, a na povaze požadovaného účinku.

Předkládaný vynález dále poskytuje přípravky obsahující jedno nebo více agens, která moduluji expresi nebo alespoň jednu aktivitu proteinu podle vynálezu. Protože se potřeby jednotlivců liší, je stanovení optimálního rozmezí účinného množství každé složky na odborníkovi. Typické dávky jsou v rozmezí 1 pg/kg až 100 mg/kg tělesné hmotnosti. Výhodné dávky pro systémové podávání jsou 100 ng/kg až 100 mg/kg tělesné hmotnosti. Výhodné dávky pro přímé podávání na místo mikroinfúzí jsou v rozmezí 1 ng/kg až 1 µg/kg tělesné hmotnosti.

Kromě farmakologicky účinného agens mohou přípravky podle předkládaného vynálezu obsahovat vhodné farmaceuticky přijatelné nosiče obsahující excipienty a pomocné látky, které usnadňují zpracování účinných sloučenin do přípravků, které mohou být použity farmaceuticky pro aplikaci na místo působení. Vhodné formulace pro parenterální podávání zahrnují vodné roztoky účinných sloučenin ve formě rozpustné ve vodě, například soli rozpustné ve vodě. Kromě toho mohou být podávány suspenze účinných sloučenin jako vhodné olejové injekční suspenze. Vhodná lipofilní rozpouštědla nebo vehikula zahrnují mastné oleje, například, sezamový olej, nebo

syntetické estery mastných kyselin, například ethyloleát nebo triglyceridy. Vodné injekční suspenze mohou obsahovat látky, které zvyšují viskozitu suspenze a které zahrnují, například sodnou sůl karboxymethylcelulózy, sorbitol a dextran. Volitelně suspenze mohou také obsahovat stabilizátory. Mohou také být použity lipozomy pro opouzdření agens pro aplikaci do buňky.

Farmaceutický přípravek pro systémové podávání podle vynálezu může být formulován pro enterální, parenterální nebo topické podávání. Všechny tři typy formulací mohou být opravdu použity současně, aby se dosáhlo systémového podávání účinné složky. Vhodné formulace pro perorální podávání zahrnují tvrdé nebo měkké želatinové tobolky, pilulky, tablety, včetně potažených tablet, elixíry, suspenze, sirupy nebo inhalační přípravky a jejich formy se řízeným uvolňováním.

V realizaci předkládaného vynálezu mohou být použita agens podle tohoto vynálezu samotná nebo v kombinaci s dalšími terapeutickými nebo diagnostickými agens. V určitých výhodných provedeních mohou být sloučeniny podle tohoto vynálezu podávány společně s dalšími sloučeninami typicky předepisovanými pro tyto chorobné stavy podle obecně přijímané lékařské praxe, jako jsou například protizánětlivá agens, antikoagulancia, antitrombotika, včetně inhibitorů agregace destiček, aktivátorů tkáňového plazminogenu, urokinázy, prourokinázy, streptokinázy, aspirinu a heparinu. Sloučeniny podle tohoto vynálezu mohou být použity in vivo, obvykle u savců, jako jsou například lidi, ovce, koně, dobytek, prasata, psi, kočky, laboratorní potkani a myši, nebo in vitro.

L. Peptidová mimetika

Tento vynález také zahrnuje peptidová mimetika (peptidomimetika), která napodobují trojrozměrnou strukturu Nogo a blokuji vazbu Nogo na receptor Nogo. Taková peptidomimetika mohou mít významné výhody oproti přirozeně se vyskytujícím peptidům, včetně například ekonomičtější produkce, větší chemické stability, zesílených farmakologických vlastností (biologický poločas, absorpce, síla, účinnost, apod.), změněné specifčnosti (například široké spektrum biologických aktivit), redukovanou antigeničnost, a další.

V jedné formě jsou mimetika molekuly obsahující peptid, která napodobují prvky proteinové sekundární struktury (viz například Johnson et al., (1993) Peptide Turn Mimetics, in Biotechnology and Pharmacy, Pezzuto et al., (ed.) Chapman and Hall). Základním důvodem pro použití peptidomimetik je, že peptidový hlavní řetězec proteinů má hlavní funkci v tom, že slouží k orientaci aminokyselinových postranních řetězců tak, aby se usnadnily molekulární interakce, jako jsou například interakce protilátky a antigenu. Předpokládá se, že peptidomimetika umožní molekulární interakce podobné přírodní molekule.

V další formě jsou peptidové analogy obecně používány ve farmaceutickém průmyslu jako nepeptidové léky s vlastnostmi analogickými jako mají templátové peptidy. Tyto typy nepeptidových sloučenin jsou také nazývány "peptidová mimetika" nebo "peptidomimetika" (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,

která jsou zahrnuta v tomto textu v odkazech) a jsou obvykle vyvinuta pomocí počítačového molekulárního modelování.

Peptidomimetika, která jsou strukturně podobná terapeuticky použitelným peptidům, mohou být použita pro vyvolání totožného terapeutického nebo profylaktického účinku. Obecně jsou peptidomimetika strukturně podobná vzorovému polypeptidu (tj. polypeptidu, který má biochemickou vlastnost nebo farmakologickou aktivitu), jako je například extracelulární doména Nogo, ale mají jednu nebo více peptidových vazeb volitelně nahrazených vazbou vybranou ze skupiny sestávající se z: $-\text{CH}_2\text{NH}-$, $-\text{CH}_2\text{S}-$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2-$, $-\text{CH}=\text{CH}-$ (cis a trans), $-\text{COCH}_2-$, $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2-$ a $-\text{CH}_2\text{SO}-$, metodami v oboru známými a jsou dále popsány v následujících publikacích: Weinstein, (1983) Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Marcel Dekker, Morley, (1980) Trends Pharmacol. Sci. 1, 463-468 (obecný přehled), Hudson et al., (1979) Int. J. Pept. Protein Res. 14, 177-185 ($-\text{CH}_2\text{NH}-$, CH_2CH_2-), Spatola et al., (1986) Life Sci. 38, 1243-1249 ($-\text{CH}_2\text{S}-$), Hann, (1982) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1, 307-314 ($-\text{CH}-\text{CH}-$, cis a trans), Alinquist et al., (1980) J. Med. Chem. 23, 1392-1398 ($-\text{COCH}_2-$), Jennings-White et al., (1982) Tetrahedron Lett. 23, 2533 ($-\text{COCH}_2-$), Holladay et al., (1983) Tetrahedron Lett. 24, 4401-4404 ($-\text{C}(\text{OH})\text{CH}_2-$), a Hruby, (1982) Life Sci. 31, 189-199 ($-\text{CH}_2\text{S}-$), každý z nich je zahrnut v tomto textu v odkazech.

Značení peptidomimetik obvykle zahrnuje kovalentní připojení jeden nebo více značek, přímo nebo přes tzv. „spacer“ (oddělovací skupinu), například amidovou skupinu, k neinterferující poloze (polohám) na peptidomimetiku, která je predikována prostřednictvím údajů o kvantitativní struktuře a aktivitě a molekulárního modelování. Tyto neinterferující

polohy jsou obecně polohy, které netvoří přímé kontakty s makromolekulou (makromolekulami) (například nejsou kontaktní body v komplexech Nogo-receptor Nogo), ke které se peptidomimetika váží, aby vyvolaly terapeutický účinek. Derivatizace (například značení) peptidomimetik by nemělo v podstatě interferovat s požadovanou biologickou nebo farmakologickou aktivitou peptidomimetik.

Nogo peptidomimetika mohou být konstruována pomocí návrhu léků na základě struktury prostřednictvím nahrazení aminokyselin organickými skupinami (viz například Hughes, (1980) Philos. Trans. R. Soc. Lond. 290, 387-394, Hodgson, (1991) Biotechnol. 9, 19-21, Suckling, (1991) Sci. Prog. 75, 323-359).

Použití peptidomimetik může být zesíleno použitím kombinatorní chemie pro vytvoření lékových knihoven. Návrh peptidomimetik může být podporován identifikací aminokyselinových mutací, které zvýší nebo sníží vazbu Nogo k Nogo receptoru. Postupy, které mohou být použity, zahrnují kvasinkovou dvouhybridovou metodu (viz Chien et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 9578-9582) a použití metody vystavování na fágu („phage display“). Metoda dvouhybridová detekuje interakce protein-protein ve kvasinkách (Fields et al., (1989) Nature 340, 245-246). Metoda vystavování na fágu detekuje interakce mezi imobilizovaným proteinem a proteinem, který je exprimován na povrchu fágů, jako je například fág lambda a M13 (Amberg et al., (1993) Strategies 6, 2-4, Hogrefe et al., (1993) Gene 128, 119-126). Tyto metody umožňují pozitivní a negativní selekci interakcí protein-protein a identifikaci sekvencí, které určují tyto interakce.

Pro obecnou informaci o peptidové syntéze a peptidomimetikách, viz například Jones, (1992) Amino Acid and Peptide Synthesis, Oxford University Press, Jung, (1997) Combinatorial Peptide and Nonpeptide Libraries: A Handbook, John Wiley, Bodanszky et al., (1993) Peptide Chemistry - A Practical Textbook, Springer Verlag.

M. Transgenní zvířata

Termín "zvíře", jak se v tomto textu používá, zahrnuje všechny obratlovce, s výjimkou člověka („non-human animals“). Zahrnuje také jednotlivá zvířata ve všech stádiích vývoje, včetně embryonálních a fetálních stádií. Termín "transgenní zvíře" označuje zvíře obsahující jednu nebo více buněk nesoucích genetickou informaci získanou, přímo nebo nepřímo, úmyslnou genetickou manipulací na subcelulární úrovni, jako například mikroinjekcí nebo infekcí rekombinantním virem. Tato zavedená DNA molekula může být integrována v chromozomu, nebo může být DNA, která se replikuje extrachromozomálně. Termín "transgenní zvíře se zárodečnou buněčnou linií" se týká transgenního zvířete, do kterého byla genetická informace zavedena do buňky zárodečné linie, a tím zvíře získalo schopnost přenášet informaci na potomstvo. Jestliže má toto potomstvo opravdu některou nebo všechny takové informace, pak jsou také transgenními zvířaty. Transgenní zvířata obsahující mutované, „knock-out“, modifikované geny nebo genové konstrukty pro nadměrnou expresi nebo podmíněnou expresi genu odpovídajícímu cDNA sekvencím ze SEKVENCE ID. Č. 1 nebo 3 nebo příbuzným sekvencím, jsou zahrnuta ve vynálezu.

Genetická informace může být cizorodá pro živočišný druh, ke kterému patří příjemce, cizorodá pouze pro konkrétního

jednotlivého příjemce nebo pro genetickou informaci, kterou již příjemce má. Co se týče posledního případu, zavedený gen může být odlišně exprimován ve srovnání s nativním endogenním genem. Geny mohou být získány izolací z genomových zdrojů, přípravou cDNA z izolovaných RNA templátů, přímou syntézou, nebo kombinacemi některých z metod.

Aby byl exprimován, měl by gen být operativně spojen s regulačním úsekem. Regulační úseky, jako jsou například promotory, mohou být použity ke zvýšení, snížení, regulaci nebo označení určitých tkání nebo určitých stupňů vývoje exprese genu. Promotor nemusí být přirozeně se vyskytující promotor. "Transgenní zvířata, s výjimkou člověka" podle vynálezu vznikají zavedením "transgenů" do zárodečné linie zvířete jiného biologického druhu než člověka. Metody umožňující zavedení DNA do buněk jsou obecně k dispozici a v oboru známé. Mohou být použity různé metody pro zavedení transgenů. Obecně, zygota je nejlepší cíl pro mikroinjekce. U myši samčí pronukleus dosahuje velikosti přibližně dvacet mikronů v průměru, což umožňuje reprodukovatelnou injekci jednoho až dvou pikolitrů roztoku DNA. Použití zygot jako cílů pro genový transfer má velké výhody. Ve většině případů je injikovaná DNA zavedena do hostitelského genu před prvním dělením (Brinster et al., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 4438-4442). V důsledku toho téměř všechny buňky transgenního zvířete s výjimkou člověka nesou zavedený transgen. Obecně má toto také za následek účinný přenos transgenu na potomstvo zakladatele, protože 50 % zárodečných buněk obsahuje transgen. Mikroinjekce zygot je výhodný způsob pro zavedení transgenů při provádění praxe vynálezu.

Pro zavedení transgenu do zvířete s výjimkou člověka může také být použita retrovirová infekce. Vyvíjející se embryo

zvířete s výjimkou člověka může být pěstováno *in vitro* do stádia blastocysty. Během tohoto období mohou být blastomery cílem pro retrovirovou infekci. Účinné infekce blastomer je dosaženo enzymovým ošetřením za účelem odstranění zona pellucida. Virový vektorový systém použitý pro zavedení transgenu je typicky retrovirus neschopný replikace (replikačně defektní retrovirus) nesoucí transgen (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). Transfekce je snadno a účinně dosaženo pěstováním blastomer v jedné vrstvě buněk produkujících virus (Van der Putten et al., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6148-6152, Stewart et al., (1987) EMBO J. 6, 383-388). Alternativně může být prováděna infekce v pozdějším stádiu. Virus nebo buňky produkující virus mohou být injikovány do blastocély (Jahner et al., (1982) Nature 298, 623-628). Většina zvířat „zakladatelské“ generace je v transgenu mozaikou, protože zavedení genu nastane pouze v malé skupině buněk, které tvoří transgenní zvíře s výjimkou člověka. Kromě toho zakladatelské zvíře může obsahovat retrovirové inzerty transgenu v celé řadě pozic v genomu, které se obecně v potomstvu segregují. Kromě toho je také možné zavádět transgeny do zárodečné linie, i když s nízkou účinností, intraděložní retrovirovou infekcí embrya v průběhu gestace (Jahner et al., (1982) Nature 298, 623-628).

Třetí typ cílové buňky pro zavedení transgenu je embryonální kmenová buňka (ES). ES buňky se obvykle získávají z embryí před implantací pěstovaných *in vitro* (Evans et al., (1981) Nature 292, 154-156, Bradley et al., (1984) Nature 309, 255-256, Gossler et al., (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 9065-9069). Transgeny mohou být účinně zavedeny do ES buněk

DNA transfekcí nebo transdukci zprostředkovanou retroviry. Výsledné transformované ES buňky mohou pak být spojeny s blastocystami z živočichů jiného původu než lidského. ES buňky kolonizují embryo a mají podíl na zárodečné linii výsledného chimérického zvířete.

Metody hodnocení přítomnosti zavedené DNA, jakož i její exprese jsou snadno dostupné a v oboru známé. Tyto metody zahrnují, aniž by výčet byl omezující, DNA (Southern) hybridizaci pro detekci exogenní DNA, polymerázovou řetězovou reakci (PCR), elektroforézu v polyakrylamidovém gelu (PAGE) a Western blot pro detekci DNA, RNA a proteinů. Metody zahrnují také imunologické a histochemické techniky pro detekci exprese genu Nogo receptoru.

Jak se používá v tomto textu, termín "transgen" označuje DNA sekvenci zavedenou do zárodečné linie zvířete s výjimkou člověka intervencí člověka, jak je popsáno v příkladech níže. Sekvence nukleové kyseliny transgenu, v tomto případě forma SEKVENCE ID. Č. 1 nebo 3, může být integrována buď v lokusu genomu, kde tato konkrétní sekvence nukleové kyseliny není jinak normálně zjišťována, nebo v normálním lokusu pro transgen. Transgen se může skládat ze sekvencí nukleové kyseliny pocházejících z genomu stejného živočišného druhu nebo živočišného druhu jiného, než je živočišný druh cílového zvířete. Například axonová regenerace u myší postrádajících Nogo může být srovnána s regenerací u myší postrádajících MAG nebo oba, MAG a Nogo. Aby se určilo, zda je účinek anti-Nogo protilátky způsoben bloádou Nogo, účinky protilátky mohou být studovány u zvířat bez Nogo exprese.

Jak bylo diskutováno výše, nukleová kyselina podle vynálezu může být transfekována do hostitelské buňky s

použitím vektoru. Výhodné vektory jsou plazmidy a virové vektory, jako jsou například retroviry. Virové vektory mohou být použity k produkci transgenního zvířete podle vynálezu. Výhodně jsou virové vektory s defektem replikace, což znamená, že jsou neschopné autonomní replikace v cílové buňce. Obecně genom replikačně defektních virových vektorů, které jsou použity v rozsahu předkládaného vynálezu, postrádá alespoň jeden úsek, který je nezbytný pro replikaci viru v infikované buňce. Tyto úseky mohou být buď eliminovány (jako celek nebo částečně), nebo mohou být učiněny nefunkčními jakoukoliv technikou odborníkovi známou. Tyto techniky zahrnují celkové odstranění, substituci (dalšími sekvencemi, obzvláště vloženou nukleovou kyselinou), parciální delecí nebo adicí jedné nebo více bází k esenciálnímu (pro replikaci) úseku. Tyto techniky mohou být prováděny *in vitro* (na izolované DNA) nebo *in situ*, s použitím technik genetické manipulace nebo působením mutagenních agens.

Výhodně replikačně defektní virus obsahuje sekvence svého genomu, které jsou nezbytné pro opouzdření (enkapsidaci) virových částic. Retroviry jsou integrační viry, které infikují dělicí se buňky. Genom retroviru zahrnuje dvě LTR, enkapsidační sekvenci a tři kódující úseky (gag, pol a env). Konstrukce rekombinantních retrovirových vektorů byla popsána (viz například Bernstein et al., (1985) Genet. Eng. 7, 235, McCormick, (1985) Biotechnol. 3, 689-691). V rekombinantních retrovirových vektorech jsou geny gag, pol a env obecně odstraněny, jako celek nebo částečně, a jsou nahrazeny požadovnými heterologními sekvencemi nukleové kyseliny. Tyto vektory mohou být konstruovány z různých typů retrovirů, jako jsou například HIV, MoMuLV (Moloneyho virus myší leukémie), MSV (Moloneyho virus myšího sarkomu), HaSV (Harveyho virus

sarkomu), SNV (virus nekrózy sleziny), RSV (virus Rousova sarkomu) a Friendův virus.

Obecně, aby se konstruovaly rekombinantní retroviry obsahující sekvence nukleové kyseliny, je zkonstruován plazmid, který obsahuje LTR, enkapsidační sekvenci a kódující sekvenci. Tento konstrukt je použit pro transfekci sbalovací („pakážovací“) buněčné linie, kterážto buněčná linie je schopna poskytnout v trans retrovirové funkce, které v plazmidu chybí. Obecně jsou pakážovací buněčné linie tedy schopné exprimovat geny gag, pol a env. Takové pakážovací buněčné linie byly popsány ve stavu techniky, konkrétně buněčná linie PA317 (patent Spojených Států č. 4 861 719), buněčná linie PsiCRIP (WO9002806) a buněčná linie GP+envAm-12 (WO8907150). Kromě toho rekombinantní retrovirové vektory mohou obsahovat modifikace v LTR pro supresi transkripční aktivity, a také obsáhlé enkapsidační sekvence, které mohou obsahovat část genu gag (Bender et al., (1987) J. Virol. 61, 1639-1646). Rekombinantní retrovirové vektory jsou purifikovány standardními technikami odborníkům známými.

V jednom aspektu nukleová kyselina kóduje antisense RNA molekuly. V tomto provedení je nukleová kyselina operativně spojena s vhodnými regulačními úseky (diskutováno výše), což umožňuje expresi sekvence nukleové kyseliny, a je zavedena do buňky výhodně s použitím konstruktů rekombinantního vektoru, které exprimují antisense nukleovou kyselinu po zavedení vektoru do buňky. Příklady vhodných vektorů zahrnují plazmidy, adenoviry, adeno-asociované viry (viz například patent Spojených Států č. 4 797 368, patent Spojených Států č. 5 139 941), retroviry (viz výše), a herpetické viry. Pro aplikaci terapeutického genu je vektor výhodně adeno-asociovaný virus.

Adenoviry jsou eukaryotické DNA viry, které mohou být modifikovány tak, aby účinně aplikovaly nukleovou kyselinu podle vynálezu do celé řady buněčných typů. Existují různé sérotypy adenovirů. Z těchto sérotypů jsou pro použití výhodné podle oblasti předkládaného vynálezu humánní adenoviry typ dva nebo typ pět (Ad 2 nebo Ad 5) nebo adenoviry živočišného původu (viz WO9426914). Tyto adenoviry živočišného původu, které mohou být použity podle předkládaného vynálezu zahrnují adenoviry psího, bovinního, myšího, ovčího, prasečího, ptačího, a opičího původu.

Rekombinantní adenoviry s defektem replikace podle vynálezu mohou být připraveny jakoukoliv technikou odborníkovi známou. Konkrétně mohou být připraveny homologní rekombinací mezi adenovirem a plazmidem, který nese, *inter alia*, požadovnou DNA sekvenci. Homologní rekombinace je prováděna po společné transfekci uvedeného adenoviru a plazmidu do vhodné buněčné linie. Buněčná linie, která je použita, by měla být výhodně (i) transformovatelná uvedenými prvky, a (ii) obsahovat sekvence, které jsou schopné komplementovat část genomu adenoviru s defektem replikace, výhodně v integrované formě, aby se zabránilo riziku rekombinace. Rekombinantní adenoviry jsou opět získány a purifikovány s použitím standardních technik molekulární biologie, které jsou odborníkovi známy.

Byla vytvořena celá řada rekombinantních nebo transgenních myší, včetně těch, které exprimují aktivovanou sekvenci onkogenu (patent Spojených Států č. 4 736 866), exprimují opičí SV40 T-antigen (patent Spojených Států č. 5 728 915), postrádají expresi regulačního faktoru interferonu 1 (IRF-1) (patent Spojených Států č. 5 731 490), projevují dopaminergní dysfunkci (patent Spojených Států č. 5 723 719), exprimují

alespoň jeden humánní gen, který se podílí na kontrole krevního tlaku (patent Spojených Států č. 5 731 489), projevují velkou podobnost se stavem existujícím u přirozeně se vyskytující Alzheimerovy nemoci (patent Spojených Států č. 5 720 936), mají redukovanou kapacitu pro zprostředkování buněčné adheze (patent Spojených Států č. 5 602 307), mají bovinní gen růstového hormonu (Clutter et al., (1996) Genetics 143, 1753-1760) nebo jsou schopné vytvořit kompletní reakci na humánní protilátku (Zou et al., (1993) Science 262, 1271-1274).

I když myši a laboratorní potkani zůstávají zvířaty volby pro většinu transgenních experimentů, v některých případech je výhodné nebo dokonce nezbytné použít jiné živočišné druhy. Transgenní postupy byly úspěšně použity u celé řady jiných zvířat, včetně ovcí, koz, kuřat, křečků, králíků, krav a morčat (viz Aigner et al., (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 257, 843-850, Castro et al., (1999) Genet. Anal. 15, 179-187, Brink et al., (2000) Theriogenology 53, 139-148, Colman, (1999) Genet. Anal. 15, 167-173, Eyestone, (1999) Theriogenology 51, 509-517, Baguisi et al., (1999) Nat. Biotechnol. 17, 456-461, Prather et al., (1999) Theriogenology 51, 487-498, Pain et al., (1999) Cells Tissues Organs 165, 212-219, Fernandez et al., (1999) Indian J. Exp. Biol. 37, 1085-1092, patent Spojených Států č. 5 908 969, patent Spojených Států č. 5 792 902, patent Spojených Států č. 5 892 070, patent Spojených Států č. 6 025 540).

N. Diagnostické metody

Jeden způsob diagnostiky demyelinizační nemoci s použitím molekul nukleové kyseliny nebo proteinů podle vynálezu

zahrnuje získání vzorku tkáně od živých subjektů. Získání vzorků tkáně ze živých zdrojů je problematické u tkání, jako jsou například tkáně centrálního nervového systému. U pacientů trpících demyelinizační nemocí mohou být vzorky tkáně pro diagnostické metody získány méně invazivními postupy. Vzorky mohou být například získány z plné krve a séra.

Použití prostředků molekulární biologie se stalo rutinní ve forenzní technologii. Například mohou být použity sondy nukleové kyseliny pro určení exprese molekuly nukleové kyseliny obsahující celou nebo alespoň část sekvence sekvence id. č. 1 ve vzorcích forenzní patologie. Dále mohou být testy nukleových kyselin prováděny jakýmkoliv metodami analýzy transkripčního profilu. Kromě analýzy nukleových kyselin mohou forenzní metody podle vynálezu cílit protein kódovaný sekvencí id. č. 1, aby se určila up- nebo down-regulace genů (Shiverick et al., (1975) Biochim. Biophys. Acta 393, 124-133).

Způsoby podle vynálezu mohou zahrnovat ošetření tkání kolagenázami nebo dalšími proteázami, aby se tkáň zpřístupnila pro lýzu buněk (Semenov et al., (1987) Biull. Eksp. Biol. Med. 104, 113-116). Dále je možné pro analýzu získat vzorky biopsie z různých úseků mozku.

Testy pro detekci molekul nukleové kyseliny nebo proteinu podle vynálezu mohou být v jakémkoliv dostupném formátu. Typické testy molekul nukleové kyseliny obsahují formáty založené na hybridizaci nebo PCR. Typické testy detekce proteinů, polypeptidů nebo peptidů podle vynálezu zahrnují použití protilátkových sond v jakémkoliv dostupném formátu, jako jsou například vazebné testy *in situ*, apod. Viz Harlow & Lane, (1988) Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring

Harbor Laboratory Press. Ve výhodných provedeních jsou testy prováděny s vhodnými kontrolami.

Má se za to, že bez dalšího popisu může odborník s použitím předešlého popisu a následujících ilustrativních příkladů připravit a použít sloučeniny podle předkládaného vynálezu a užívat v praxi způsoby podle vynálezu. Následující příklady tudíž specificky zdůrazňují výhodná provedení předkládaného vynálezu a žádným způsobem neomezují popsany vynález.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Identifikace Nogo jak člena rodiny proteinů Reticulonů

Regenerace axonů dospělých savců je obecně úspěšná v periférii, ale bezúspěšně chabá v CNS. Ale bylo zjištěno, že mnoho tříd CNS axonů se může šířit na dlouhé vzdálenosti v transplantátech periferních nervů (Benfy & Aguayo (1982) Nature 296, 150-152). Srovnání myelinu CNS a periferní nervové soustavy (PNS) odhalilo, že bílá hmota CNS je selektivně inhibiční pro axonový růst (syn. extenzi, prodlužování, expanzi) (viz Schwab & Thoenen (1985) J. Neurosci. 5, 2415-2423). Bylo popsáno několik složek bílé hmoty CNS, NI35, NI250 (Nogo) a MAG s inhibiční aktivitou na axonovou extenzi (Wang et al. (1999), Transduction of inhibitory signals by the axonal growth cone, v Neurobiology of Spinal Cord Injury, Kalb & Strittmatter (vydavatelé) Humana Press, Caroni & Schwab,

(1988) J. Cell Biol. 106, 1281-1288, Spilhnann 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). Bylo publikováno, že protilátka IN-1 vypěstovaná proti NI35 a NI250 (Nogo) umožňovala mírný stupeň axonové regenerace a funkční zotavení po poranění míchy (Bregman et al. (1995) Nature 378, 498-501, Thallinair et al. (1998) Nature Neurosci. 1, 24-31). Předkládaný vynález identifikuje Nogo jako člena rodiny proteinů Reticulon.

Nogo je exprimován oligodendrocyty, ale ne Schwannovými buňkami a spojuje se hlavně s endoplazmatickým retikulem. Lumen-extracelulární doména Nogo obsahující 66 aminokyselin (SEQUENCE ID. Č. 20) inhibuje axonovou extenzi a vede ke kolapsu růstového vrcholu ganglia dorzálních kořenů. Jiné reticulonové proteiny nejsou exprimovány oligodendrocyty, a 66 aminokyselinová lumen-extracelulární doména jiných reticulon proteinů neinhibuje axonovou regeneraci. Tato data poskytují molekulární základ ke stanovení přínosu Nogo k selhání axonové regenerace v dospělém CNS.

Pro expresi a proteinovou purifikaci rekombinantní Nogo-A byla kompletní sekvence (KIAA0886) šlechetně poskytnuta výzkumným ústavem Kazusa DNA Research Institute. Kompletní kódující sekvence byla amplifikována polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) a ligována do vektoru pCDNA3,1-MycHis (Invitrogen) za vzniku plazmidu kódujícího Nogo-A fúzovaný v karboxylové koncové části k Myc epitopu (Nogo-A-Myc). Alternativně kódující sekvence byla amplifikována s použitím primerů, které kódují Myc epitop ve čtecím rámci hned aminokoncově k prvnímu zbytku a stop kodonu na karboxylové koncové části (Myc-Nogo-A). Expresní vektory Nogo-C-MycHis a Rtn1C-MycHis byly odvozeny stejným způsobem kromě toho, že

cDNA knihovna mozku dospělého laboratorního potkana byla použita jako templát pro reakci PCR s primery založenými na Nogo-C nebo Rtn1C sekvencích (Van de Velde et al. (1994) J. Cell. Sci. 107, 2403-2416).

Část Nogo-A kódující 66 aminokyselinový lumen-extracelulární fragment Nogo-A byla amplifikována pomocí PCR a ligována do plazmidu pGEX-2T za vzniku prokaryotického expresního vektoru pro GST-Nogo fúzní protein. Podobné oblasti Rtn1, Rtn2 a Rtn3 byly amplifikovány pomocí „hnízdové“ PCR („nested“ PCR) s použitím cDNA knihovny mozku dospělého laboratorního potkana jak templátu a ligovány do pGEX-2T. *E. coli* transformované těmito plazmidy byly indukovány IPTG. Rozpustné nativní GST fúzní proteiny byly purifikovány s použitím glutathionové pryskyřice a obsahovaly přibližně 75% GST a 25% kompletní GST-Nogo nebo GST-Rtn protein. Většina GST-Nogo proteinu nebyla extrahovatelná za nadenaturačních podmínek, ale extrakt z 8M močoviny dialyzovaný proti PBS obsahoval přes 98 % čistého GST-Nogo.

Myc imunoreaktivita byla zjištěitelná se zjevnou velikostí v rozmezí 225 kD v redukčních podmínkách (data nejsou ukázána). Tedy cDNA řídí expresi proteinu s patřičnou elektroforetickou pohyblivostí a aminokyselinovou sekvencí Nogo, který byl nazván humánní Nogo-A (hNogo-A).

Konzervativní karboxylový konec Rtn rodiny proteinů obsahuje dvě hydrofobní domény oddělené prostřednictvím hydrofilního segmentu se 66 aminokyselinovými zbytky. Žádná z těchto sekvencí neobsahovala signální peptid. Predikovaná topologie pro tyto proteiny ukazuje, že amino a karboxylový konec zůstávají v cytosolu, a konzervativní oblast se sdružuje s lipidovou dvojvrstvou. Pro Rtn1-A existuje experimentální důkaz prokazující, že polypeptid reaguje jako integrální

membránový protein, a že za toto chování jsou odpovědné hydrofobní segmenty konzervativní domény (Van de Velde et al. (1994) J. Cell. Sci. 107, 2403-2416). Nogo se značkou Myc je také spojován s granulárními frakcemi a je extrahován pomocí detergentu, ale nikoli o vysoké iontové síle (data nejsou ukázána).

Když je nadměrně exprimován v buňkách ledvin, je Rtn1 protein lokalizován hlavně na endoplazmatickém retikulu (ER) v jemně granulovaném typu, odtud pochází název Reticulon (Van de Velde et al. (1994) J. Cell. Sci. 107, 2403-2416). Existuje di-lyzinový ER retenční motiv na karboxylové koncové části Nogo a většině Rtn proteinů (Van de Velde et al. (1994) J. Cell. Sci. 107, 2403-2416, Jackson et al. (1991) EMBO J. 9, 3153-3162). V neuronech je Rtn1 exprimován všude ve výběžcích a je koncentrován v růstových vrcholech (Senden et al. (1996) Eur. J. Cell. Biol. 69, 197-213). Jeho lokalizace v transfekovaných buňkách ledvin vedla k návrhu že Rtn1 by mohlo řídit třídění proteinů nebo jiné aspekty funkce ER (Van de Velde et al. (1994) J. Cell. Sci. 107, 2403-2416). Jak A, tak C sestřihové formy Nogo projevují retikulární distribuci, když jsou exprimovány v buňkách COS-7, podobně jako Rtn1-C.

Příklad 2

Polyklonální protilátky proti Nogo

Predikovaná intramembránová topologie dvou hydrofobních domén Nogo ukazuje, že 66 aminokyselinových zbytků mezi těmito segmenty je lokalizováno na lumen/extracelulárním povrchu membrány. Aby se toto prozkoumalo dále, bylo vytvořeno antisérum namířené proti 66 aminokyselinové doméně.

Pro produkci protilátky a imunohistologické vyšetření byly získány anti-Myc imunoblotty a imunohistologické vyšetření s 9E10 protilátkou tak, jak bylo popsáno v práci Takahashi et al. ((1998) Nature Neurosci., 1, 487-493 & Takahashi et al. (1999) Cell, 99, 59-69). fúzní protein GST-Nogo byl použit jako imunogen, aby vzniklo anti-Nogo králičí antisérum. Protílátka byla afinitně purifikována a použita v koncentraci 3 µg/ml pro imunohistologii a 1 µg/ml pro imunoblotty. Aby se stanovila specifita antiséra, bylo prováděno barvení v přítomnosti proteinu GST-Nogo v koncentraci 0,1 mg/ml. Pro barvení živých buněk byly buňky inkubovány v roztocích primární protilátky ve 4°C po dobu jedné hodiny v Hankově vyváženém solném roztoku s 0,05% BSA a 20mM Na-Hepes (pH 7,3). Po fixaci byla navázaná protílátka detekována inkubací s fluorescenčně značenými sekundárními protilátkami.

Protílátka detekovala nízkou hladinu povrchové exprese tohoto epitopu, zatímco Myc epitop na karboxylové koncové části exprimovaného Nogo nebyl detekován, dokud nebyly buňky permeabilizovány. Toto povrchové barvení bylo přičítáno malé části Nogo proteinu spojeného s plazmatickou membránou a ne s ER membránou. Tato data podporují topografický model, kde aminokonec a karboxylový konec proteinu se zdržují v cytoplazmě a 66 aminokyselin proteinu vyčnívá do lumen-extracelulární strany ER nebo plazmatické membrány.

Příklad 3

Exprese Nogo v centrálním nervovém systému

Jestliže je Nogo hlavní přispěvatel k tomu, že CNS myelin má inhibiční vlastnosti na růst axonů na rozdíl od PNS myelinu

(Caroni & Schwab, (1988) J. Cell Biol. 106, 1281-1288, Spillmann et al. (1998) J. Biol. Chem. 73, 19283-19293, Bregman et al. (1995) Nature 378, 498-501), pak by měl být Nogo exprimován v CNS myelinu dospělých, ale ne v PNS myelinu. Byla prováděna analýza exprese Nogo pomocí Northern blotů s použitím sond získaných z cDNA z 5' Nogo-A/B-specifické oblasti a ze 3' Nogo společné oblasti. Byl detekován jednotlivý pás o velikosti přibližně 4,1 kilobáze s 5' sondou ve vzorcích celkové RNA ze zrakového nervu dospělého laboratorního potkana, ale ve vzorcích ischiatického nervu. Výsledky ukazují, že klon Nogo-A je kompletní cDNA, a jsou konzistentní s úlohou Nogo jako inhibitoru axonového růstu specifického pro CNS myelin. Analýza pomocí Northern blotů s 3' sondou odhalila, že zrakový nerv exprimuje vysoké hladiny Nogo-A mRNA a mnohem nižší hladiny Nogo-B a Nogo-C. Celý mozek exprimuje oba Nogo-A a Nogo-C, ale celá řada periferních tkání (včetně ischiatického nervu) exprimuje Nogo málo nebo vůbec ne. Exprese Nogo-C/Rtn4-C byla prokázána v kosterním svalu a adipocytech, právě tak jako v mozku (Morris et al. (1991) Biochim. Biophys. Acta 1450, 68-76). Zdá se, že v Rtn rodině je exprese zrakového nervu selektivní pro Nogo, bez zjištěné exprese Rtn 1 nebo Rtn 3. Rtn 2 nebyl zkoumán.

In situ hybridizace odhalila Nogo mRNA v buňkách s morfologií oligodendrocytů ve zrakovém nervu a pyramidálních drahách dospělých laboratorních potkanů. V mozku je také exprese Nogo detekována v populacích určitých neuronů. Na rozdíl od Nogo, Rtn1 a Rtn3 nejsou exprimovány ve zrakovém nervu, ale mRNA byla detekována v populacích určitých neuronů. Lokalizace Nogo proteinu byla analyzována v kulturách míchy ošetřených s PDGF a málo séra, aby byla indukována diferenciace oligodendrocytů, s použitím anti-Nogo protilátek a monoklonální protilátky O4 specifické pro oligodendrocyty.

V živých buňkách jsou detekovány na povrchu oligodendrocytů jak lumen-extracelulární 66 aminokyselinová klička Nogo, tak antigen O4. Přibližně polovina O4-pozitivních buněk v těchto kulturách vykazuje povrchové barvení na Nogo.

Příklad 4

Kolaps růstového vrcholu zprostředkovaný Nogo

Pro všechny experimenty týkající se tkáňových kultur byly použity následující metody. Kultury E10 a E12 explantátů ganglií dorzálních kořenů zárodečných kuřecích linií a oddělených neuronů používaly metody popsané pro kultury E7 ganglií dorzálních kořenů (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). Buňky PC12 diferenciované NGF byly pěstovány, jak popsáno (Strittmatter et al., (1994) J. Neurosci. 14, 2327-2338). Explantáty embryonální míchy (potkaní E10 nebo kuřecí E5) byly pěstovány po dobu 7-14 dnů v přítomnosti PDGF-AA, aby se indukovala diferenciací některých buněk na zralé oligodendrocyty (Vartanian et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 731-735). Postup testů kolapsu růstových vrcholů je totožný s analýzou kolapsu růstových vrcholů indukovaného Sema3A (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). Byla také popsána metoda pro analýzu celkového výrůstku neuritu (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). V testech výrůstků byly proteiny a peptidy

přidávány jednu hodinu po nanesení na misky, aby se minimalizoval jakýkoliv účinek na celkové počty adherovaných buněk. Pro testování účinku GST navázaného na substrát nebo GST-Nogo, byly roztoky proteinů sušeny na sklíčkách pokrytých poly-L-lyzinem, promyty, a pak potaženy lamininem. U kultur E12 byla neuronová identita buněk verifikována barvením protilátkami proti neurofilamentům (2H3, Developmental Studies Hybridoma Bank) a neurity byly sledovány pozorováním barvení rhodaminem-faloidinem F-aktinu ve výbězcích.

Expresí rekombinantního Nogo v buňkách HEK293T umožňuje přesný test toho, zda má tento protein inhibiční účinky na axonové výrůstky. promyté frakce membrán z buněk HEK293T transfekovaných vektorem nebo hNogo-A-Myc byly přidány ke kuřecím kulturám E12 explantátů ganglií dorzálních kořenů. Morfologie růstových vrcholů byla hodnocena po třiceti minutách inkubace ve 37 °C fixací a barvením rhodaminem-faloidinem.

Kontrolní membrány HEK neměly žádný zjistitelný účinek na morfologii růstových vrcholů. Membránové frakce obsahující Nogo-A indukovaly kolaps většiny růstových vrcholů ganglií dorzálních kořenů. Tento kolaps růstových vrcholů indikuje inhibiční aktivitu na extenzi axonů a je také prokazatelná Nogo inhibice axonové extenze (viz níže). Forma Nogo-C také vykazuje kolapsovou aktivitu, což indikuje, že sdílený karboxylový konec proteinu včetně hydrofobních segmentů a 66 aminokyselinová lumen-extracelulární doména obsahuje funkčně důležité zbytky. Další inhibiční aktivita v amino koncové oblasti Nogo-A není těmito studiemi vyloučena. Citlivost nezralejších kultur explantátů kuřecích zárodků E10 nebo zárodků laboratorního potkana E15 (data nejsou ukázána) je značně menší. Vývojová regulace citlivosti je konzistentní

s experimenty používající částečně purifikovaný Nogo (Bandtlow et al. (1997) Eur. J. Neurosci. 9, 2743-2752).

V Nogo-C proteinu, který způsobuje kolaps růstového vrcholu, hydrofilní lumen-extracelulární doména 66 s větší než pravděpodobností interaguje s povrchem neuronů ganglií dorzálních kořenů, než hydrofobní domény vložené do membrány. Pro otestování této hypotézy byla 66 aminokyselinová oblast hNogo exprimována a purifikována v *E. coli*. Většina fúzního proteinu GST-Nogo se akumuluje v inkluzních tělískách, ale protein může být získán extrakcí močovinou. Tato vymezená oblast Nogo má silnou ($EC_{50} = 50$ nM) aktivitu na kolaps růstových vrcholů kuřecích neuronů dorzálních kořenů E12 (data nejsou ukázána). Proteinový preparát extrahovaný močovinou pravděpodobně představuje pouze malou frakci Nogo sekvence v aktivní konformaci. Proto bylo purifikováno 10 % GST-Nogo rozpustného v *E. coli* s použitím pryskyřice glutathion-Sepharose. Tento preparát je dokonce silnější než protein extrahovaný močovinou coby faktor vyvolávající kolaps, akutní mění morfologii růstových vrcholů v koncentracích nízkých i 1 nM.

Nanomolární účinnost je stejná jako pro většinu známých fyziologických regulátorů vodivosti axonů. Extenze axonů z neuronů ganglií dorzálních kořenů a buněk PC12 diferencovaných NGF je také blokována tímto rozpustným GST-Nogo proteinem v nM koncentracích (data nejsou ukázána). Když je GST-Nogo navázán na povrch substrátu, axonová extenze z neuronů ganglií dorzálních kořenů nebo buněk PC12 je redukována na nezjistitelné hladiny. Toto jsou selektivní účinky spíše na axonovou extenzi než na přežití buňky, protože GST-Nogo neredukuje počet adherovaných buněk pozitivních na barvení neurofilament (137 ± 24 % kultur ošetřených GST) ani

významně nemění počet apoptotických jader identifikovaných barvením DAPI ($4,0 \pm 1,7$ % v kontrolních kulturách a $5,2 \pm 1,1$ % ve vzorcích ošetřených GST-Nogo).

Zdá se, že oligodendrocyty exprimují z Rtn proteinů selektivně Nogo. Aby se vyšetřila selektivita úlohy Nogo v inhibici axonové regenerace, byla zvažována inhibiční aktivita jiných Rtn proteinů na axonovou extenzi. Predikované lumen-extracelulární 66 aminokyselinové fragmenty Rtn1, Rtn2 Rtn3 byly exprimovány jako GST fúzní proteiny a purifikovány v nativní formě. V koncentracích, ve kterých Nogo fragment způsobuje kolaps většiny růstových vrcholů ganglií dorzálních kořenů E12, nemění jiné Rtn proteiny morfologii růstových vrcholů (data nejsou ukázána). Inhibiční aktivita na axonovou regeneraci je tudíž specifická v Rtn rodině pro Nogo.

Příklad 5

Peptidová agens receptoru Nogo

Aby se dále definovala aktivní doména Nogo, byly syntetizovány peptidy s 25 aminokyselinovými zbytky odpovídající segmentům 66 aminokyselinové sekvence. Peptid odpovídající zbytkům 31 až 55 extracelulárního fragmentu Nogo vykazuje aktivitu na kolaps růstových vrcholů (obrázek 2) a inhibici výrůstku (data nejsou ukázána) v koncentracích $4 \mu\text{M}$. Zatímco tato sekvence může poskytnout jádro inhibiční domény, 66 aminokyselinový fragment je jasně vyžadován pro plnou účinnost. Je zajímavé, že toto je oblast 66 aminokyselinové domény, která sdílí nejméně podobnost s dalšími Rtn proteiny, což je konzistentní s tím, že jiní členové rodiny jsou inaktivní coby inhibitory axonové regenerace. Rtn1

lumen-extracelulární peptid s 31 až 55 aminokyselinami opravdu neprojevuje žádnou aktivitu na kolaps růstového vrcholu (data nejsou ukázána).

Výše uvedená experimentální data identifikují Nogo jako člena Rtn rodiny specifického pro oligodendrocyty a ukazují, že samostatná doména Nogo může inhibovat extenzi axonů. Další Rtn proteiny tuto aktivitu nemají. Exprese Nogo v oligodendrocytech, ale ne ve Schwannových buňkách, tedy přispívá k selhání axonové regenerace v CNS dospělých savců ve srovnání s PNS dospělých. Relativní příspěvek Nogo ve srovnání s jinými složkami myelinu CNS k nepermisivní povaze bílé hmoty CNS teď může být charakterizován na molekulární úrovni.

Zatímco současná experimentální data jsou konzistentní s úlohou Nogo v blokování axonové regenerace CNS dospělých po patologickém poranění, může to být také ve vztahu s fyziologickou úlohou Nogo v nepatologických stavech. Na základě studií o lokalizaci se předpokládá, že další Rtn proteiny mají úlohu ve funkci ER (Van de Velde et al. (1994) J. Cell. Sci. 107, 2403-2416). Většina Nogo je distribuována retikulárně v COS-7 buňkách a zdá se, že pouze menšina je přístupná na povrchu buněk.

Příklad 6

Inhibice aktivity Nogo

Předešlé příklady prokázaly, že 66 aminokyselinová oblast blízko karboxykoncové části Nogo inhibuje extenzi axonů a je exprimována na buněčném povrchu. Kratší, dvacet pět aminokyselin dlouhé segmenty této domény jsou buď inertní jako inhibitory růstu nebo mají mnohem nižší účinnost (GrandPré et

al. (2000) Nature 403, 439-444). Oblast 31 až 55 z tohoto 66 aminokyselinového segmentu má slabou inhibiční aktivitu, co se týče kolapsu růstového vrcholu a inhibice růstu axonů. Aby mohl být blokován účinek Nogo *in vivo*, byl by vysoce potřebný kompetitivní antagonist Nogo, který se váže ke stejnému místu receptoru, ale neprojevuje vlastní biologický účinek. Různé fragmenty 66 aminokyselinové oblasti byly testovány jako blokátory inhibice axonového růstu zprostředkovaného Nogo. Pro tento účel byly používány dva testy. První je test kolapsu růstového vrcholu a druhý je vazebný test.

V testu kolapsu růstového vrcholu byla reakce na Nogo měřena v přítomnosti různých potenciálních antagonistických peptidů. Tři peptidy o velikosti dvacet pět aminokyselin (1 až 25, 11 až 35 a 21 až 45) z 66 aminokyselinové oblasti mají blokující aktivitu v μM koncentracích (obrázek 2). Kombinace všech tří peptidů nemění morfologii růstového vrcholu v bazálních podmínkách, ale zcela zabrání kolapsu vyvolanému 15 nM GST-Nogo. Stejná směs peptidů je také schopná blokovat kolaps růstového vrcholu indukovaný nízkou dávkou CNS myelinu. Tato blokáda podporuje hypotézu, že Nogo je primární inhibiční složka CNS myelinu. Dále má blokáda vlastnosti očekávané u kompetitivního antagonismu, neboť nepůsobí při vysokých dávkách CNS myelinu.

Aby se vyvinul antagonist s vyšší specifitou a účinností, byl testován delší fragment Nogo. Výhodně takový peptid samotný nemá žádnou vlastní inhibiční aktivitu na axonovou extenzi při kompetitivní blokádě účinku Nogo. Fragment Nogo o velikosti 2 až 41 je acetylován v karboxylové koncové části a amidován na amino koncové části a je nejúčinnější blokátor Nogo doposud definovaný. Pep2-41 ruší kolaps růstových vrcholů indukovaný GST-Nogo a má jasnou K_i 150 nM ve vazebném testu

(obrázek 3). Fragment 2-41 také blokuje schopnost jak purifikovaného Nogo-66 proteinu, tak surového CNS myelinu inhibovat extenzi neuritů v kultivovaných neuronech (obrázek 4).

Příklad 7

Identifikace Nogo receptoru

Byl vyvinut vazebný test Nogo, který je založen na využití široce používané metody zkoumající působení semaforinu a efrinu na vodivé funkce axon (Flanagan & Vanderhaeghen, (1998) Annu. Rev. Neurosci. 21, 309-345, Takahashi et al. (1999) Cell 99, 59-69). Používá fúzi placentární alkalické fosfatázy (AP) ke zkoumanému ligandu, za vzniku biologicky aktivního vazebného činidla receptoru, které může být detekováno velice citlivým kolorimetrickým testem. Pro Nogo byl vytvořen expresní vektor kódující signální peptid, značku His6 pro purifikaci, AP a aktivní doména z Nogo velikosti 66 aminokyselin. Fúzní protein může být purifikován z kondiciovaného média transfekovaných buněk v miligramových množstvích (obrázek 5). Tento protein je biologicky aktivní jako činidlo způsobující kolaps růstových vrcholů, s EC_{50} 1 nM. AP-Nogo je skutečně nepatrně účinnější než GST-Nogo, možná proto, že protein je syntetizován v eukaryotických a ne v prokaryotických buňkách. Počáteční studie odhalily na axonech saturovatelná místa s vysokou afinitou. Vazba je blokována prostřednictvím GST-Nogo a antagonistickými peptidy o 25 aminokyselinách, což je konzistentní s kompetitivní vazbou na neuronové receptorové místo. Vzhledem ke zjevné K_d (3 nM) pro tato místa blízko k EC_{50} AP-Nogo v testu kolapsu, je

pravděpodobné, že místa jsou fyziologický relevantní Nogo receptory.

Tento test byl použit pro expresní klonování Nogo receptoru. Sloučené cDNA expresních knihoven myšního dospělého mozku představují 250 000 nezávislých klonů byly transfekovány do buněk COS-7, které nejsou neurony. Netransfekované buňky COS-7 nevážou AP-Nogo, ale po transfekci s dvěma sloučenými skupinami o 5 000 klonech bylo prokázáno několik buněk se silnou vazbou AP-Nogo. Jednotlivé cDNA klony kódující Nogo vazebné místo byly izolovány „sib-selekcí“ z každého ze dvou pozitivních skupin. Dva nezávisle izolované klony byly navzájem identické, až na extenzi o velikosti 100 bp z 5' netranslatované oblasti v jednom klonu. Transfekce těchto klonů do buněk COS-7 poskytla vazebné místo s afinitou pro AP-Nogo totožnou s afinitou pozorovanou v neuronech ganglií dorzální kořenu E13, K_d pro vazbu je přibližně 3 nM (obrázek 6). Samotná AP se neváže s jakkoli zjistitelnou afinitou k těmto transfekovaným buňkám, což ukazuje, že afinita je způsobená 66 aminokyselinami pocházejícími z Nogo. Navíc GST-Nogo z těchto míst AP-Nogo vytlačuje.

Tato cDNA kóduje nový protein o 473 aminokyselinách. Není žádná publikovaná cDNA s významnou homologií v GenBank. Predikovaný protein obsahuje signální peptid následovaný osmi repetitivy bohatými na leucin, unikátní doménu a predikované místo GPI kotvy (obrázek 7). Humánní homolog myší cDNA byl identifikován, který sdílí z 89 % totožné aminokyseliny. Existence této cDNA byla predikovaná z myší cDNA struktury a analýzy humánní genomové sekvence deponované v GenBank jako části projektu sekvencování lidského genomu. Exony humánní cDNA se vyskytují v oblasti přes 35 kilobází a cDNA nebyla dříve v genomové sekvenci rozpoznána. Proteinová struktura je

konzistentní s proteinem buněčného povrchu schopného vazby Nogo. Povaha proteinu spojená s GPI svědčí pro to, že zde může být druhá receptorová podjednotka, která přemostuje plazmatickou membránu a zprostředkovává Nogo signální transdukcii.

Příklad 8

Tkáňová distribuce receptoru Nogo

Distribuce mRNA pro tento Nogo receptor je konzistentní s úlohou proteinu v regulaci axonové regenerace a plastičnost dospělé CNS. Northern analýza ukazuje jediný pás o velikosti 2,3 kilobáze v dospělém mozku, ukazující, že izolovaný klon Nogo receptoru je kompletní (obrázek 8). Nízké hladiny této mRNA jsou pozorovány v srdci a ledvinách, ale ne v jiných periferních tkáních. V mozku je exprese rozšířená a oblasti nejbohatší na šedou hmotu exprimují nejvyšší hladiny mRNA.

Příklad 9

Biologické účinky různých Nogo domén

Testy účinku Nogo-A zahrnují kolaps růstového vrcholu, růstu neuritů a šíření fibroblastů, s rozpustnými proteinovými preparáty s navázaným substrátem (Caroni & Schwab, (1988) J. Cell Biol. 106, 1281-1288, GrandPré et al. (2000) Nature 403, 439-444, Chen et al. (2000) Nature 403, 434-439, Prinjha et al. (2000) Nature 403, 483-484). V testech morfologie fibroblastů 3T3 neinhiboval Nogo-66 s navázaným substrátem šíření (obrázek 1 b, e). Protože preparáty NI250 a kompletní

Nogo-A jsou pro šíření 3T3 nepermissivní, bylo třeba uvážit, zda různé domény Nogo mohou řídit tuto *in vitro* aktivitu. Aby se usnadnilo srovnání různých Nogo-A domén, byl exprimován kyselý aminokoncový fragment o velikosti 1040 aminokyselin (Amino-Nogo) jako protein se značkou Myc-his v buňkách HEK293T (obrázek 1 d). Protein Nogo je přítomen v cytosolových frakcích. Povrchy potažené purifikovaným proteinem Amino-Nogo nepodporovaly šíření fibroblastů 3T3 (obrázek 1 b, e). Podobné výsledky byly pozorovány u linie pocházející z buněk ledvin, COS-7 (obrázek 1 f). Zdá se tedy, že amino koncová doména zodpovídá za účinek kompletního Nogo-A na fibroblasty. Nogo-66 doména je specifické pro neurony, nepůsobí na jiné buňky.

Kultury ganglií dorzálních kořenů byly také vystaveny působení proteinu Amino-Nogo (obrázek 1c, g-i). Pokud jde o fibroblasty 3T3, buňky podobné fibroblastům v kulturách ganglií dorzálních kořenů se na tomto substrátu nešířily. Kromě toho, axonová extenze je redukována na nízké hladiny na povrchu potaženém Amino-Nogo. Tak, zatímco účinky Nogo-66 jsou specifické pro neurony, inhibiční působení domény Amino-Nogo je obecnější. Když je přítomen v rozpustné formě v koncentraci 100 nM, polypeptid Nogo-66 vyvolává kolaps růstových vrcholů ganglií dorzálních kořenů kuřecí kultury E12 a téměř ruší axonovou extenzi, jak bylo popsáno dříve (GrandPré et al. (2000) Nature 403, 439-444). V patrném rozporu je, že rozpustný protein Amino-Nogo se jeví inaktivní, a nemoduluje významně morfologii růstových vrcholů ganglií dorzálních kořenů nebo axonovou extenzi ganglií dorzálních kořenů nebo šíření buněk jiných než neuronů (obrázek 1c, g-i).

V experimentech Walshe a kolegů (Prinjha et al. (2000) Nature 403, 483-484), byly studovány cerebelární granulární neurony a rozpustný Amino-Nogo byl přítomen jako Fc fúzní

protein, pravděpodobně ve formě dimeru. Bylo tedy nutno uvážit, zda tyto rozdíly mohou vysvětlit inaktivitu rozpustného Amino-Nogo. Myší cerebelární granulární neurony P4 odpovídaly na Nogo preparáty způsobem nerozeznatelným od kuřecích neuronů ganglií dorzálních kořenů E13 (obrázek 1i). Amino-Nogo dimerizovaný s anti-Myc protilátkou inhibuje šíření 3T3 a COS-7 (obrázek 1 e, f) a má tendenci redukovat extenzi cerebelárních axonů (obrázek 1 i). Když je dále agregován přidáním anti-myší IgG protilátky, Amino-Nogo významně redukuje oba axonové výrůstky, ganglií dorzálních kořenů i cerebelární (obrázek 1 h, i). Zatímco protein Amino-Nogo je zcela kyselý, samotný elektrostatický náboj nevysvětlí jeho inhibiční účinky, protože poly-Asp nemění šíření buněk nebo axonovou extenzi (obrázek 1 e,f,h). Nogo-66 doména je tedy silný a neuronově specifický inhibitor, zatímco intracelulární Amino-Nogo doména inhibuje mnoho buněčných typů a zdá se, že působí pouze v agregovaném stavu.

Příklad 10

Lokalizace receptoru Nogo

Pro další charakterizaci exprese receptoru proteinu Nogo-66 bylo vyvinuto antisérum k fúznímu proteinu GST-Nogo receptor. Toto antisérum detekuje selektivně protein o velikosti 85 kD v buňkách HEK293T exprimujících Nogo-66 receptor (obrázek 9a) a specificky barví buňky COS-7 exprimující Nogo-66 receptor (obrázek 9b).

Imunohistologické barvení kuřecích kultur embryonální míchy lokalizují protein do axonů, což je konzistentní se zprostředkováním inhibice axonového růstu indukované Nogo-66.

Exprese receptoru Nogo-66 nebyla zjištěna v O4-pozitivních oligodendrocytech, které exprimují Nogo-66. Imunoreaktivní protein o velikosti 85 kD je exprimován v neuronových preparátech z kuřecích ganglií dorzálních kořenů E13 vnímavých na Nogo-66, ale do mnohem nižšího stupně v slabě vnímavých tkáních z kuřecích ganglií dorzálních kořenů E7 a kuřecí sítnice E7 (obrázek 9a). Celkově je typ exprese Nogo-66 konzistentní s axonovou inhibicí Nogo-66 zprostředkovanou proteinem.

Tato protilátka je také účinná při lokalizaci receptoru Nogo-66 proteinu v tkáňových řezech (obrázek 9c). Zatímco je z hybridizačních studií *in situ* jasné, že protein je exprimován v mnoha třídách neuronu, imunohistologické vyšetření odhalilo protein ve vysokých hladinách v bílé hmotě CNS v profilech konzistentních s axony. Protein je zjistitelný v nižších hladinách v neuronových tělech a v neuropili. To poskytuje další podklad pro navrhovanou funkci tohoto proteinu při zprostředkování interakcí s oligodendrocyty.

Příklad 11

Receptor Nogo zprostředkovává Nogo-66 reakce

Receptorový Nogo-66 protein je nezbytný pro činnost Nogo-66 a není to jenom vazebné místo s funkcí nesouvisející s inhibicí axonového růstu. První předpověď je, že ošetření fosfolipázou C specifickou pro fosfoinositol (PI-PLC), které odstraní proteiny spojené s glykofosfatidylinositolem (GPI) z neuronového povrchu, učiní neurony necitlivé na Nogo-66. Tato předpověď platí pro kuřecí neurony ganglií dorzálních kořenů E13, ošetření PI-PLC ruší vazbu AP-Nogo a kolaps růstových

vrcholů indukovaný GST-Nogo-66 (obrázek 10 a-c). Jako kontrola, reakce Sema3A v paralelních kulturách není změněna ošetřením PI-PLC. Ovšem očekává se, že ošetření PI-PLC odstraní velký počet proteinů z axonového povrchu, takže tento výsledek ponechává otevřenou možnost, že jiné proteiny spojené s GPI jsou zprostředkovávány reakcí Nogo-66 v neošetřených kulturách.

Aby se prokázalo, že Nogo-66 receptor je schopný zprostředkovat Nogo-66 inhibici axonového výrůstku, protein byl exprimován v neuronech postrádajících Nogo-66 reakci. Byly zkoumány neurony ganglií dorzálních kořenů a sítnice z E7 kuřecích embryí. Nogo reakce v neuronech ganglií dorzálních kořenů z tohoto vývojového stadia jsou slabé, ale v některých kulturách mohou být detekovány nepatrné reakce (data nejsou ukázána). Růstové vrcholy ganglií retinálních buněk E7 jsou jednotně necitlivé na kolaps růstových vrcholů indukovaný Nogo-66 (obrázek 10 e), nevážou AP-Nogo (data nejsou ukázána) a neprokazují anti-Nogo-66 receptorový imunoreaktivní protein o velikosti 85 kD (obrázek 9a). Expresí NgR v těchto neuronech infekcí rekombinantními HSV preparáty propůjčuje axonovým růstovým vrcholům ganglií retinálních buněk citlivost na kolaps indukovaný Nogo-66. Infekce kontrolním HSV preparátem exprimujícím kontrolní PlexinA1 nemění Nogo reakce. V souhrnu tato data ukazují, že Nogo receptor identifikovaný v tomto textu se účastní Nogo-66 inhibice axonové regenerace.

Příklad 12

Strukturní analýza Nogo-66 receptoru

Byla zkoumána struktura Nogo-66 receptoru, aby se určilo, které oblasti zprostředkovávají vazbu Nogo-66. Protein byl jednoduše rozdělen na oblasti repetice bohatých na leucin a oblasti repetice bez leucinu. Deleční analýza jasně ukazuje, že repetice bohaté na leucin jsou nutné pro Nogo-66 vazbu, ale zbytek proteinu není nutný (obrázek 11). V doméně repetice bohatých na leucin byly samostatně odstraněny dvě domény. Předpokládá se, že toto udrží celkovou strukturu domény repetice bohaté na leucin, a podobný přístup byl použit pro leutropinový receptor. Je zřejmé, že vazba Nogo-66 vyžaduje všech osm repetice bohatých na leucin, a svědčí pro to, že významný segment rovinného povrchu je vytvořen lineárními beta listy repetice bohatých na leucin. Konzervativní oblasti bohaté na cystein na každém konci repetice bohatých na leucin na aminokoncové části a karboxykoncové části jsou také nutné pro vazbu Nogo-66, pravděpodobně jsou nezbytné pro vznik vhodné konformace repetice bohatých na leucin.

Příklad 13

Blokáda Nogo rozpustným ektodoménovým proteinem Nogo receptoru

Jeden způsob blokády kaskády signální transdukce iniciovaný vazbou Nogo-66 na receptor Nogo je poskytnutí nadbytku rozpustné ektodomény receptoru. Secernovaný fragment proteinu Nogo receptoru byl produkován v buňkách HEK293T. cDNA kódující aminokyselinové zbytky 1 až 348 myšského Nogo receptoru byla ligována do eukaryotického expresního vektoru a DNA byla

transfekována do buněk HEK293T. Kondiciované médium z těchto buněk obsahuje vysoké hladiny tohoto fragmentu Nogo receptoru (NgR-ekto), jak bylo prokázáno imunoblotty s protilátkou anti-NgR. Kondiciované médium obsahuje přibližně 1 mg proteinu NgR-ekto na jeden litr. Ve vazebném testu AP-Nogo k buňkám COS-7 exprimujícím kompletní Nogo receptor nebo k neuronům ganglií dorzálních kořenů, přidání NgR-ekto kondiciovaného média redukuje vazbu 0,5 nM AP-Nogo-66 o 80 %. Tvorba komplexu mezi rozpustným NgR-ekto a Nogo-66 zabraňuje vazbě na buněčné povrchové receptory.

V některých receptorových systémech mohou takové komplexy rozpustného receptoru s ligandem blokovat signalizaci tvorbou neúčinné interakce. Například rozpustná ektodoména Trk slouží k blokádě signalizace neurotrofinu a byla pro tento účel rozsáhle používána (Shelton et al. (1995) J. Neurosci. 15, 477-491). Alternativně se může rozpustný komplex Nogo-66/NgR-ekto vázat a stimulovat předpokládanou druhou transmembránovou podjednotku Nogo receptoru. Existuje již precedent pro tento typ účinku ze studií receptorů GDNF rodiny (Cacalano et al. (1998) Neuron 21, 53-62). Komplex Nogo-66/NgR-ekto nezpůsobuje kolaps růstových vrcholů v těchto neuronech (kuřecí buňky retinálních ganglií E7), které postrádají Nogo-66 receptor, ale obsahují jiné složky signální dráhy Nogo. To ukazuje, že NgR-ekto působí jako blokátor Nogo-66 signalizace.

V přímých testech protein NgR-ekto chrání axony před inhibičními účinky Nogo-66. NgR-ekto zabraňuje kolapsu růstových vrcholů indukovanému Nogo-66 a blokuje inhibici růstu neuritů kuřecích neuronů E13 DRG indukovanou Nogo-66 (obrázek 12). Kromě toho přítomnost proteinu NgR-ekto blokuje schopnost CNS myelinu inhibovat extenzi axonu *in vitro*

(obrázek 12). Tato data ukazují, že protein NgR-ekto může podporovat regeneraci axonů *in vivo*.

Ačkoliv předkládaný vynález byl popsán podrobně s ohledem na výše uvedené příklady, je zřejmé, že mohou být provedeny různé modifikace vynálezu, aniž by došlo k odchýlení od vynálezecké myšlenky. Předkládaný vynález je tedy omezen pouze následujícími nároky.

Všechny citované patenty a publikace, na které se odkazuje v této přihlášce, jsou zde plně zahrnuty formou odkazu. Výsledky části experimentů popsaných zde byly publikovány (GrandPré et al., (2000) Nature 403, 439-444) po datu podání prozatímní přihlášky Spojených Států 60/175 707, jejíž prioritu si tato přihláška nárokuje, přičemž tato přihláška je plně zahrnuta v předkládaném textu.

12.07.02

PV 2002-243P

SEZNAM SEKVENCÍ

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1719

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (166)..(1584)

<223> Predikovaná humánní sekvence genu pro receptor Nogo

<400> 1

agcccagcca gagccgggcg gagcggagcg cgccgagcct cgtcccgcgg ccgggcccggg 60

gccgggcccgt agcggcgggcg cctggatgcg gacccggccg cggggagacg ggcgcccgc 120

ccgaaacgac ttccagtccc cgacgcgccc cgcccaaccc ctacg atg aag agg gcg 177

Met Lys Arg Ala

1

tcc gct gga ggg agc cgg ctg ctg gca tgg gtg ctg tgg ctg cag gcc 225

Ser Ala Gly Gly Ser Arg Leu Leu Ala Trp Val Leu Trp Leu Gln Ala

5

10

15

20

tgg cag gtg gca gcc cca tgc cca ggt gcc tgc gta tgc tac aat gag 273

Trp Gln Val Ala Ala Pro Cys Pro Gly Ala Cys Val Cys Tyr Asn Glu

25

30

35

ccc aag gtg acg aca agc tgc ccc cag cag ggc ctg cag gct gtg ccc 321

Pro Lys Val Thr Thr Ser Cys Pro Gln Gln Gly Leu Gln Ala Val Pro

40

45

50

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

12.07.02

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

12.07.02

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	ggc	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	ggc	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	ggg	gac	agc	ccg	ccg	ggc	aac	1281	
Asn	Ala	Leu	Lys	Gly	Arg	Val	Pro	Pro	Gly	Asp	Ser	Pro	Pro	Gly	Asn		
		360						365					370				
ggc	tct	ggc	cca	cgg	cac	atc	aat	gac	tca	ccc	ttt	ggg	act	ctg	cct	1329	
Gly	Ser	Gly	Pro	Arg	His	Ile	Asn	Asp	Ser	Pro	Phe	Gly	Thr	Leu	Pro		
		375					380				385						
ggc	tct	gct	gag	ccc	ccg	ctc	act	gca	gtg	cgg	ccc	gag	ggc	tcc	gag	1377	
Gly	Ser	Ala	Glu	Pro	Pro	Leu	Thr	Ala	Val	Arg	Pro	Glu	Gly	Ser	Glu		
	390					395					400						
cca	cca	ggg	ttc	ccc	acc	tgc	ggc	cct	cgc	cgg	agg	cca	ggc	tgt	tca	1425	
Pro	Pro	Gly	Phe	Pro	Thr	Ser	Gly	Pro	Arg	Arg	Arg	Pro	Gly	Cys	Ser		
405					410				415					420			
cgc	aag	aac	cgc	acc	cgc	agc	cac	tgc	cgt	ctg	ggc	cag	gca	ggc	agc	1473	
Arg	Lys	Asn	Arg	Thr	Arg	Ser	His	Cys	Arg	Leu	Gly	Gln	Ala	Gly	Ser		
			425					430				435					
ggg	ggt	ggc	ggg	act	ggt	gac	tca	gaa	ggc	tca	ggt	ggc	cta	ccc	agc	1521	
Gly	Gly	Gly	Gly	Thr	Gly	Asp	Ser	Glu	Gly	Ser	Gly	Ala	Leu	Pro	Ser		
		440					445				450						
ctc	acc	tgc	agc	ctc	acc	ccc	ctg	ggc	ctg	gcg	ctg	gtg	ctg	tgg	aca	1569	
Leu	Thr	Cys	Ser	Leu	Thr	Pro	Leu	Gly	Leu	Ala	Leu	Val	Leu	Trp	Thr		
		455				460					465						
gtg	ctt	ggg	ccc	tgc	tgacccccag	cggacacaag	agcgtgctca	gcagccaggt								1624	
Val	Leu	Gly	Pro	Cys													
	470																
gtgtgtacat	acgggggtctc	tctccacgcc	gccaagccag	ccgggcggcc	gacccgtggg											1684	
gcaggccagg	ccaggtcctc	cctgatggac	gcctg														1719

12.07.02

<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

```

12.07.02

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> Myši cDNA receptoru Nogo

<400> 3
 agccgcagcc cgcgagccca gcccggcccg gtagagcgga gcgccggagc ctcgtcccg 60
 ggccggggcc ggaccggggc ggagcagcgg cgcttgatg cggaccgggc cgcgcgaga 120

12.07.02

```

cgggcgcccg ccccgagcc gcttccagtg cccgacgcgc cccgctcgac cccgaag      177

atg aag agg gcg tcc tcc gga gga agc agg ctg ctg gca tgg gtg tta      225
Met Lys Arg Ala Ser Ser Gly Gly Ser Arg Leu Leu Ala Trp Val Leu
  1           5           10           15

tgg cta cag gcc tgg agg gta gca aca cca tgc cct ggt gct tgt gtg      273
Trp Leu Gln Ala Trp Arg Val Ala Thr Pro Cys Pro Gly Ala Cys Val
           20           25           30

tgc tac aat gag ccc aag gta aca aca agc tgc ccc cag cag ggt ctg      321
Cys Tyr Asn Glu Pro Lys Val Thr Thr Ser Cys Pro Gln Gln Gly Leu
           35           40           45

cag gct gtg ccc act ggc atc cca gcc tct agc cag cga atc ttc ctg      369
Gln Ala Val Pro Thr Gly Ile Pro Ala Ser Ser Gln Arg Ile Phe Leu
           50           55           60

cat ggc aac cga atc tct cac gtg cca gct gcg agc ttc cag tca tgc      417
His Gly Asn Arg Ile Ser His Val Pro Ala Ala Ser Phe Gln Ser Cys
           65           70           75           80

cga aat ctc act atc ctg tgg ctg cac tct aat gcg ctg gct cgg atc      465
Arg Asn Leu Thr Ile Leu Trp Leu His Ser Asn Ala Leu Ala Arg Ile
           85           90           95

gat gct gct gcc ttc act ggt ctg acc ctc ctg gag caa cta gat ctt      513
Asp Ala Ala Ala Phe Thr Gly Leu Thr Leu Leu Glu Gln Leu Asp Leu
           100           105           110

agt gat aat gca cag ctt cat gtc gtg gac cct acc acg ttc cac ggc      561
Ser Asp Asn Ala Gln Leu His Val Val Asp Pro Thr Thr Phe His Gly
           115           120           125

ctg ggc cac ctg cac aca ctg cac cta gac cga tgt ggc ctg cgg gag      609
Leu Gly His Leu His Thr Leu His Leu Asp Arg Cys Gly Leu Arg Glu
           130           135           140

ctg ggt ccc ggc cta ttc cgt gga cta gca gct ctg cag tac ctc tac      657
Leu Gly Pro Gly Leu Phe Arg Gly Leu Ala Ala Leu Gln Tyr Leu Tyr
           145           150           155           160

cta caa gac aac aat ctg cag gca ctc cct gac aac acc ttt cga gac      705
Leu Gln Asp Asn Asn Leu Gln Ala Leu Pro Asp Asn Thr Phe Arg Asp
           165           170           175

ctg ggc aac ctc acg cat ctc ttt ctg cat ggc aac cgt atc ccc agt      753
Leu Gly Asn Leu Thr His Leu Phe Leu His Gly Asn Arg Ile Pro Ser
           180           185           190

gtg cct gag cac gct ttc cgt ggc ctg cac agt ctt gac cgc ctc ctc      801
Val Pro Glu His Ala Phe Arg Gly Leu His Ser Leu Asp Arg Leu Leu
           195           200           205

ttg cac cag aac cat gtg gct cgt gtg cac cca cat gcc ttc cgg gac      849
Leu His Gln Asn His Val Ala Arg Val His Pro His Ala Phe Arg Asp

```

12.07.02

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			

12.07.02

435 440 445
 gct ctg cct gct ctg gcc tgc agc ctt gct cct ctg ggc ctt gca ctg 1569
 Ala Leu Pro Ala Leu Ala Cys Ser Leu Ala Pro Leu Gly Leu Ala Leu
 450 455 460

 gta ctt tgg aca gtg ctt ggg ccc tgc tgaccagcca ccagccacca 1616
 Val Leu Trp Thr Val Leu Gly Pro Cys
 465 470

 ggtgtgtgta catatgggggt ctcctccac gccgccagcc agagccaggg acaggctctg 1676
 aggggcaggc caggccctcc ctgacagatg cctccccacc agcccacccc catctccacc 1736
 ccatcatgtt tacagggttc cgggggtggc ggttggttca caacccaac ttccaccgg 1796
 atcgcgcat 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 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

12.07.02

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

12.07.02

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> Humání mRNA proteinu Nogo (KIAA0886, GenBank č. AB020693)

<400> 5
caccacagta ggtccctcgg ctcatgctggc ccagcccctc tcagtcctcc ccaacccccca 60

caaccgcccg cggctctgag acgcggcccc ggcgggcgcg gcagcagctg cagcatcatc 120

tccaccctcc agcc atg gaa gac ctg gac cag tct cct ctg gtc tgc tcc 170
Met Glu Asp Leu Asp Gln Ser Pro Leu Val Ser Ser
1 5 10

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

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

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

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

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

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

gac ccg agc ccg gtg tgc tgc 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 tgc ccc tcc aag ctg cct gag gag gac gag gac cct ccg 554
Ala Ala Ala Val Ser Pro Ser Lys Leu Pro Glu Asp Asp Glu Pro Pro
125 130 135 140

12.07.00

```

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 gct gca tct gag cct gtg ata cgc tcc tct gca 746
Leu Phe Ala Leu Pro Ala Ala Ser Glu Pro Val Ile Arg Ser Ser Ala
190 195 200

gaa aat atg gac ttg aag gag cag cca ggt aac act att tcg gct ggt 794
Glu Asn Met Asp Leu Lys Glu Gln Pro Gly Asn Thr Ile Ser Ala Gly
205 210 215 220

caa gag gat ttc cca tct gtc ctg ctt gaa act gct gct tct ctt cct 842
Gln Glu Asp Phe Pro Ser Val Leu Leu Glu Thr Ala Ala Ser Leu Pro
225 230 235

tct ctg tct cct ctc tca gcc gct tct ttc aaa gaa cat gaa tac ctt 890
Ser Leu Ser Pro Leu Ser Ala Ala Ser Phe Lys Glu His Glu Tyr Leu
240 245 250

ggt aat ttg tca aca gta tta ccc act gaa gga aca ctt caa gaa aat 938
Gly Asn Leu Ser Thr Val Leu Pro Thr Glu Gly Thr Leu Gln Glu Asn
255 260 265

gtc agt gaa gct tct aaa gag gtc tca gag aag gca aaa act cta ctc 986
Val Ser Glu Ala Ser Lys Glu Val Ser Glu Lys Ala Lys Thr Leu Leu
270 275 280

ata gat aga gat tta aca gag ttt tca gaa tta gaa tac tca gaa atg 1034
Ile Asp Arg Asp Leu Thr Glu Phe Ser Glu Leu Glu Tyr Ser Glu Met
285 290 295 300

gga tca tcg ttc agt gtc tct cca aaa gca gaa tct gcc gta ata gta 1082
Gly Ser Ser Phe Ser Val Ser Pro Lys Ala Glu Ser Ala Val Ile Val
305 310 315

gca aat cct agg gaa gaa ata atc gtg aaa aat aaa gat gaa gaa gag 1130
Ala Asn Pro Arg Glu Glu Ile Ile Val Lys Asn Lys Asp Glu Glu Glu
320 325 330

aag tta gtt agt aat aac atc ctt cat aat caa caa gag tta cct aca 1178
Lys Leu Val Ser Asn Asn Ile Leu His Asn Gln Gln Glu Leu Pro Thr
335 340 345

gct ctt act aaa ttg gtt aaa gag gat gaa gtt gtg tct tca gaa aaa 1226
Ala Leu Thr Lys Leu Val Lys Glu Asp Glu Val Val Ser Ser Glu Lys
350 355 360

```

12.07.02

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	

12.07.02

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	

12.07.02

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	

12:07:02

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

caaaataatt agtaggagtt catctttaaa ggggatattc atttgattat acgggggagg 3780

gtcaggggaag aacgaacctt gacgttgacag tgcagtttca cagatcgttg ttagatcttt 3840

attttttagcc atgcactggt gtgaggaaaa attacctgtc ttgactgccca tgtgttcac 3900

atcttaagta ttgtaagctg ctatgtatgg atttaaaccg taatcatatc tttttcctat 3960

ctgaggcact ggtggaataa aaaacctgta tattttactt tgttgacagat agtcttgccg 4020

catcttgcca agttgcagag atggtggagc tag 4053

```

<210> 6

<211> 1192

<212> PRT

12.07.02

<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 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

12.07.02

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

12.07.02

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> Umělá sekvence

<220>
 <223> Popis umělé sekvence: cDNA kódující inhibitor **Pep1** vazby na receptor

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

<210> 8
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Umělá sekvence

<220>
 <223> Popis umělé sekvence: **Pep1**-Nogo protein inhibitor

<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> Umělá sekvence

<220>
 <223> Popis umělé sekvence: cDNA kódující inhibitor **Pep2** vazby na receptor

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

<210> 10
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Umělá sekvence
 <220>

12.07.00

<223> Popis umělé sekvence: **Pep2**-Nogo protein inhibitor

<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> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: cDNA kódující inhibitor **Pep3** vazby na receptor

<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> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: **Pep3**-Nogo protein inhibitor

<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

12.07.00

<212> DNA

213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: cDNA kódující inhibitor **Pep4** vazby na receptor

<400> 13

```
tctgaggagt tggttcagaa gtacagtaat tctgctcttg gtcattgtgaa ctgcacgata 60
aaggaactca ggcgc                                     75
```

<210> 14

<211> 25

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: **Pep4**-Nogo protein inhibitor

<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> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: cDNA kódující inhibitor **Pep5** vazby na receptor

<400> 15

```
gctcttggtc atgtgaactg cagcataaag gaactcaggc gcctcttctt agttgatgat 60
ttagttgatt ctctg                                     75
```

<210> 16

<211> 25

<212> PRT

<213> Umělá sekvence

<220>

<223> Popis umělé sekvence: **Pep5**-Nogo protein inhibitor

<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> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: cDNA kódující inhibitor **Pep2-41** vazby
na receptor

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

<210> 18
<211> 40
<212> PRT
<213> Umělá sekvence

<220>
<223> Popis umělé sekvence: **Pep2-41**-Nogo protein inhibitor

<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> Úplná sekvence receptorového vazebného úseku genu Nogo

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

12.07.02

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

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Nukleová kyselina obsahující nukleotidovou sekvenci kódující polypeptid, který obsahuje aminokyselinové zbytky kódující na leucin bohatý opakovaný úsek aminokoncového konzervativní úseku bohatého na cystein (LRRNT), na leucin bohaté opakované úseky, a na leucin bohatý opakovaný úsek karboxykoncového konzervativního úseku bohatého na cystein (LRRCT) SEKVENCE ID. Č. 2 nebo SEKVENCE ID. Č. 4, přičemž polypeptid postrádá jedinečnou doménu 3' od LRRCT úseku a 5' od GPI domény SEKVENCE ID. Č. 2 nebo SEKVENCE ID. Č. 4.
2. Nukleová kyselina podle nároku 1, kde kódovaný polypeptid obsahuje 1 až 20 konzervativních aminokyselinových substitucí.
3. Nukleová kyselina podle nároku 1, kde kódovaný polypeptid obsahuje 1 až 20 substitucí přirozeně se vyskytujícími aminokyselinami.
4. Nukleová kyselina obsahující nukleotidovou sekvenci kódující polypeptid, který obsahuje aminokyselinové zbytky s alespoň 95% aminokyselinovou sekvenční identitou s polypeptidem kódovaným sekvencí podle nároku 1.
5. Nukleová kyselina obsahující nukleotidovou sekvenci kódující polypeptid, který obsahuje aminokyselinové zbytky SEKVENCE ID. Č. 2 nebo SEKVENCE ID. Č. 4 postrádající signální peptid ze SEKVENCE ID. Č. 2 nebo SEKVENCE ID. Č. 4, přičemž polypeptid postrádá jedinečnou doménu 3' od aminokyseliny 348 a 5' od GPI domény ze SEKVENCE ID. Č. 2

nebo SEKVENCE ID. Č. 4.

6. Nukleová kyselina podle nároku 5, kde kódovaný polypeptid obsahuje 1 až 20 konzervativních aminokyselinových substitucí.
7. Nukleová kyselina podle nároku 5, kde kódovaný polypeptid obsahuje 1 až 20 substitucí přirozeně se vyskytujícími aminokyselinami.
8. Nukleová kyselina obsahující nukleotidovou sekvenci kódující polypeptid, který obsahuje aminokyselinové zbytky s alespoň 95% aminokyselinovou sekvenční identitou s polypeptidem kódovaným sekvencí podle nároku 5.
9. Nukleová kyselina obsahující nukleotidovou sekvenci kódující polypeptid, který obsahuje aminokyselinové zbytky 1 až 348 ze SEKVENCE ID. Č. 2 nebo SEKVENCE ID. Č. 4, přičemž polypeptid postrádá jedinečnou doménu 3' od aminokyseliny 348 a 5'od GPI domény ze SEKVENCE ID. Č. 2 nebo SEKVENCE ID. Č. 4.
10. Nukleová kyselina podle nároku 9, kde kódovaný polypeptid obsahuje 1 až 20 konzervativních aminokyselinových substitucí.
11. Nukleová kyselina podle nároku 9, kde kódovaný polypeptid obsahuje 1 až 20 substitucí přirozeně se vyskytujícími aminokyselinami.
12. Nukleová kyselina obsahující nukleotidovou sekvenci kódující polypeptid, který obsahuje aminokyselinové zbytky

- s alespoň 95% aminokyselinovou sekvenční identitou s polypeptidem kódovaným sekvencí podle nároku 9.
13. Nukleová kyselina podle nároku 9, kde kódovaný polypeptid obsahuje aminokyselinové zbytky 1 až 348 ze SEKVENCE ID. Č. 2.
 14. Nukleová kyselina podle nároku 9, kde kódovaný polypeptid obsahuje aminokyselinové zbytky 1 až 348 ze SEKVENCE ID. Č. 4.
 15. Nukleová kyselina obsahující nukleotidovou sekvenci kódující polypeptid, který obsahuje aminokyselinové zbytky kódující úsek LRRNT, na leucin bohaté opakované úseky a úsek LRRCT ze SEKVENCE ID. Č. 2 nebo SEKVENCE ID. Č. 4.
 16. Nukleová kyselina podle nároku 15, kde kódovaný polypeptid obsahuje 1 až 20 konzervativních aminokyselinových substitucí.
 17. Nukleová kyselina podle nároku 15, kde kódovaný polypeptid obsahuje 1 až 20 substitucí přirozeně se vyskytujícími aminokyselinami.
 18. Nukleová kyselina obsahující nukleotidovou sekvenci kódující polypeptid, který obsahuje aminokyselinové zbytky s alespoň 95% aminokyselinovou sekvenční identitou s polypeptidem kódovaným sekvencí podle nároku 15.
 19. Nukleová kyselina podle kteréhokoliv z nároků 1 až 18, kde nukleová kyselina je operativně spojena s jedním nebo více expresními kontrolními prvky.

20. Vektor obsahující nukleovou kyselinu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 19.
21. Buňka obsahující nukleovou kyselinu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 19.
22. Buňka obsahující vektor podle nároku 20.
23. Způsob přípravy polypeptidu vyznačující se tím, že zahrnuje krok, kdy se kultivuje buňka obsahující nukleovou kyselinu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 19 v podmínkách, kde je exprimován protein kódovaný nukleovou kyselinou.
24. Polypeptid připravený způsobem podle nároku 23.
25. Polypeptid obsahující aminokyselinové zbytky kódující úsek LRRNT, na leucin bohaté opakované úseky a úsek LRRCT ze SEKVENCE ID. Č. 2 nebo SEKVENCE ID. Č. 4., přičemž polypeptid postrádá jedinečnou doménu 3' od aminokyseliny 348 a 5' od GPI domény ze SEKVENCE ID. Č. 2 nebo SEKVENCE ID. Č. 4.
26. Polypeptid podle nároku 25, který obsahuje 1 až 20 konzervativních aminokyselinových substitucí.
27. Polypeptid podle nároku 25, který obsahuje 1 až 20 substitucí přirozeně se vyskytujícími aminokyselinami.
28. Polypeptid podle nároku 25, který obsahuje aminokyselinové zbytky s alespoň 95% aminokyselinovou sekvenční identitou s polypeptidem kódovaným sekvencí podle nároku 25.

29. Polypeptid obsahující aminokyselinové zbytky SEKvence ID. Č. 2 nebo SEKvence ID. Č. 4 postrádající signální peptid ze SEKvence ID. Č. 2 nebo SEKvence ID. Č. 4, přičemž polypeptid postrádá jedinečnou doménu 3' od aminokyseliny 348 a 5'od GPI domény ze SEKvence ID. Č. 2 nebo SEKvence ID. Č. 4.
30. Polypeptid podle nároku 29, který obsahuje 1 až 20 konzervativních aminokyselinových substitucí.
31. Polypeptid podle nároku 29, který obsahuje 1 až 20 substitucí přirozeně se vyskytujícími aminokyselinami.
32. Polypeptid obsahující nukleotidovou sekvenci kódující polypeptid, který obsahuje aminokyselinové zbytky s alespoň 95% aminokyselinovou sekvenční identitou s polypeptidem podle nároku 29.
33. Polypeptid obsahující aminokyselinové zbytky 1 až 348 ze SEKvence ID. Č. 2 nebo SEKvence ID. Č. 4, přičemž polypeptid postrádá jedinečnou doménu 3' od aminokyseliny 348 a 5'od GPI domény ze SEKvence ID. Č. 2 nebo SEKvence ID. Č. 4.
34. Polypeptid podle nároku 33, který obsahuje 1 až 20 konzervativních aminokyselinových substitucí.
35. Polypeptid podle nároku 33, který obsahuje 1 až 20 substitucí přirozeně se vyskytujícími aminokyselinami.
36. Polypeptid obsahující aminokyselinové zbytky s alespoň 95% aminokyselinovou sekvenční identitou s polypeptidem podle

nároku 33.

37. Polypeptid podle nároku 33, který obsahuje aminokyselinové zbytky 1 až 348 ze SEKVENCE ID. Č. 2.
38. Polypeptid podle nároku 33, který obsahuje aminokyselinové zbytky 1 až 348 ze SEKVENCE ID. Č. 4.
39. Polypeptid obsahující úsek LRRNT, na leucin bohaté opakované úseky a úsek LRRCT ze SEKVENCE ID. Č. 2 nebo SEKVENCE ID. Č. 4.
40. Polypeptid podle nároku 39, který obsahuje 1 až 20 konzervativních aminokyselinových substitucí.
41. Polypeptid podle nároku 39, který obsahuje 1 až 20 substitucí přirozeně se vyskytujícími aminokyselinami.
42. Polypeptid obsahující aminokyselinové zbytky s alespoň 95% aminokyselinovou sekvenční identitou s polypeptidem kódovaným sekvencí podle nároku 39.
43. Chimérický polypeptid obsahující polypeptid podle kteréhokoliv z nároků 24 až 42.
44. Farmaceutický přípravek vyznačující se tím, že obsahuje polypeptid podle kteréhokoliv z nároků 24 až 42.
45. Protilátka, která se váže na polypeptid podle kteréhokoliv z nároků 24 až 42.
46. Transgenní živočich, s výjimkou člověka, který obsahuje

nukleovou kyselinu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 19.

47. nukleová kyselina obsahující nukleotidovou sekvenci kódující polypeptid, který obsahuje aminokyselinové zbytky sekvencí uvedených v seznamu sekvencí jako SEQUENCE ID. Č. 8, 10, 12, 14, 16, 18 nebo 20.
48. Nukleová kyselina podle nároku 47, kde kódovaný polypeptid obsahuje 1 až 20 konzervativních aminokyselinových substitucí.
49. Nukleová kyselina podle nároku 47, kde kódovaný polypeptid obsahuje 1 až 20 substitucí přirozeně se vyskytujícími aminokyselinami.
50. Nukleová kyselina obsahující nukleotidovou sekvenci kódující polypeptid, který obsahuje aminokyselinové zbytky s alespoň 95% aminokyselinovou sekvenční identitou s polypeptidem kódovaným sekvencí podle nároku 47, přičemž kódovaný polypeptid moduluje Nogo-zprostředkovanou inhibici růstu axonu.
51. Nukleová kyselina podle nároku 47, 48, 49 nebo 50, která je operativně spojena s jedním nebo více expresními kontrolními prvky.
52. Vektor obsahující nukleovou kyselinu podle kteréhokoliv z nároků 47 až 51.
53. Buňka obsahující nukleovou kyselinu podle kteréhokoliv z nároků 47 až 51.

54. Buňka obsahující vektor podle nároku 52.
55. Způsob přípravy polypeptidu vyznačující se tím, že obsahuje krok, kdy se kultivují buňky obsahující nukleovou kyselinu podle kteréhokoliv z nároků 47 až 51 v podmínkách, kdy je exprimován protein kódovaný nukleovou kyselinou.
56. Polypeptid připravený způsobem podle nároku 55.
57. Polypeptid obsahující aminokyselinové zbytky sekvencí uvedených v seznamu sekvencí jako SEQUENCE ID. Č. 8, 10, 12, 14, 16, 18 nebo 20.
58. Polypeptid podle nároku 57, který obsahuje 1 až 20 konzervativních aminokyselinových substitucí.
59. Polypeptid podle nároku 57, který obsahuje 1 až 20 substitucí přirozeně se vyskytujícími aminokyselinami.
60. Polypeptid obsahující aminokyselinové zbytky s alespoň 95% aminokyselinovou sekvencí identitou s polypeptidem kódovaným sekvencí podle nároku 57, přičemž kódovaný polypeptid moduluje Nogo-zprostředkovanou inhibici růstu axonu.
61. Chimérický polypeptid obsahující polypeptid podle kteréhokoliv z nároků 56 až 60.
62. Farmaceutický přípravek vyznačující se tím, že obsahuje polypeptid podle kteréhokoliv z nároků 56 až 60.

63. Protilátka, která se váže na polypeptid podle kteréhokoliv z nároků 56 až 60.
64. Transgenní živočich, s výjimkou člověka, který obsahuje nukleovou kyselinu podle kteréhokoliv z nároků 47 až 51.
65. Způsob identifikace agens, které moduluje expresi Nogo nebo receptoru Nogo vyznačující se tím, že zahrnuje kroky, kdy:
- a) připraví se buňky exprimující Nogo nebo receptor Nogo,
 - b) buňky se přivedou do kontaktu s kandidátním agens, a
 - c) detekuje se zvýšení nebo snížení hladiny exprese Nogo nebo receptoru Nogo v přítomnosti kandidátního agens ve srovnání s hladinou exprese Nogo nebo receptoru Nogo v nepřítomnosti kandidátního agens.
66. Způsob identifikace agens, které moduluje Nogo-zprostředkovanou inhibici růstu axonu vyznačující se tím, že zahrnuje kroky, kdy:
- a) připraví se buňky obsahující protein Nogo nebo receptor proteinu Nogo,
 - b) buňky se přivedou do kontaktu s kandidátním agens, a
 - c) detekuje se zvýšení nebo snížení hladiny Nogo-zprostředkované inhibice růstu axonu v přítomnosti kandidátního agens ve srovnání s hladinou inhibice růstu axonu v nepřítomnosti kandidátního agens.
67. Způsob modulace Nogo-zprostředkované inhibice růstu axonu vyznačující se tím, že zahrnuje krok, kdy se neuron přivede do kontaktu s účinným množstvím polypeptidu podle kteréhokoliv z nároků 24 až 43.

68. Způsob modulace Nogo-zprostředkované inhibice růstu axonu vyznačující se tím, že zahrnuje krok, kdy se neuron přivede do kontaktu s účinným množstvím:
a) protilátky, která se váže na polypeptid obsahující sekvenci uvedenou zde jako SEKVENCE ID. Č. 2 nebo SEKVENCE ID. Č. 4, b) protilátky podle nároku 45.
69. Způsob identifikace vazebného partnera pro receptor Nogo proteinu vyznačující se tím, že zahrnuje kroky, kdy:
a) připraví se receptor Nogo proteinu ,
b) receptor Nogo proteinu se přivedou do kontaktu s kandidátním vazebným partnerem, a
c) detekuje se vazba kandidátního vazebného partnera na receptor Nogo proteinu, přičemž vazebný partner moduluje Nogo-zprostředkovanou inhibici růstu axonu, když se naváže na receptor Nogo.
70. Způsob inhibice vazby polypeptidu Nogo na receptor Nogo vyznačující se tím, že zahrnuje krok, kdy se receptor Nogo přivede do kontaktu s účinným množstvím polypeptidu podle kteréhokoliv z nároků 24 až 43.
71. Způsob podle nároku 70 vyznačující se tím, že polypeptid je rozpustný receptor Nogo.
72. Způsob inhibice vazby polypeptidu Nogo na receptor Nogo vyznačující se tím, že zahrnuje krok, kdy se receptor Nogo přivede do kontaktu s účinným množstvím
a) protilátky, která se váže na polypeptid obsahující aminokyselinové zbytky sekvence uvedené jako SEKVENCE ID. Č. 2 nebo SEKVENCE ID. Č. 4, nebo b) protilátky podle

nároku 45.

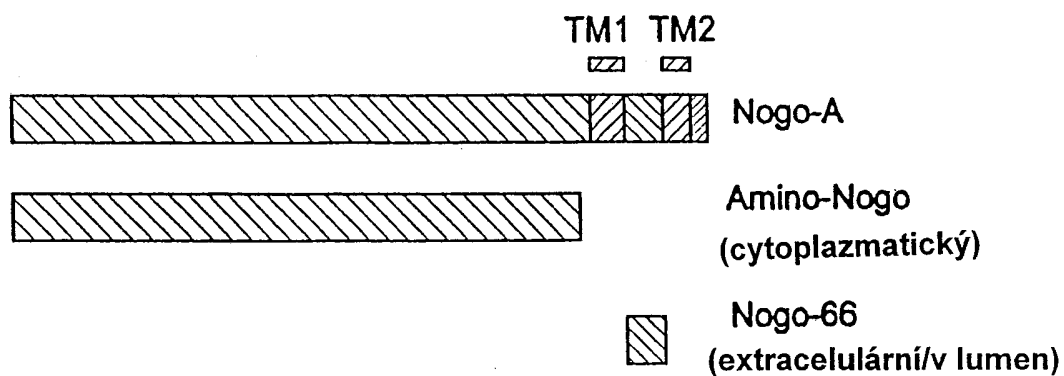
73. Způsob inhibice vazby polypeptidu Nogo na receptor Nogo vyznačující se tím, že zahrnuje krok, kdy se receptor Nogo přivede do kontaktu s účinným množstvím polypeptidu, který obsahuje aminokyselinové zbytky sekvence uvedené zde jako SEKVENCE ID. Č. 8, 10, 12 nebo 18.
74. Způsob léčení nemocí centrálního nervového systému savců vyznačující se tím, že se podává účinné množství agens, které moduluje Nogo-zprostředkovanou inhibici růstu axonu.

12.07.02

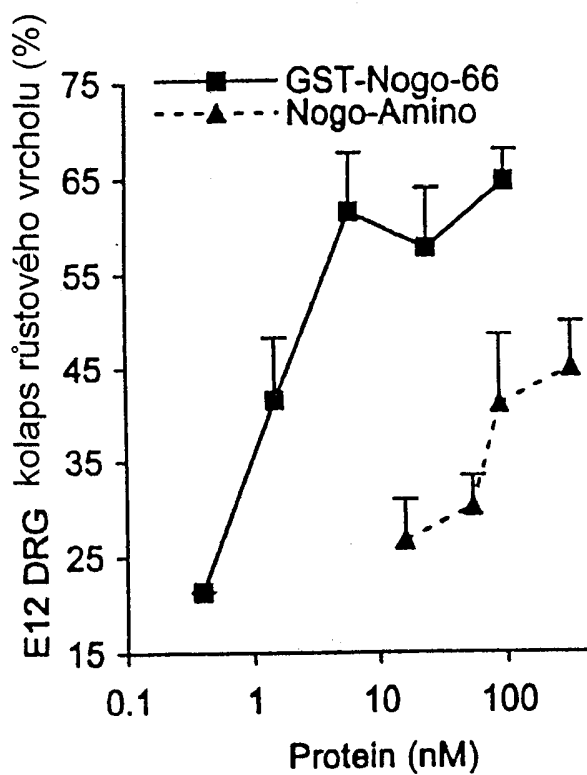
PV 2002 - 243p

1/19

Obr. 1a



Obr. 1g

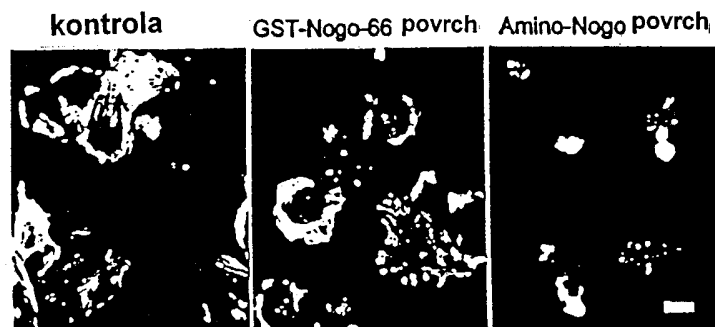


12.07.02

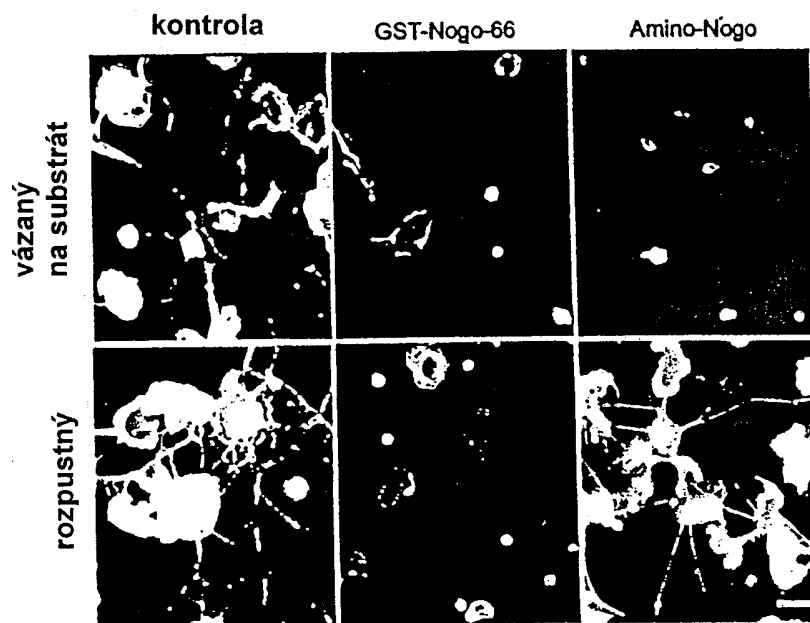
PV 2002 - 243p

2/19

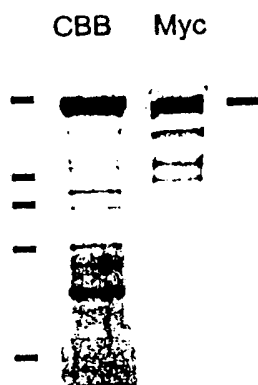
Obr. 1b



Obr. 1c



Obr. 1d

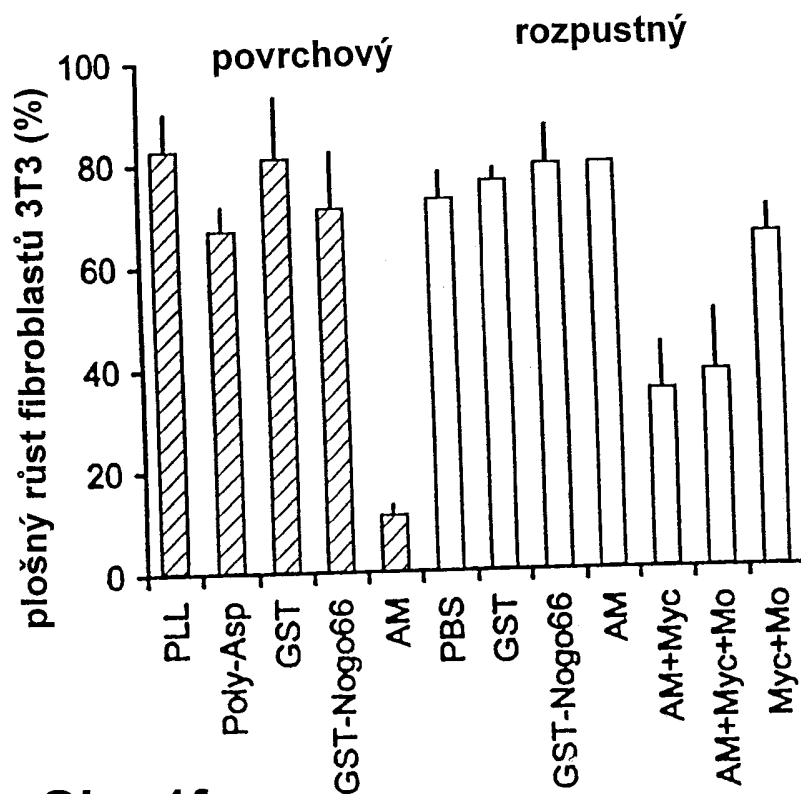


12.07.02

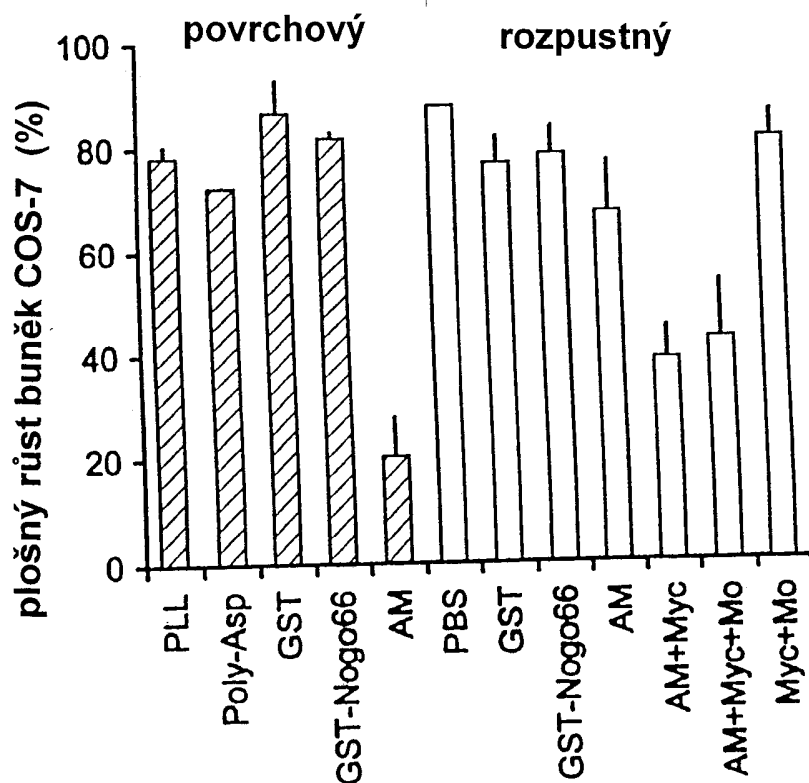
PV 2002 - 2438

3/19

Obr. 1e

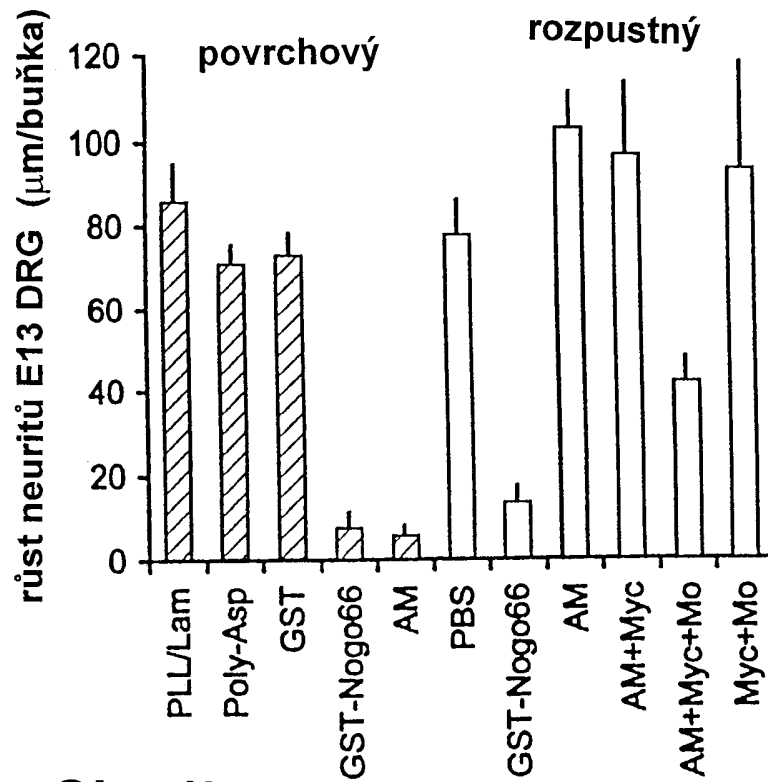


Obr. 1f

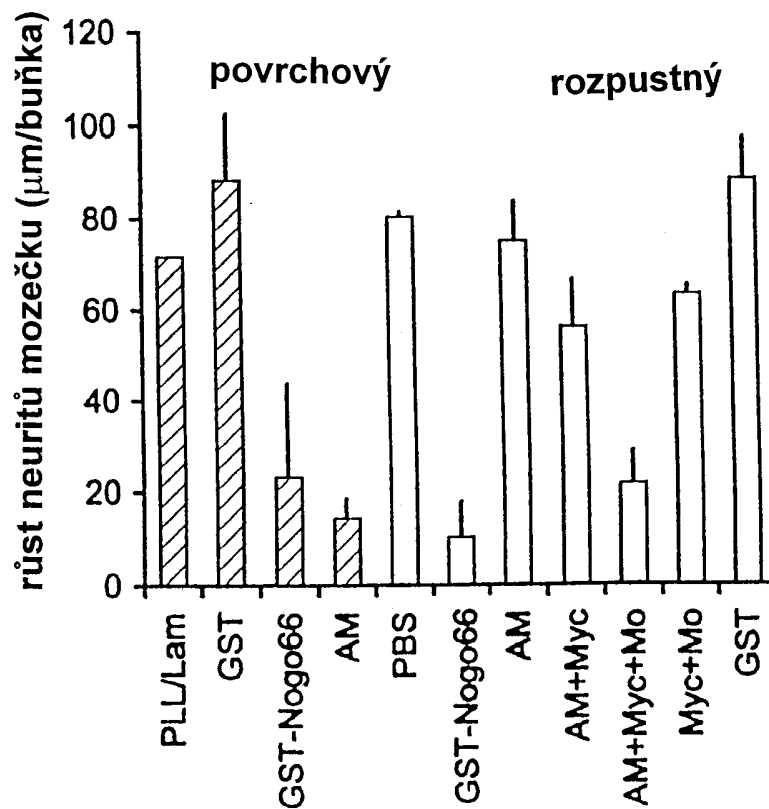


4/19

Obr. 1h



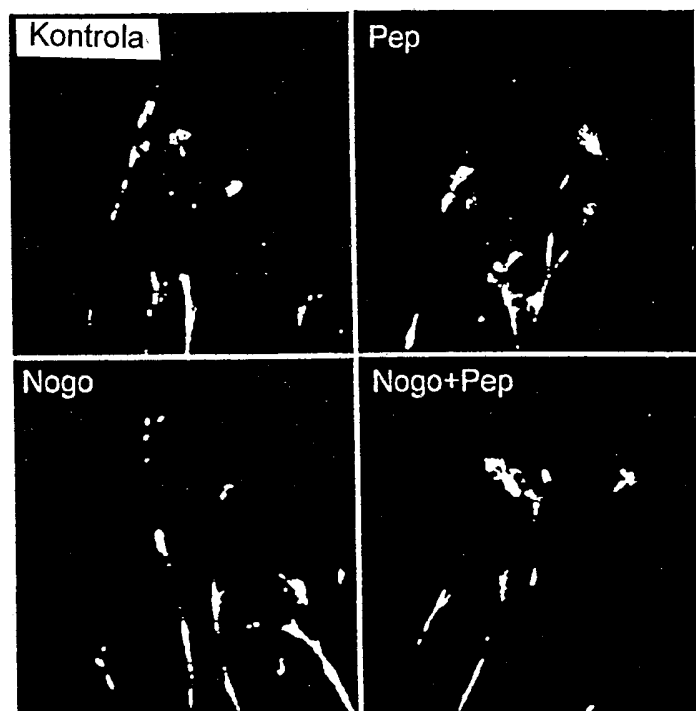
Obr. 1i



12.07.02
PV 2002 - 2438

5/19

Obr. 2A

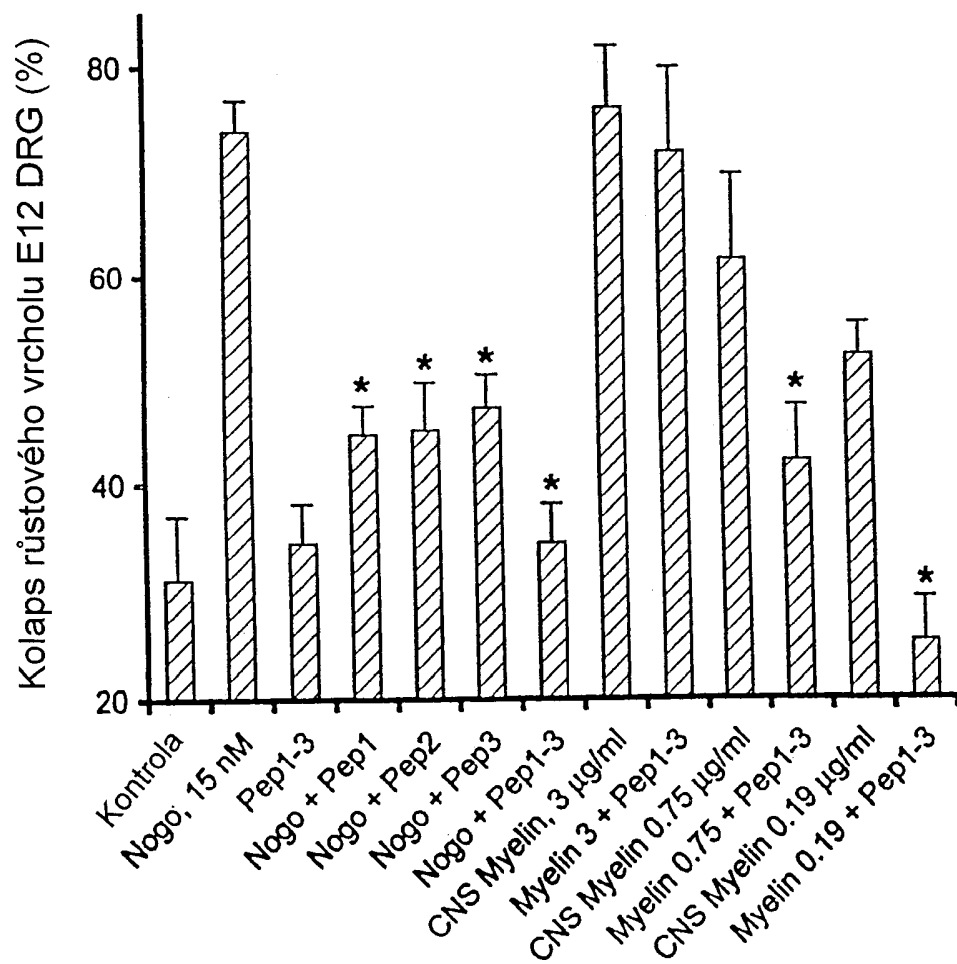


12.07.02

IV 2002 - 2438

6/19

Obr. 2B

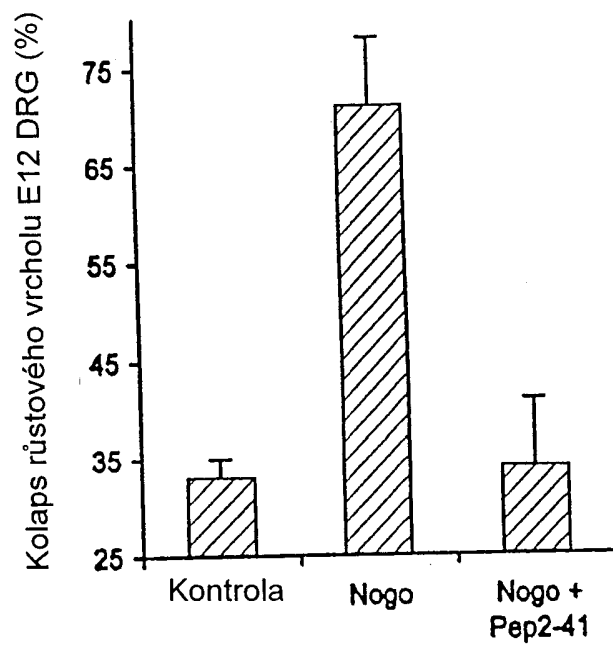


12.07.02

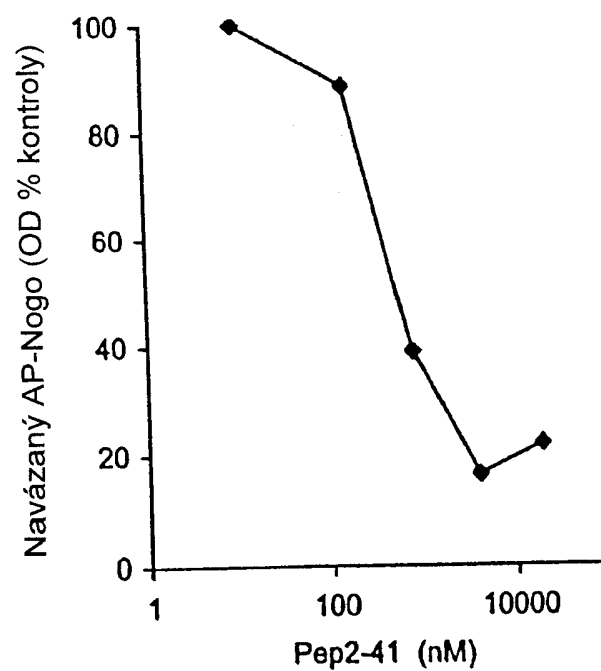
PV 2002-2438

7/19

Obr. 3A



Obr. 3B

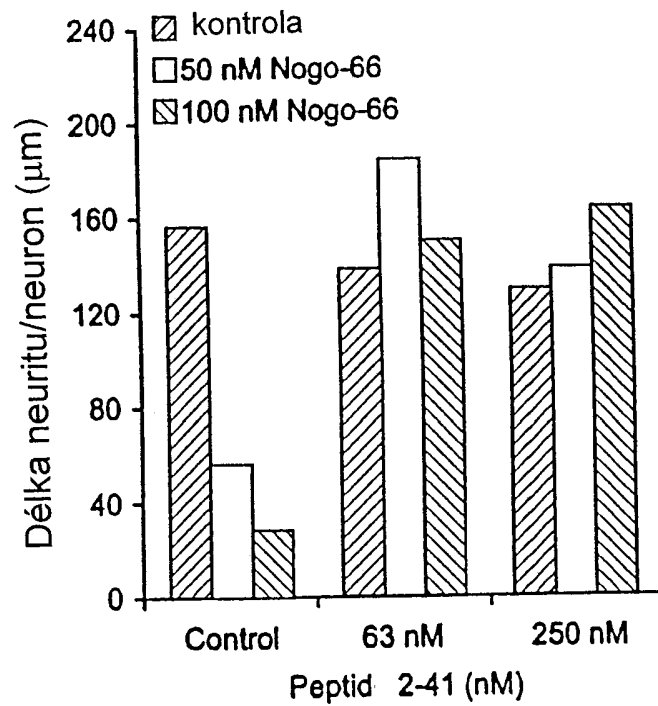


12.07.03

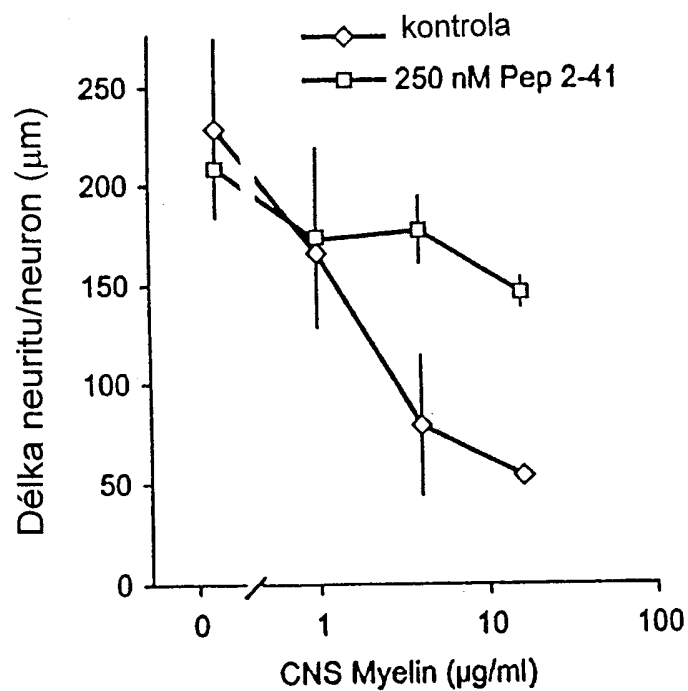
PV 2002-2438

8/19

Obr. 4A



Obr. 4B



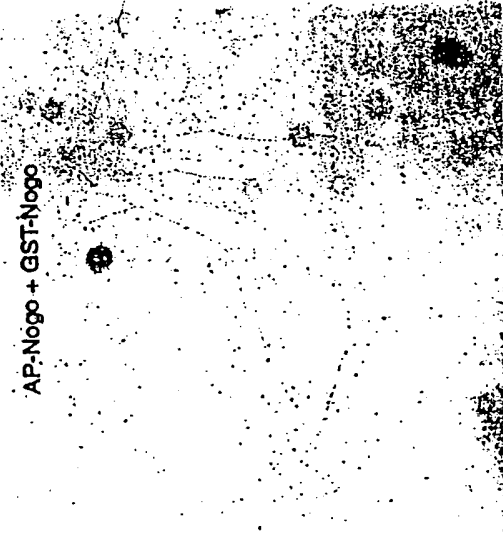
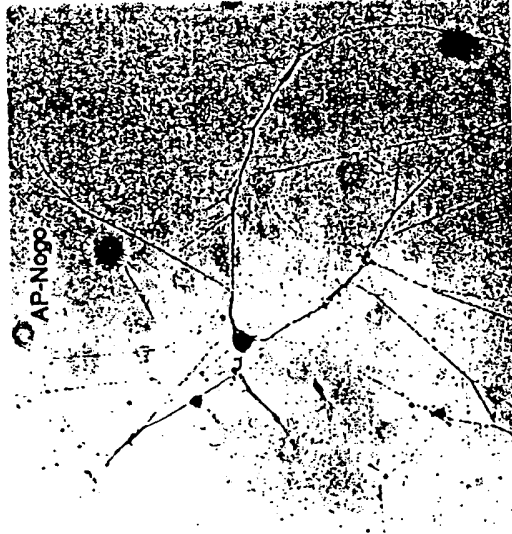
12.07.02

PV 2002 - 2438

9/19

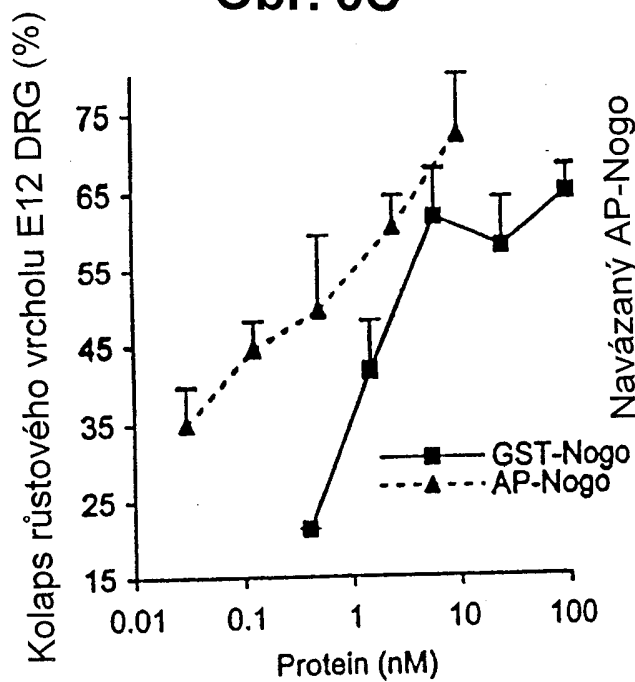
Obr. 5A Obr. 5B

CBB Anti-Nogo

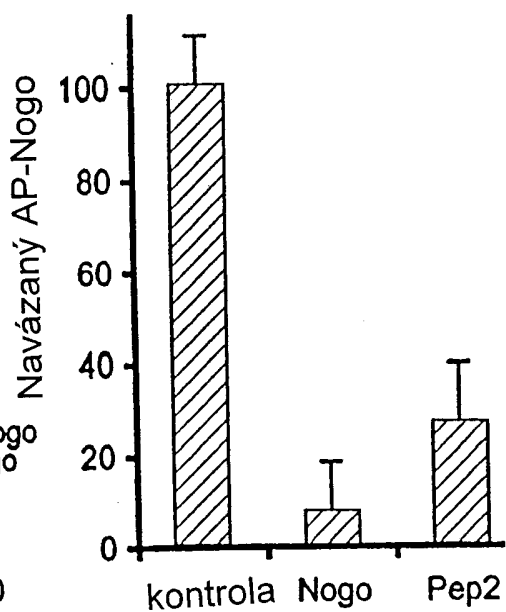


10/19

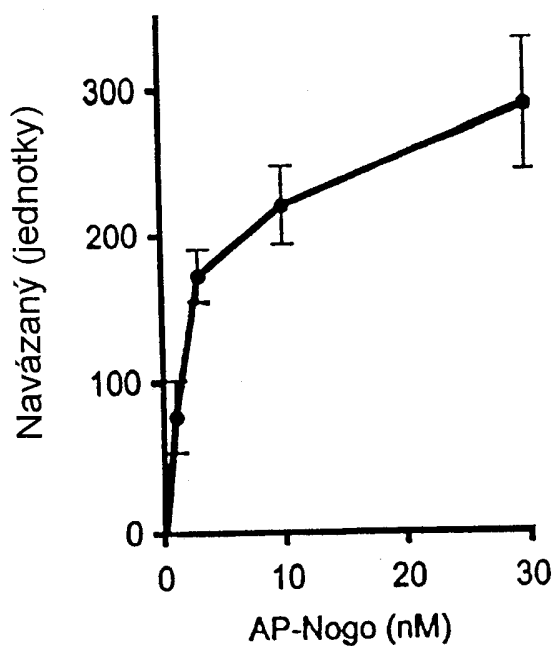
Obr. 5C



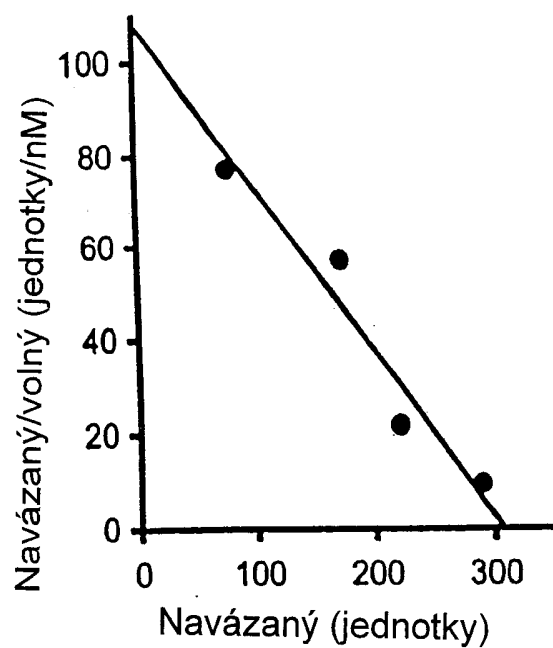
Obr. 5D



Obr. 5E



Obr. 5F

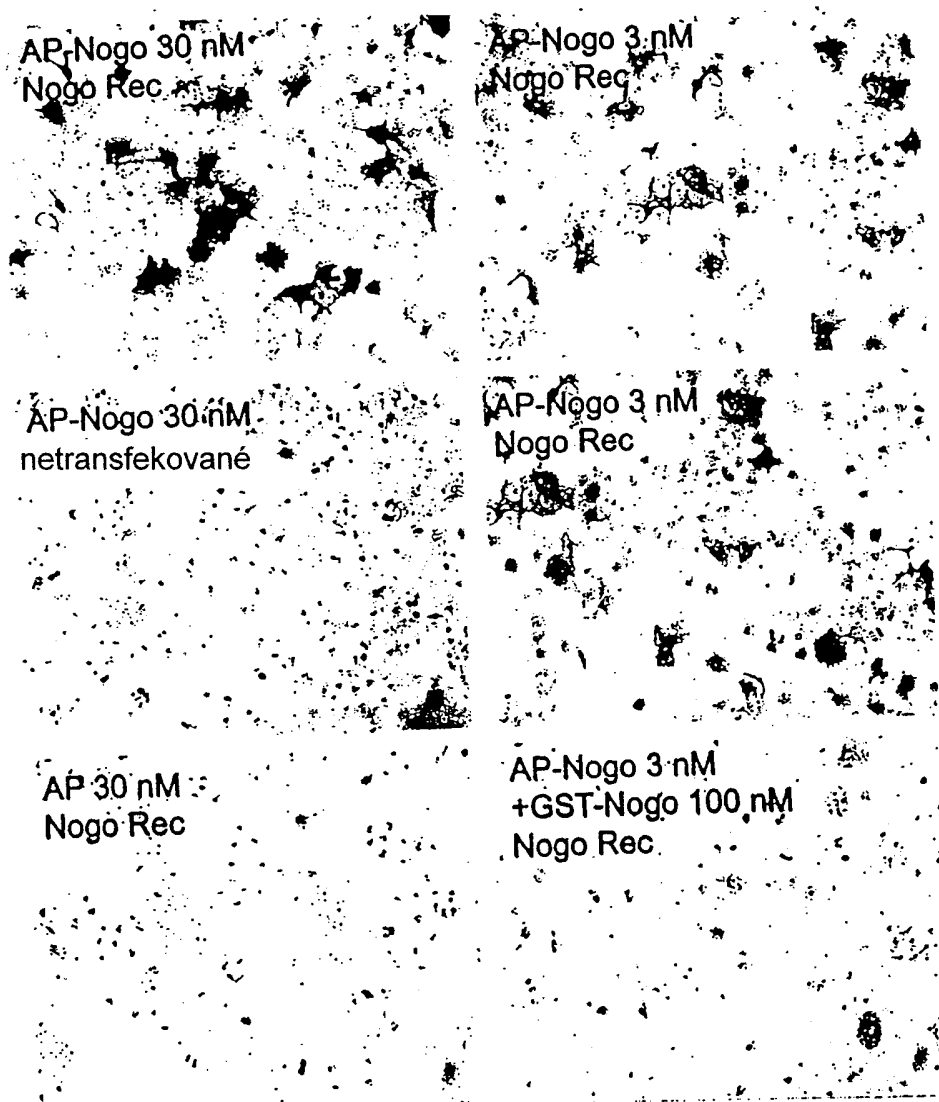


12.07.02

PV 2002 - 2438

11/19

Obr. 6

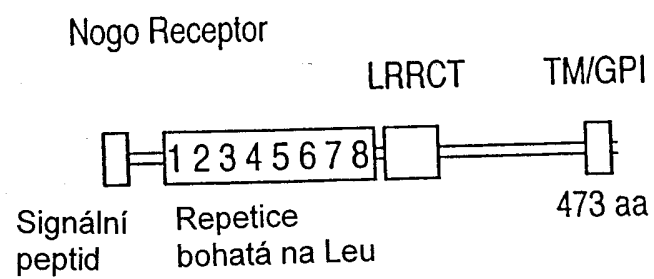


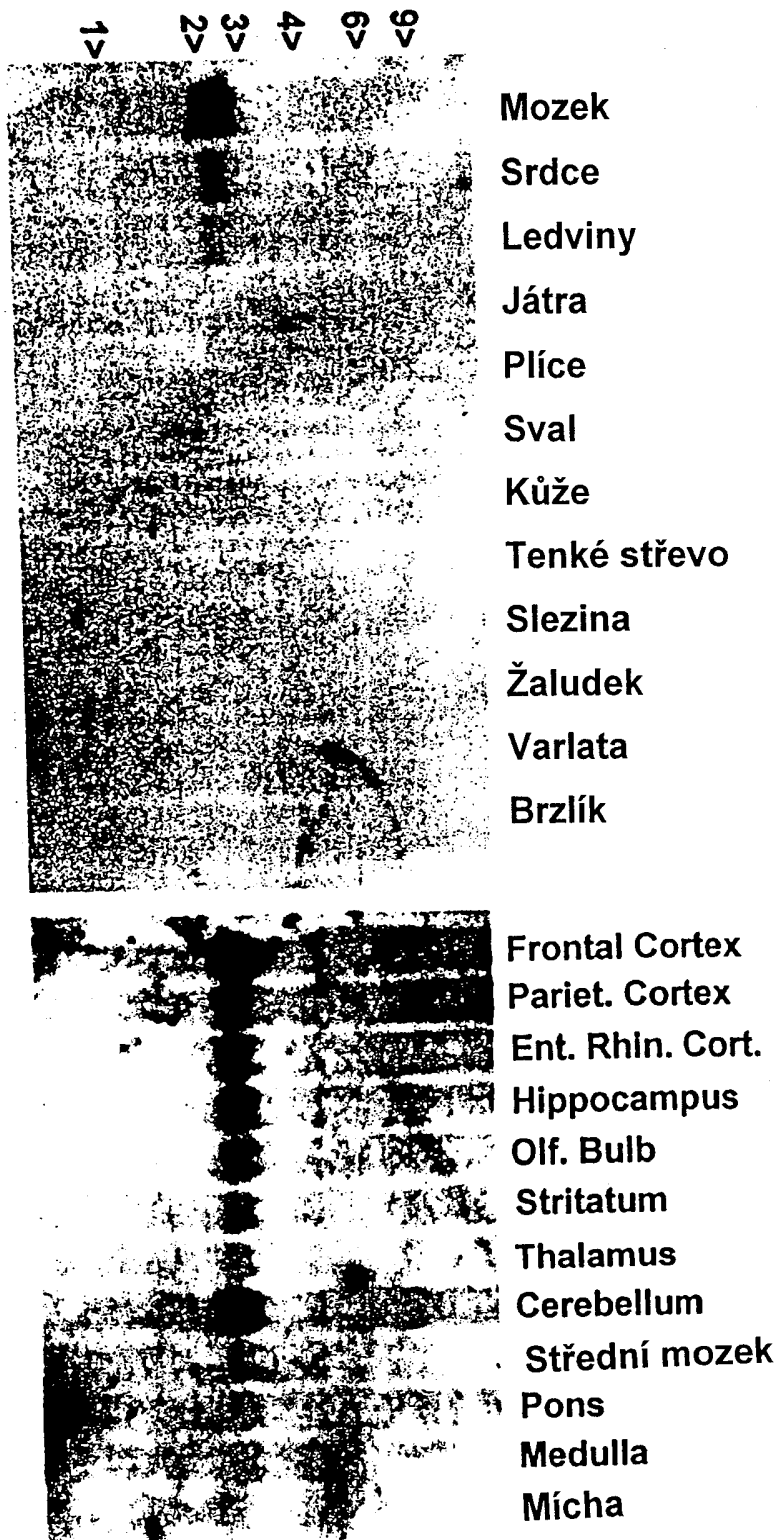
12.07.02

PV 2002 - 2438

12/19

Obr. 7





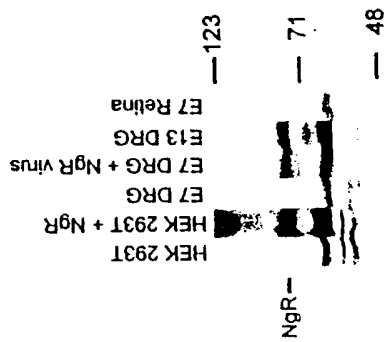
Obr. 8

12.07.03

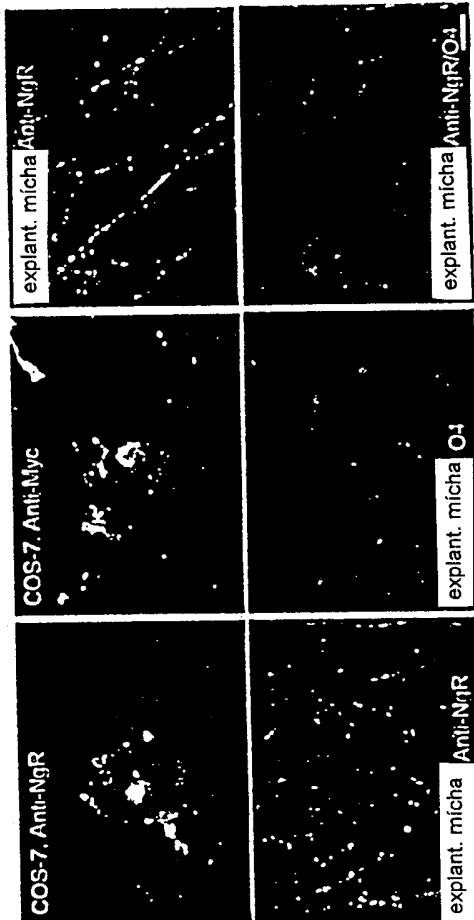
PV 2002 - 2438

14/19

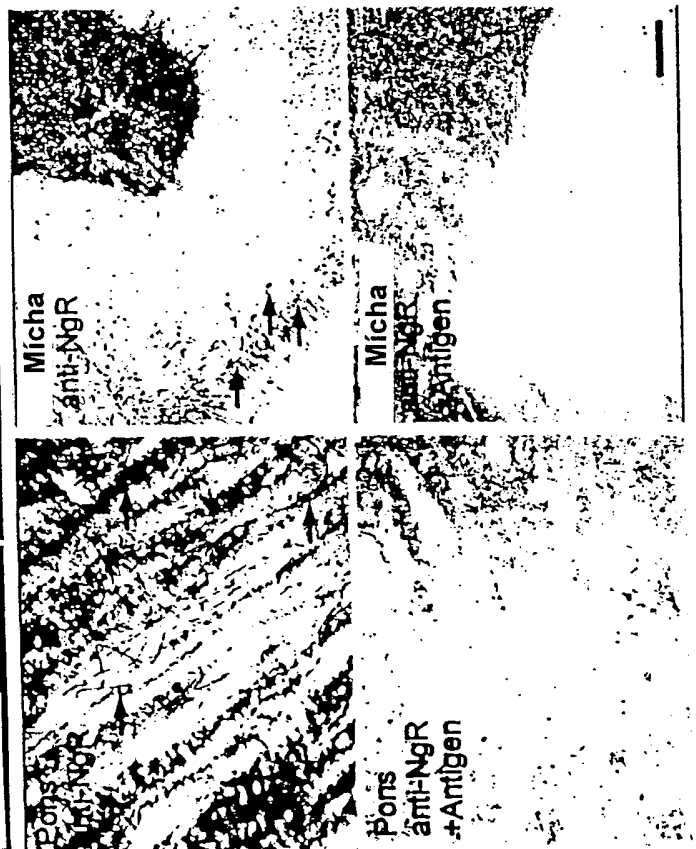
Obr. 9A



Obr. 9B



Obr. 9C

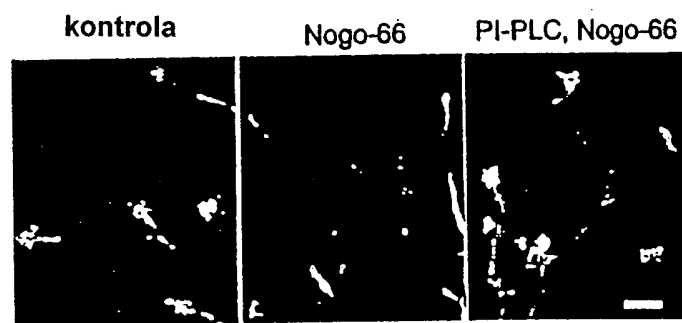


12.07.02

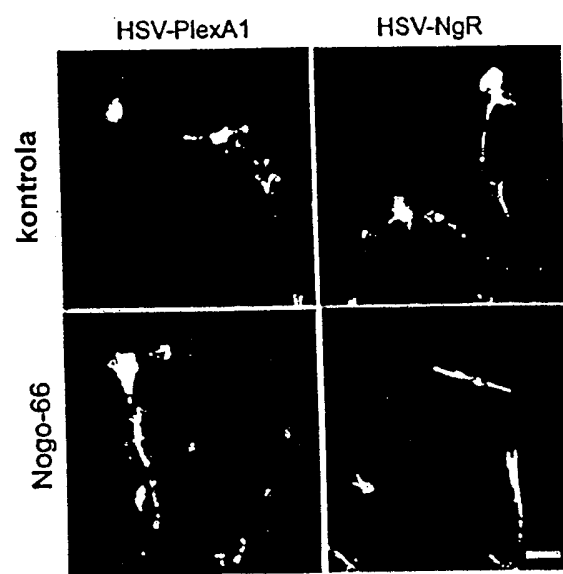
PV 2002-2438

15/19

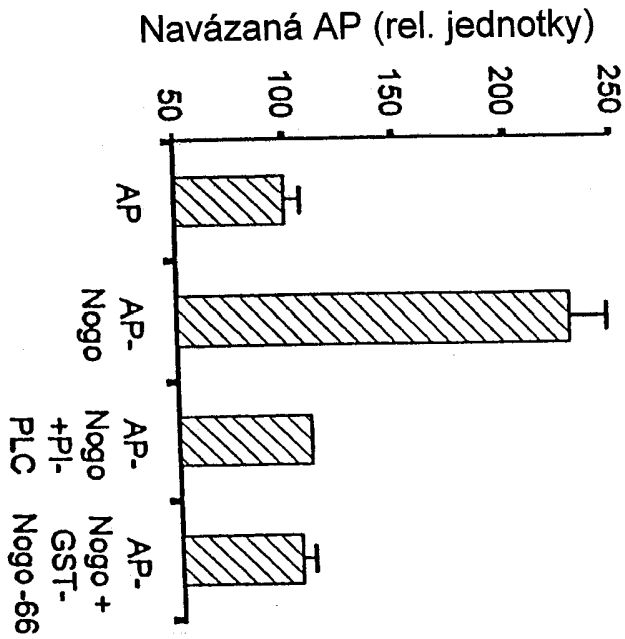
Obr. 10a



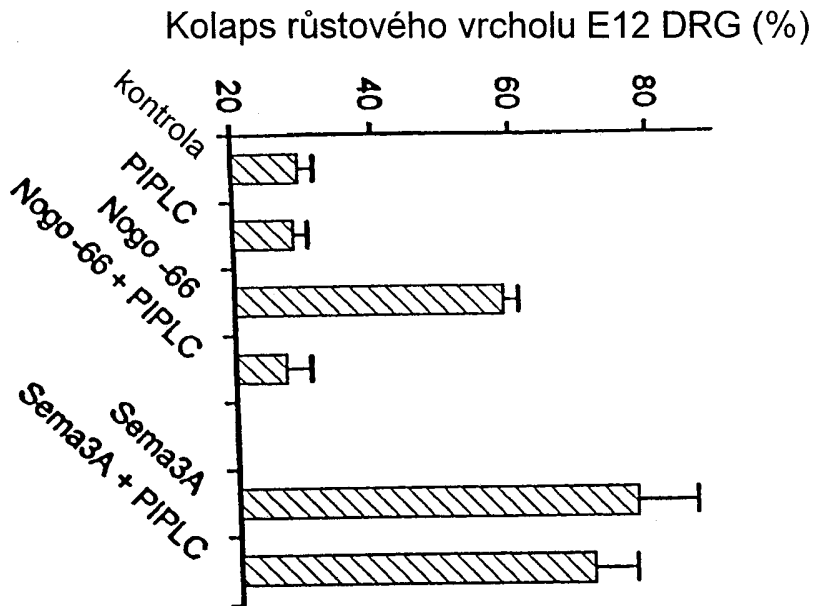
Obr. 10d



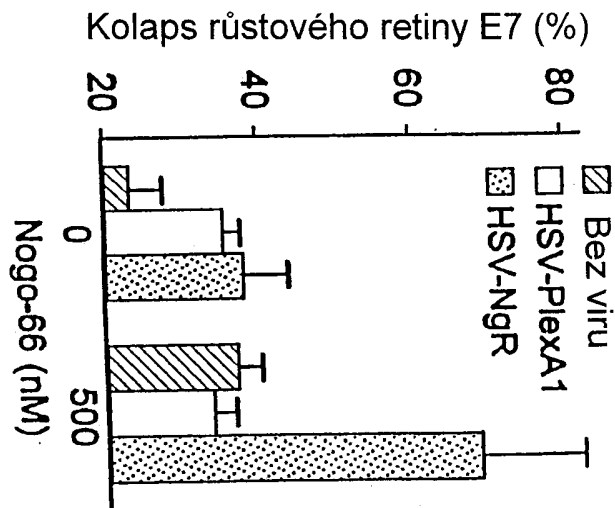
Obr. 10b



Obr. 10c



Obr. 10e



12:07:02

PV 2002-2438

17/19

Obr. 11b



Obr. 11a

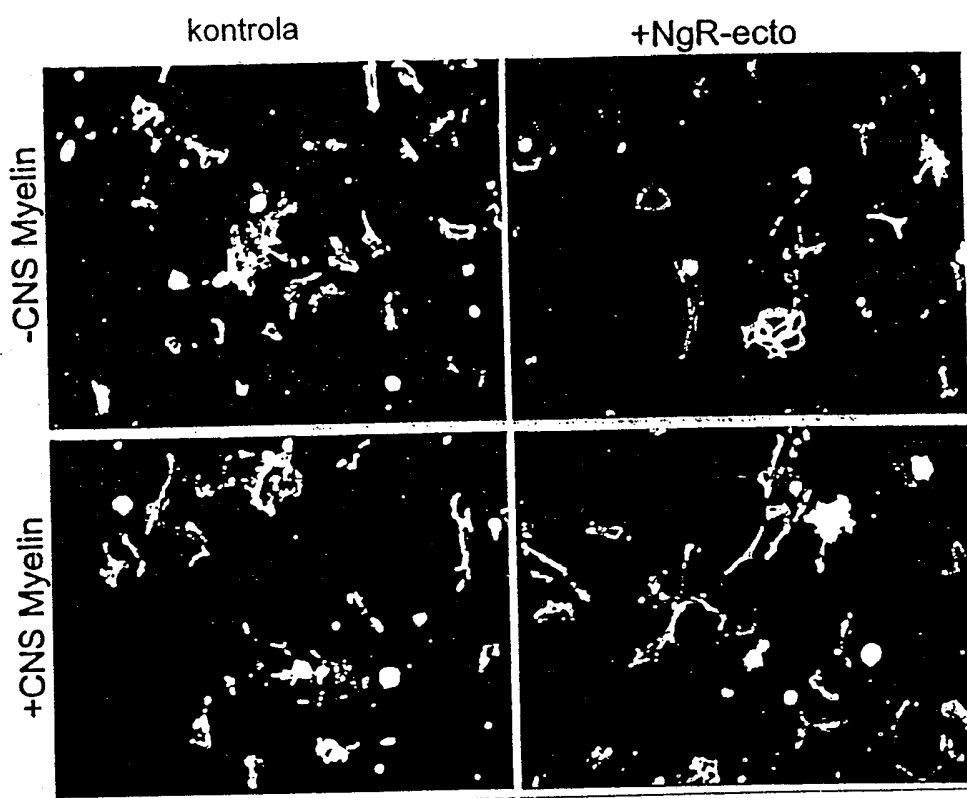
Signální peptid	Repetice bohatá na Leu	LRRCT	TM/GPI	Hladina exprese	Vazba Nogo
				++	++
				++	++
				++	++
				++	-
				++	-
				++	-
				++	-
				++	-

12.07.02

PV 2002-2438

18/19

Obr. 12A

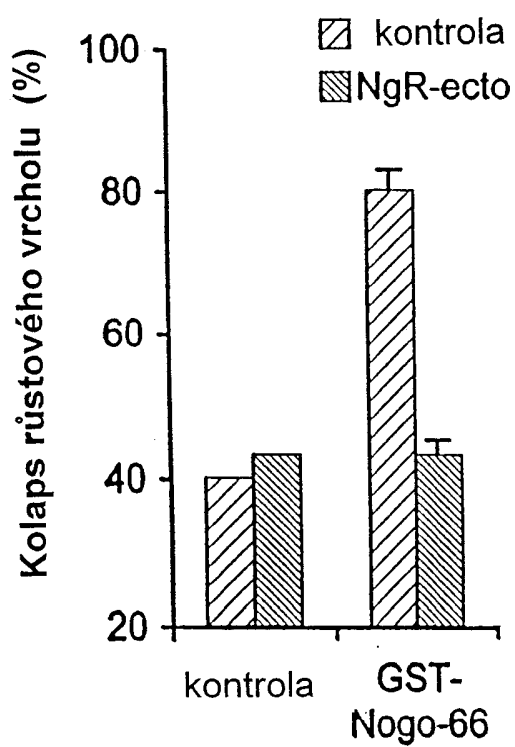


12.07.02

PV 2002-2438

19/19

Obr. 12B



Obr. 12C

