



(12) PATENT

(19) NO

(11) 336530

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

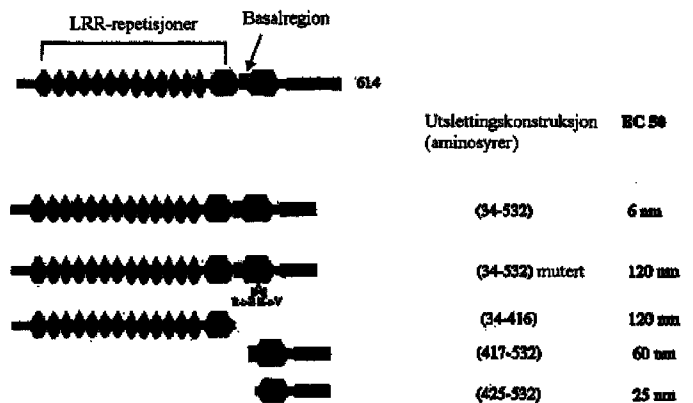
C12N 15/12 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C07K 14/48 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20054836	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2004.03.17 PCT/US2004/08323
(22)	Inng.dag	2005.10.19	(85)	Videreføringdag	2005.10.19
(24)	Løpedag	2004.03.17	(30)	Prioritet	2003.03.19, US, 60/455,756 2003.06.20, US, 60/480,241 2003.08.01, US, 60/492,057
(41)	Alm.tilgj	2005.10.19			
(45)	Meddelt	2015.09.21			
(73)	Innehaver	Biogen MA Inc, 250 Binney Street, US-MA02142 CAMBRIDGE, USA			
(72)	Oppfinner	John McCoy, 56 Howard Street, US-MA01867 READING, USA R Blake Pepinsky, 30 Falmouth Road, US-MA02474 ARLINGTON, USA Daniel H Lee, 361 Dutton Road, US-MA01776 SUDBURY, USA Sha Mi, 4 Vernon Road, US-MA02478 BELMONT, USA Alexey A. Lugovskoy, 24 Center Street, US-MA01801 WOBURN, USA			
(74)	Fullmektig	Oslo Patentkontor AS, Postboks 7007 Majorstua, 0306 OSLO, Norge			

(54)	Benevnelse	Nogo-reseptorbindingsprotein
(56)	Anførte publikasjoner	Mi s. et al. LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex. Nature neuroscience. 2004, Vol. 7, No. 3, side 221-228. Li W. et al. Neutralization of myelin-associated Nogo-A by a Nogo receptor-Fc fusion protein. Society for neuroscience abstracts. 2002, side ABS3332. WO 0112662 A
(57)	Sammendrag	

Det er beskrevet Sp3 5-polypeptider og fusjonsproteiner av disse, Sp35 antistoff og antigenbindende filamenter av disse, og nukleinsyrer som koder for de samme. Det er også beskrevet blandinger som består av slike Sp35 antistoff, antigenbindende fragmenter av disse, Sp35 polypeptider og fusjonsproteiner av disse, og metoder for å lage og bruke disse.



Denne oppfinnelsen relaterer seg til nevrologi, nevrobiologi og molekylær biologi. Nærmere bestemt, relaterer denne oppfinnelsen seg til nukleinsyrer, vektorer og polypeptider samt anvendelse derav til fremstilling av medikamenter til behandling av nevrologiske sykdommer, forstyrrelser og skader som f.eks. ryggmargskade. De aktuelle nukleinsyrene er som angitt i krav 1, de aktuelle vektorene er som angitt i krav 7, de aktuelle polypeptidene er som angitt i krav 11 og de aktuelle anvendelsene er som angitt i krav 22, 23 og 25-26.

Bakgrunn for oppfinnelsen

Aksoner og dendritter springer ut fra nevroner. Den distale enden av et utstrålende akson eller nevridd inkluderer et spesielt område kjent som vekststavcelle. Vekststavceller fornemmer den lokale omgivelse og fører aksonal vekst mot et nevrons måicelle. Vekststavceller reagerer på påvirkninger fra omgivelsene, f.eks. overflateklebrighet, vekstfaktorer, nevrotransmittorer og elektriske områder. Vekststavcellene forlenger seg vanligvis med en hastighet av 1 – 2 mm pr. dag. Vekststavcellene undersøker området foran og på hver side av seg ved hjelp av forlengninger klassifisert som lamellipodia og filopodia. Når en forlengelse kontakter en ugunstig overflate, drar den seg tilbake. Når en forlengelse kontakter en gunstig overflate, fortsetter den å utvide seg og fører vekststavcellen i den retningen. Når vekststavcellen når en passende måicelle, dannes en synaptisk forbindelse.

Nervecellefunksjonen influeres av kontakt mellom nevroner og andre celler i deres nærmeste omgivelse (Rutishauser, et al., 1988, *Physiol. Rev.* 68:819). Disse cellene inkluderer spesialiserte gliaceller, oligodendrocytter i sentralnervesystemet (CNS), og Schwannceller i det perifere nervesystemet (PNS) som pakker inn nerveaksonet med myelin (Lemke, 1992, in *An Introduction to Molecular Neurobiologi*, Z. Hall, Ed., p. 281, Sinauer).

CNS-nevroner har en innebygget evne til å regenerere etter skade, men de hindres i dette ved hemmende proteiner som er til stede i myelin (Brittis et al., 2001, *Neuron* 30:11-14; Jones et al, 2002, *J. Neurosci.* 22:2792-2803; Grimpe et al, 2002, *J. Neurosci.*:22:3144-3160).

Flere hemmende myelinproteiner funnet på oligodendrocytter har blitt karakterisert. Kjente eksempler på myelinhemmende proteiner inkluderer NogoA (Chen et al., *Nature*, 2000, 403,434-439; Grandpre et al., *Nature* 2000,403, 439-444),

myelinassosiert glycoprotein (MAG) (McKerracher et al., 1994, Neuron 13:805-811; Mukhopadhyay et al., 1994, Neuron 13:757-767) og oligodendrocytt glycoprotein (OM-gp) (Mikol et al., 1988, J. Cell. Biol. 106:1273-1279). Alle disse proteinene har hver for seg vist seg å være en ligand for nevronal NgR1. (Wang et al., Nature 2002, 417, 941-944; Grandpre et al., Nature 2000, 403, 439-444; 5 Chen et al., Nature, 2000, 403, 434-439; Domeniconi et al., Neuron 2002, published online June 28, 2002.)

Fra artikkelen til Mi. S. et al. «LINGO-1 is a component of the Nogo-66 receptor/p75 signaling complex», Nature Neuroscience, 2004, vol. 7, no. 3, side 221-10 228, er det kjent et nervesystemspesifikt, transmembrant protein som kalles for LINGO-1. LINGO-1 kan modulere nevroners regenerering i nervesystemet etter skade ved å binde til NgR1 og p75. LINGO-1 er et uløselig protein i motsetning til foreliggende protein.

Det er videre kjent fra artikkelen til Li W. et al.: «Neutralization of myelin-associated Nogo-A by a Nogo receptor-Fc fusion protein», Society for Neuroscience Abstracts, 2002, side ABS3332, proteinet Nogo-A som spiller en hovedrolle i den 15 inhiberende aktiviteten til myelin i sentralnervesystemet på aksonal regenerering etter skade på sentralnervesystemet.

Fra WO 0112662 A er det kjent membran-assosierte proteiner (MEMAP) samt anvendelse derav for å diagnostisere, behandle eller forebygge sykdommer som er 20 assosiert med ekspresjon av MEMAP.

Nogo reseptor-1 (NgR1) er et GPI-forankret membranprotein som inneholder 8 leucinrike repetisjoner (Fournier et al., 2001, Nature 409:341-346). Gjennom interaksjon med hemmende proteiner (f.eks. NogoA, MAG og OM-gp), overfører NgR1-25 komplekset signaler som leder til kollaps av vekststavcellen og hemming av nevrutvekst.

Det er et utilfredsstilt behov for molekyler og metoder til hemming av NgR1-mediert vekststavcellekollaps hvor slik kollaps fører til det resultat at nevrutvekster hemmes.

Oppsummering av oppfinnelsen

Det er gjort forskjellige oppdagelser vedrørende et polypeptidbestemt "Sp35" (foreliggende betegnelse). Alternative betegnelser for Sp35 inkluderer "LINGO" og "LINGO-1". Nærværende oppdagelser inkluderer følgende. Sp35 binder seg til NgR1. Sp35 binder seg til seg selv i en homotypisk interaksjon. Et Sp35-Fc fusjonsprotein inducerer eller fremmer sammentrekning av granulære nevroner. Et Sp35-Fc fusjonsprotein fremmer nerveoverlevelse i både rubro-spinalkanalens halvdelingsskademodell og synsnervens transeksjonsmodell. Sp35 retrovirus-infiserte kortikale primærceller, levert i ryggmargskadede rotter, resulterer i forhøyet nerveoverlevelse, øket β III tubulin-farging av aksoner og økt myelininnhold.

Delvis basert på disse oppdagelser, angir oppfinnelsen bl.a. en isolert nukleinsyre som angitt i krav 1, og som inneholder en nukleotidsekvens som koder for et polypeptid i hvilket: (a) polypeptidet inkluderer (i) et Sp35 LRR-område, (ii) en Sp35 basalregion C-terminal til LRR-området, og (iii) et Sp35 immunoglobulin (Ig) område C-terminal til basalregionen; og (b) polypeptidet mangler et transmembranområde. Sp35 LRR-området kan inneholde en karboksyterminal LRR (LRRCT), en aminoterminal LRR (LRRNT) eller begge. I noen av oppfinnelsens former mangler det kodede Sp35-polypeptidet det cytoplasmatiske området. I noen former inkluderer det kodede Sp35-polypeptidet aminosyrerester 34-532 av SEQ IN NO: 2 og mangler aminosyrerester 533-614.

Oppfinnelsen inkluderer også en slik nukleinsyre som koder for et polypeptid i hvilket polypeptidet inkluderer et Sp35 Ig-område og mangler et Sp35 LRR-område, en Sp35 basalregion, et transmembranområde og et cytoplasmatisk område.

Oppfinnelsen inkluderer også en slik nukleinsyre som koder for et polypeptid i hvilket polypeptidet inkluderer et Sp35 LRR-område og mangler et Sp35 Ig-område, en Sp35 basalregion, et transmembranområde og et cytoplasmatisk område.

Oppfinnelsen inkluderer også en slik nukleinsyre som koder for et polypeptid som mangler et funksjonelt cytoplasmatisk område men inkluderer også alle andre Sp35-områder, f.eks. det kodede polypeptidet kan inkludere aminosyrer 1-576 av SEQ ID NO: 2 (før behandling av signalsekvensen).

I noen av oppfinnelsens former er det kodede polypeptidet et fusjonspolypeptid som inneholder en ikke-Sp35-enhet/del. Denne ikke-Sp35-enheten/delen kan f.eks.

være en Ig-enhet/del, en serumalbuminenhet/del, en målenhet/del, en referent-enhet/del eller en renselettende enhet/del. En foretrukket ikke-Sp35-enhet/del er en Ig- enhet/del, dvs. en Fc-enhet/del.

5 Nukleotidsekvensen kan være operativt bundet til en ekspresjonskontrollsekvens, f.eks. i en ekspresjonsvektor. Oppfinnelsen inkluderer også en vertscelle som er transformert ved hjelp av en vektor som uttrykker et Sp35 polypeptid ifølge oppfinnelsen som angitt i krav 9.

Oppfinnelsen inkluderer også et Sp35 polypeptid som er kodet ved hjelp av de ovenfor beskrevne nukleinsyrer som angitt i krav 11.

10 Oppfinnelsen inkluderer også et slikt Sp35-polypeptid som er konjugert til en polymer, f.eks. en polyalkylen glykol, en sukkerpolymer, og et polypeptid. En foretrukket polymer er et polyalkylen glykol, f.eks. polyetylenglykol (PEG). Polypeptidet kan være konjugert til 1, 2, 3 eller 4 polymerer. Fortrinnsvis er den totale molekylvekten til de konjugerte polymerene fra 20.000 Da til 40.000 Da pr. Sp35-polypeptid.

15 Oppfinnelsen inkluderer også en *in vitro* metode for å hemme signaloverføring av NgR1. Metoden inkluderer kontakt mellom NgR1 og en effektiv mengde av Sp35-polypeptid. Foretrukne polypeptider som skal brukes i metoden inkluderer det følgende:

(a) et Sp35-polypeptid, i hvilket: (a) polypeptidet inkluderer (i) et Sp35 LRR-område, (ii) en Sp35 basalregion C-terminal til LRR-området, og (iii) et Sp35 immunoglobulin (Ig)-område C-terminal til basalregionen; og (b) polypeptidet mangler et transmembranområde; og

20

(b) et Sp35-polypeptid som inkluderer et Sp35 Ig-område og mangler et Sp35 LRR-område, en Sp35 basalregion, et transmembranområde og et cytoplasmatisk område.

25

Oppfinnelsen inkluderer også en *in vitro* metode for å redusere hemming av aksonal vekst av et sentralnervesystemnevron (CNS). Metoden inkluderer å skape kontakt mellom nevronet og en effektiv mengde av polypeptid som f.eks. Sp35-polypeptid, et anti-Sp35 antistoff eller et antigenbindende fragment av et anti-Sp35 antistoff.

30

Oppfinnelsen inkluderer også en metode for å hemme vekststavcellekollaps i et CNS-nevron. Metoden inkluderer å skape kontakt mellom nevronet og en effektiv mengde av polypeptid som f.eks. Sp35-polypeptid, et anti-Sp35 antistoff eller et antigenbindende fragment av et anti-Sp35 antistoff.

5 De aktuelle polypeptider kan anvendes til å fremstille medikamenter for å behandle en CNS sykdom, forstyrrelse eller skade i et pattedyr. Medikamentene kan benyttes i metoder som inkluderer administrering av en terapeutisk effektiv mengde av et polypeptid som f.eks. Sp35-polypeptid, et anti-Sp35 antistoff eller et antigenbin-

10 dende fragment av et anti-Sp35 antistoff, til det aktuelle pattedyret. CNS sykdom, forstyrrelse eller skade er eventuelt en ryggmargskade. Sp35-polypeptidet kan administreres lokalt. I noen av metodens former blir Sp35-polypeptidet i første omgang administrert innen 48 timer etter en ryggmargskade. Til lokal administrering er den terapeutisk effektive mengden av polypeptidet fortrinnsvis fra 10 µg/kg til 10 mg/kg. Til systemisk administrering er den terapeutisk effektive mengde av po-

15 lypeptidet fortrinnsvis fra 1 mg/kg til 20 mg/kg.

De aktuelle vektorer og polynukleotider kan også anvendes i en *ex vivo*-genterapi-metode til behandling av en CNS sykdom, forstyrrelse eller skade i et pattedyr. Metoden inkluderer (a) å fremskaffe en dyrket vertscelle som uttrykker et rekombinant Sp35-polypeptid, og (b) innføre vertscellen i pattedyret på stedet for CNS syk-

20 dom, forstyrrelse eller skade, f.eks. ryggmargskade. Den dyrkede vertscellen kan høstes fra pattedyret som skal behandles. I denne *ex vivo*-genterapimetoden kan det rekombinante Sp35 polypeptidet være et Sp35-polypeptid i full lengde.

De aktuelle medikamentene kan også anvendes for å fremme myelinering av stedet for CNS-sykdom, forstyrrelse eller skade hvor det skapes kontakt mellom stedet for

25 CNS-sykdom, forstyrrelse eller skade med en effektiv mengde av et Sp35-polypeptid, f.eks. et polypeptid som inneholder et Sp35 LRR-område og mangler et Sp35 Ig-område, en Sp35 basalregion, et transmembranområde og et cytoplasmatisk område.

De aktuelle vektorer og polynukleotider kan også anvendes i en *in vivo*-genterapi-metode til behandling av CNS-sykdom, forstyrrelse eller skade ved *in vivo*-

30 genterapi hvor et pattedyr tilføres en virusvektor, på eller nær skadestedet, som inneholder en nukleotidsekvens som koder for et Sp35-polypeptid slik at Sp35-polypeptidet blir uttrykt ved hjelp av nukleotidsekvensen i pattedyret i en mengde tilstrekkelig til å redusere hemming av aksonal utstråling av nevroner ved eller nær

skadestedet. Virusvektoren kan være, f.eks. en adenovirusvektor, en lentivirusvektor, en baculovirusvektor, en Epstein Barr virusvektor, en papovavirusvektor, en vaccinavirusvektor, en herpes simplex-virusvektor. Sykdommen, forstyrrelsen eller skaden kan f.eks. være ryggmargsskade eller synsnerveskade. Virusvektoren kan administreres lokalt, intraokkultært, parenteralt, intratekalt, subduralt og subkutant.

De aktuelle medikamenter kan også anvendes i en metode for å fremme overlevelse av et nevron som risikerer å dø. Metoden inkluderer kontaktskapning mellom nevronet med en effektiv mengde Sp35-polypeptid. Sp35-polypeptidet kan være i en oppløselig form av Sp35, f.eks. et Sp35-Fc fusjonsprotein. Nevronet kan være *in vitro* eller *in vivo*, f.eks. i et pattedyr med en nevrodegenerativ sykdom, forstyrrelse eller skade, f.eks. multippel sklerose, ALS, Huntingtons sykdom, Alzheimers sykdom, Parkinsons sykdom, diabetes nevropati, slag, traumatisk hjerneskade og ryggmargsskade. I noen av behandlingsformene blir Sp35-polypeptidet administrert indirekte ved: (a) å skaffe en dyrket vertscelle som uttrykker et rekombinant Sp35-polypeptid; og (b) å innføre vertscellen i pattedyret på nevronstedet. I noen tilfeller blir polypeptidet administrert indirekte gjennom *in vivo*-genterapi. I en slik form, inkluderer metoden administrering, på eller nær nevronstedet, av en virusvektor som inneholder en nukleotidsekvens som koder for et Sp35-polypeptid slik at Sp35-polypeptidet uttrykkes fra nukleotidsekvensen i pattedyret i en mengde som er tilstrekkelig til å fremme nevronets overlevelse.

Som brukt her, betyr "humant Sp35 polypeptid i full lengde" det polypeptidet hvor aminosyresekvensen er aminosyrer 34-614 av SEQ ID NO: 2.

Som brukt her, betyr "heterolog halvdel" en aminosyresekvens som ikke er til stede i et Sp35-polypeptid i full lengde.

Som brukt her, betyr "nogo reseptor-1" polypeptidet hvis sekvens er offentlig tilgjengelig under Genbank tilgangsnr. AAG53612.

Som brukt her, betyr "Sp35 antagonistpolypeptid" et Sp35- polypeptid som blokkerer, hemmer eller interfererer med den biologiske aktiviteten til naturlig forekommende Sp35.

Som brukt her, betyr "Sp35 basalregion" det følgende aminosyremotiv:

R R A R I R D R K (SEQ ID NO: 4)

K K V K V K E K R (SEQ ID NO: 5)

R R L R L R D R K (SEQ ID NO: 6)

R R G R G R D R K (SEQ ID NO: 7)

R R I R A R D R K (SEQ ID NO: 8)

- 5 Den øverste raden av aminosyrer (uthevet; SEQ ID NO: 4) er den foretrukne Sp35 basalregionsekvensen, med varianter som viser valgfrie erstatninger vist under (SEQ ID NOS: 5, 6, 7 og 8).

Som brukt her, betyr "Sp35 fusjonsprotein" et fusjonsprotein som inkluderer en Sp35-halvdel kombinert med en heterolog halvdel.

- 10 Som brukt her, betyr "Sp35 Ig-område" aminosyrer 433 – 493 av SEQ ID NO: 2, under forutsetning av at sekvensen kan inneholde opptil 5 individuelle aminosyreinnsetninger, strykninger eller konservative aminosyreerstatninger. De følgende erstatningene (nummerering basert på SEQ ID NO: 2) er uttrykkelig inkludert: V til M i posisjon 6; S til G i posisjon 294; V til A i posisjon 348; og R til H i posisjon
15 419.

- Som brukt her, betyr "Sp35 LRR-området" et område som inkluderer 10 – 14 av de leucinrike repetisjonssekvensene, som inkluderer LRRNT og LRRCT, opplistet i tabell 1, forutsatt at opptil fem aminosyreinnsetninger, strykninger eller konservative aminosyreerstatninger kan opptre innen samlingen av 10 – 14 leucinrike repetisjo-
20 ner.

Som brukt her, betyr "Sp35-halvdel" et biologisk aktivt fragment av et Sp35 polypeptid i full lengde.

Som brukt her, betyr "Sp35 polypeptid" en Sp35-halvdel eller et fusjonsprotein som inkluderer en Sp35-halvdel.

- 25 Med mindre det er definert annerledes, har alle tekniske og vitenskapelige betegnelser som er brukt her, samme betydning som det som vanligvis forstås av en vanlig faglært person innen det området som oppfinnelsen vedrører. I tilfelle en tvist skulle oppstå er denne spesifikasjonen, inkludert alle definisjoner, gjeldende.

Selv om metodene og ekvivalent eller lignende materiale til det som blir beskrevet her kan bli brukt i bruken eller testingen av oppfinnelsen, er de foretrukne metoder og materialer beskrevet under.

Kort beskrivelse av tegningene

5 FIG. 1 viser nukleotidsekvensen av et humant Sp35 cDNA i full lengde (SEQ ID NO:1)

FIG. 2 er aminosyresekvensen til humant Sp35-polypeptid i full lengde (SEQ ID NO: 2)

10 FIG. 3 er en skjematisk illustrasjon av Sp35-områdetets struktur og strykningsoversikt for å identifisere Sp35-sekvens(er) som bindes til NgR1.

FIG. 4 er et histogram som oppsummerer data for Sp35-bindingen til COS7-celler transfektert ved hjelp av en ekspresjonsvektor som koder for rotte p75 eller en vektorkontroll. Etter 48 timer ble AP-Sp35 eller AP inkubert med cellene. Bundet AP ble påvist ved bruk av kromogent AP og påvisningsreagens.

15 FIG. 5 er et histogram som oppsummerer data for binding av AP-Omgp og AP-Nogo-66 til COS7 celler transfektert med en ekspresjonsvektor som koder for NgR1; NgR1 og p75; NgR1, p75 og Sp35 eller en vektorkontroll. Etter 48 timer ble, AP-Omgp, AP-Nogo-66 eller AP inkubert med cellene. Bundet AP ble påvist ved bruk av kromogent AP påvisningsreagens.

20 FIG. 6 er et histogram som oppsummerer data for reduksjon av hemmende aktivitet fra myelinhemmere på nevruttvekst *in vitro*. Nevrittlengde ble målt 7 dager etter fødsel av de cerebellare granulære nevroner hos rotter som uttrykker DN-Sp35, Sp35 i full lengde eller kontroller dyrket på immobilisert substrat Omgp, Myelin og Nogo-66. DN-Sp35-transfekteerte celler oppviste redusert respons på hemmende substrater. Nevrittlengde ble kvantifisert fra 1000 nevroner pr. behandlings-
25 gruppe fra to uavhengige forsøk ($p < 0,01$)

FIG. 7 er et histogram som oppsummerer data for reversert hemmende aktivitet av myelinhemmere av Sp35-Fc. Nevrittlengde 7 dager etter fødsel av de cerebellare granulære nevroner (1000 nevroner) dyrket på immobilisert substrat Omgp, Myelin
30 eller Nogo-66 i nærvær eller fravær av Sp35-Fc. Sp35-Fc reduserte hemming av

nevrittutvekst forårsaket av Omgp, Nogo-66 og MAG. Nevrittlengde ble kvantifisert fra 1000 nevroner pr. behandlingsgruppe fra to uavhengige forsøk ($p < 0,01$)

FIG. 8 er en graf som oppsummerer data fra et forsøk som viser at intratekal-administrert Sp35-Fc øker funksjonsbedring etter dorsal halvdeling i en rotte. Drivkraften BBBs score målt som en funksjon av tiden etter dorsal halvdeling i kontroll (IgG) eller Sp35-Fc-behandlede rotter (8 dyr pr. gruppe). Behandling ble initiert ved tidspunkt for ryggmargskade.

FIG. 9 er en graf som viser individuelle dyre-BBB score i uke fire i forsøket som er oppsummert i FIG. 8.

10 Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

Naturlig forekommende humant Sp35 er et glykosylert CNS-spesifikt protein som inneholder 614 aminosyrer (FIG.2; SEQ ID NO: 2). Det humane, villtype Sp35-polypeptid i full lengde inneholder et LRR-område som består av 14 leucinrike repetisjoner (inkludert N- og C-terminal topper), et Ig- område, en transmembran region og et cytoplasmatisk område (FIG.3). Det cytoplasmatiske området inneholder et kjent tyrosinfosforylert sted. I tillegg inneholder det naturlig forekommende Sp35-protein en signalsekvens, en kort basalregion mellom LRRCT og Ig-området og en transmembran region mellom Ig-området og det cytoplasmatiske området (FIG. 3). Det humane Sp35-genet inneholder alternative startkodoner for translasjon, slik at seks ytterligere aminosyrer, f.eks. MQVSKR (SEQ ID NO: 9) kan eller kan ikke være til stede ved Sp35 signalsekvensens N-terminal. Tabell 1 lister opp Sp35-områder og andre regioner i henhold til aminosyrerestnummer basert på sekvensen i FIG. 2 (SEQ ID NO: 2).

Tabell 1

Område eller region	Startrest	Sluttrest
Signalsekvens	1	33
LRRNT	34	64
LRR	66	89
LRR	90	113
LRR	114	137
LRR	138	161
LRR	162	185
LRR	186	209

LRR	210	233
LRR	234	257
LRR	258	281
LRR	282	305
LRR	306	329
LRR	330	353
LRRCT	363	416
Basal	417	424
Ig	433	493
Forbindelsessekvens	494	551
Transmembran	552	576
Cytoplasmatisk	577	614

Vevsdistribusjon og Sp35s utviklingsmessige ekspresjon har blitt studert i mennesker og rotter. Sp35 biologi har blitt studert i en dyreeksperimentell rottemodell (rotte). Ekspresjonen av Sp35 er lokalisert til CNS-nevroner og oligodendrocytter i hjernen, som bestemt av Northern blot og immunohistokjemisk farging. Rotte-Sp35 mRNAs ekspresjonsnivå reguleres utviklingsmessig og når en topp rett etter fødselen, dvs. ca. dag 1 etter fødselen. I en rottes ryggmargsskade transfeksjonsmodell blir Sp35 oppregulert på skadestedet, som bestemt av RT-PCR.

Oppfinnerne har oppdaget at villtype Sp35 i full lengde binder seg til NgR1. Løselige derivater av Sp35 fungerer som Sp35 antagonistpolypeptider ved å binde seg til NgR1 og blokkerer, hemmer eller interferer med dets funksjon og derigjennom reduserer NgR1-mediert hemming av aksonale forgreninger som normalt finner sted i CNS-nevroner. Dette er gunstig i situasjoner hvor aksonalforgrening eller nevrittskudd trengs i hjernen eller i ryggmargen. Ryggmargsskade inkludert partiell eller fullstendig knusing eller løsrivelse, er eksempler på en situasjon hvor aksonalforgrening trengs, men er normalt hemmet gjennom innvirkning av Nogo-banen. Eksempler på sykdommer eller forstyrrelser hvor aksonalforgrening og/eller nervittutskyting i hjernen ville være en fordel, inkluderer slag, multipel sklerose og andre neurodegenerative sykdommer eller forstyrrelser.

I de aktuelle behandlingsmetodene kan et Sp35-polypeptid eller et Sp35-blokkerende antistoff (eller antigenbindende antistoff-fragment) bli administrert direkte som et forhånds dannet polypeptid eller indirekte gjennom en nukleinsyrevektor for å motvirke NgR1-funksjonen og tillate fordelaktig aksonalutvekst.

I enkelte behandlinger blir et løslig Sp35 antagonistpolypeptid administrert i en behandlingsmetode som inkluderer: (1) å omdanne eller transfektere en implanterbar vertscelle med en nukleinsyre, f.eks. en vektor som uttrykker et Sp35 polypeptid; og (2) å implantere den omdannede vertscellen i et pattedyr, på stedet for sykdom, forstyrrelse eller skade. For eksempel kan den omdannede vertscelle implanteres på skadestedet i ryggmargen. I noen behandlingsformer blir den implanterbare vertscellen tatt bort fra det aktuelle pattedyr, midlertidig dyrket, omformet eller transfektert med en isolert nukleinsyre som koder for et løselig Sp35-polypeptid, og implantert igjen i det samme pattedyret hvorfra det ble fjernet. Cellen kan bli, men må ikke bli, fjernet fra det samme stedet som den ble implantert. Slike former, noen ganger kjent som *ex vivo* genterapi, kan skaffe en kontinuerlig tilførsel av Sp35 polypeptid, lokalisert på virkningsstedet, i en begrenset tidsperiode.

Oppfinnelsen skaffer oligopeptider som er nyttige som modulatorer for Sp35s interaksjon med NgR1 og Sp35 homotypiske interaksjoner. Oligopeptidene inkluderer det følgende aminosyremotiv:

L S P R K H (SEQ ID NO: 10)

I T P K R R (SEQ ID NO: 11)

A C P H H K (SEQ ID NO: 12)

V S P R K H (SEQ ID NO: 13)

Den øverste raden av aminosyrer (uthevet; SEQ ID NO: 10) er den foretrukne sekvensen med varianter som inneholder valgfrie erstatninger vist nedenfor (SEQ ID NO: 11, 12 og 13).

Forskjellige mønstergyldige Sp35-polypeptider, anti-Sp35-antistoff og antistofffragmenter, og metoder og materiale for å få tilgang til disse molekylene, er beskrevet nedenfor.

Fusionsproteiner og konjugerte polypeptider

Noen former av foreliggende oppfinnelse medfører bruk av Sp35-polypeptid, f.eks. et Sp35 antagonist-polypeptid i hvilket en Sp35-del er kondensert til en heterolog polypeptiddel for å danne et Sp35 fusionsprotein. Sp35 fusionsproteiner kan brukes

for å oppnå forskjellige mål, f.eks. økt halveringstid i serum, forbedret biotilgjengelighet, *in vivo* målretting mot et spesifikt organ eller vevstype, forbedret rekombinant ekspresjonseffektivitet, forbedret vertscelleutskillelse, lette rensing og høyere aviditet. Avhengig av mål(ene) som skal nås, kan den heterologe delen være inert eller biologisk aktiv. Den kan også velges å være stabilt fusjonert til Sp35 halvdelen eller å kunne spaltes *in vitro* eller *in vivo*. Heterologe enheter for å få frem forskjellige egenskaper er kjent i faget.

Som et alternativ til å uttrykke et Sp35 fusjonsprotein, kan en valgt heterolog enhet forhånds dannes og konjugeres kjemisk til Sp35-delen. I de fleste tilfeller vil en valgt heterolog enhet fungere på samme måte, om den er fusjonert eller konjugert til Sp35-halvdelen. I den følgende diskusjonen om heterologe aminosyresekvenser er det derfor underforstått, hvis ikke annet er spesifisert, at heterologe sekvenser kan sammenføres med Sp35-deler i form av et fusjonsprotein eller som et kjemisk konjugat.

Farmakologisk aktive polypeptider som f.eks. Sp35, har ofte som egenskap rask *in vivo* utskillelse, noe som nødvendiggjør store doser for å oppnå terapeutisk effektive konsentrasjoner i kroppen. I tillegg kan polypeptider som er mindre enn ca. 60 kDa ha mulighet til glomerulær filtrering, noe som noen ganger fører til nefrotoksisitet. Fusjon eller konjugasjon av relativt små polypeptider, slike som Sp35-fragmenter, kan brukes for å redusere eller forhindre risiko for slik nefrotoksisitet. Forskjellige heterologe aminosyresekvenser, dvs. polypeptidhalvdeler eller "bærere" for å øke *in vivo*-stabiliteten, dvs. serumhalveringstid av terapeutiske polypeptider, er kjent.

Pga. den lange halveringstiden, bred *in vivo*-distribusjon og mangel på enzymatisk eller immunologisk funksjon, er essensielt humant serumalbumin (HSA) i full lengde eller et HSA-fragment, en foretrukket heterolog del. Gjennom bruk av metoder og materiale slik som beskrevet i Yeh et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:1904-1908 og Syed et al., 1997, Blood 89:3243-3252, kan HSA bli brukt for å danne et Sp35 fusjonsprotein eller konjugat som viser farmakologisk aktivitet i kraft av Sp35-delen mens den viser signifikant økt, dvs. 10-ganger til 100-ganger høyere, *in vivo*-stabilitet. Fortrinnsvis er C-terminalen av HSA fusjonert med N-terminalen på Sp35 delen. Siden HSA er et protein som utskilles naturlig, kan HSA-signalsekvensen bli utnyttet for å oppnå utskillelse av Sp35 fusjonsproteiner i cellekulturmediet, når fusjonsproteinet blir produsert i et eukaryotisk, dvs. pattedyrs, ekspresjonssystem.

Noen av oppfinnelsens former bruker et Sp35 polypeptid i hvilket en Sp35-halvdel er fusjonert til en Fc-region, dvs. C-terminaldelen av en Ig tungkjedekonstant region. Mulige fordeler ved en Sp35-Fc-fusjon inkluderer løslighet, *in vivo* stabilitet, multivalens, dvs. dimerisering. Fc-regionen som er brukt, kan være en IgA, IgD eller IgG Fc-region (hengsel-CH2-CH3). Alternativt kan det være en IgE eller IgM Fc-region (hengsel-CH2-CH3-CH4). En IgG Fc-region er foretrukket, f.eks. en IgG1 Fc-region eller en IgG4 Fc-region. Materialer og metoder for å konstruere og uttrykke DNA-kodede Fc-fusjoner er kjent i faget og kan benyttes for å oppnå Sp35-fusjoner uten unødvendig eksperimentering. Noen av oppfinnelsens former bruker et Sp35 fusjonsprotein slik som beskrevet i Capon et al. U.S. Patent Nr. 5.428.130 og 5.565.335.

Signalsekvensen er et polynukleotid som koder for en aminosyresekvens som initierer transport av et protein over membranen til det endoplasmatiske reticulum. Signalsekvensen som er nyttig for å konstruere en immunofusjon, inkluderer antistoff, lettkjedesignalsekvens, f.eks. antistoff 14.18 (Gillies et al., 1989, J. Immunol. Meth., 125:191-202), antistoff tungkjedesignalsekvens, f.eks. MOPC141 antistoff tungkjedesignalsekvens (Sakano et al., 1980, Nature 286:5774). Alternativt kan andre signalsekvenser benyttes, (se f.eks. Watson, 1984, Nucleic Acids Research 12:5145). Signalpeptidet blir vanligvis spaltet i hulrommet i det endoplasmatiske reticulum ved hjelp av signalpeptidaser. Dette resulterer i utskillelse av et immunofusjonsprotein som inneholder Fc-regionen og Sp35-delen.

I noen former koder DNA-sekvensen for et proteolytisk spaltingssted mellom sekresjonskassetten og Sp35-delen. Et spaltingssted sørger for en proteolytisk spaltning av det kodede fusjonsproteinet og derigjennom skiller det Fc-området fra målproteinet. Nyttige proteolytiske spaltingssteder inkluderer aminosyresekvenser som gjenkjennes av proteolytiske enzymer som f.eks. trypsin, plasmin, trombin, faktor Xa eller enterokinase K.

Sekresjonskassetten kan inkorporeres i en kopierbar ekspresjonsvektor. Nyttige vektorer inkluderer lineære nukleinsyrer, plasmider, fagemider, kosmider og lignende. pdC er en egnet ekspresjonsvektor hvor overføring av immunofusjons-DNA blir kontrollert av forsterkeren og promoteren det humane cytomegaloviruset. Se f.eks. Lo et al., 1991, Biochim. Biophys. Acta 1088:712; og Lo et al., 1998, Protein Engineering 11:495-500. En passende vertscelle kan transformeres eller transfekteres med et DNA som koder for et Sp35-polypeptid og kan bli brukt for å uttrykke og utskille Sp35 polypeptidet. De foretrukne vertscellene inkluderer udødeli-

ge hybridomceller, myelomceller, 293-celler, kinesisk hamster eggstokkceller (CHO), Helaceller og COS-celler.

Helt intakt viser villtype Fc-regioner effektorfunksjoner som normalt er unødvendige og uønsket i et Fc fusjonsprotein ifølge foreliggende oppfinnelse. Derfor er visse bindingssteder fortrinnsvis fjernet fra Fc-regionen gjennom oppbygging av sekresjonskassetten. For eksempel, fordi samuttrykk med lett kjede er unødvendig, blir bindingsstedet til tungkjedebindingsproteinet, Bip (Hendershot et al., 1987, Immunol. Today 8:111-114), fjernet fra CH2-området av IgEs Fc-region, slik at dette stedet ikke interferer med effektiv utskillelse av immunofusin. Likeledes skal cysteinresiduen som er tilstede i Fc-regioner som er ansvarlig for binding til lett kjeden i immunoglobulinet, bli fjernet eller erstattet med en annen aminosyre slik at disse cysteinresiduen ikke interferer med passende folding av Fc-regionen når den dannes som et immunofusin. Transmembran områdesekvenser, slik som de presentert i IgM, skal fjernes.

IgG1 Fc-regionen er foretrukket. Alternativt kan Fc-regionen til andre underklasser av immunoglobulin gamma (gamma-2, gamma-3 og gamma-4) bli brukt i sekresjonskassetten. IgG1 Fc-regionen i immunoglobulin gamma-1 er fortrinnsvis brukt i sekresjonskassetten og inkluderer hengselregionen (i hvertfall delvis), CH2-regionen og CH3-regionen. I noen former er Fc-regionen i immunoglobulin gamma-1 et CH2-fjernet Fc, som inkluderer deler av hengselregionen og CH3-regionen, men ikke CH2-regionen. En CH2-fjernet Fc har blitt beskrevet av Gillies et al., 1990, Hum. Antibod. Hybridomas, 1:47. I noen former blir Fc-regioner fra IgA, IgD, IgE eller IgM brukt.

Sp35-Fc fusjonsproteiner kan konstrueres i flere forskjellige konfigurasjoner. I en konfigurasjon er C-terminalen i Sp35-halvdelen fusjonert direkte med N-terminalen i Fc-halvdelen. I en litt forskjellig konfigurasjon er et kort polypeptid, f.eks. 2-10 aminosyrer inkorporert i fusjonen mellom N-terminalen i Sp35-halvdelen og C-terminalen i Fc-halvdelen. Slike linker fremmer konform fleksibilitet som kan forbedre biologisk aktivitet under noen omstendigheter. Hvis en tilstrekkelig del av hengselregionen blir holdt tilbake i Fc-halvdelen, vil Sp35-Fc fusjonen bli dimerisert og danner dermed et divalent molekyl. En homogen populasjon av monomeriske Fc-fusjoner vil gi monospesifikke, bivalente dimerer. En blanding av to monomeriske Fc-fusjoner som hver har forskjellig spesifisitet, vil gi bi-spesifikke, bi-valente dimerer.

Hvilken som helst av et antall krysslinkere som inneholder en tilsvarende aminoreaktiv gruppe og tiolreaktiv gruppe, kan brukes for å linke Sp35 til serumalbumin. Eksempler på passende linkere inkluderer aminoreaktive krysslinkere som innfører et tiol-reaktivt maleimid, f.eks. SMCC, AMAS, BMPS, MBS, EMCS, SMPB, SMPH, KMUS og GMBS. Andre passende linkere innfører en tiolreaktiv haloacetatgruppe, f.eks. SBAP, SIA, SIAB. Linkere som skaffer en beskyttet eller ikke-beskyttet tiol for reaksjon med sulfhydryl-grupper for å produsere en reduserbar link, inkluderer SPDP, SMPT, SATA og SATP. Slike reagenser er tilgjengelige på markedet (f.eks. Pierce Chemicals).

Konjugasjon må ikke involvere N-terminalen i et Sp35-polypeptid eller tiol-delen på serumalbumin. For eksempel kan Sp35 albuminfusjoner oppnås ved bruk av genetisk manipulering i hvilket Sp35-halvdelen blir fusjonert til serumalbumin-genet ved dets N-terminal, C-terminal eller begge.

Sp35 polypeptider kan fuseres med heterologe peptider for å lette rensing og identifisering av Sp35-delen. For eksempel kan en histidin-markør fuseres med et Sp35 polypeptid for å lette rensing ved bruk av kromatografimedium tilgjengelig på markedet. I noen av oppfinnelsens former er en Sp35 fusjonskonstruksjon brukt for å øke produksjonen av en Sp35-del i bakterier. I slike konstruksjoner er et bakterieprotein, normalt uttrykt og/eller utskilt på et høyt nivå, brukt som N-terminalens fusjonspartner i et Sp35 polypeptid. Se f.eks., Smith et al., 1988 Gene 67:31; Hopp et al., 1988, Biotechnology 6:1204; La Vallie et al., 1993, Biotechnology 11:187.

I noen av oppfinnelsens former inkluderer en fusjonskonstruksjon en Sp35-halvdel og en annen human NgR1-bindende halvdel, f.eks. en oligodendrocytt myelin glykoprotein (Omgp)-del, en myelin assosiert glykoprotein (MAG)- del eller Nogo66-del. Fordelene ved slike konstruksjoner inkluderer økt NgR1 bindingsaffinitet.

Omgp aminosyresekvensen i full lengde er kjent i faget (Genbank aksesjonsnr. P23515). Spesifikke eksempler på Sp35-Omgp-fusjoner inkluderer det følgende:

Sp35 (aa 34-532) + IgG1 Fc + Omgp (aminosyrerester 25-400); og

SP35 (aa 34-532) + HSA + Omgp (aminosyrerester 25-400).

MAG aminosyresekvens i full lengde er kjent i faget (Genbank aksesjonsnr. A61084). Spesifikke eksempler på Sp35-MAG fusjoner inkluderer følgende:

Sp35 (aa 34-532) + IgG1 Fc + MAG (aminosyrerester 12-500); og

Sp35 (aa 34-532) + HSA + MAG (aminosyrerester 12-500).

Nogo aminosyresekvens i full lengde er kjent i faget (NogoA Genbank aksesjonsnr. AY102279). Spesifikke eksempler på Sp35-Nogofusjoner inkluderer følgende:

5 Sp35 (aa 34-532) + IgG1 Fc + Nogo66 (NogoA aminosyrerester 1056-1122);

Sp35 (aa 34-532) + HSA + Nogo66 (NogoA aminosyrerester 1056-1122);

Sp35 (aa 34-532) + IgG1 Fc + amino Nogo (NogoA aminosyrerester 1-949); og

Sp35 (aa 34-532) + HSA + amino Nogo (NogoA aminosyrerester 1-949).

Ved å sammenføre en Sp35-del ved amino- og karboksy-terminalen til en passende
 10 fusjonspartner, kan bivalente eller tetravalente former av et Sp35 polypeptid opp-
 nås. For eksempel kan en Sp35-del sammenføres med amino- og karboksy-
 terminalen til en Ig-del for å produsere et bivalent monomerisk polypeptid som in-
 nehoder 2 Sp35 deler. Ved dimerisering av to av disse monomerene, i kraft av Ig-
 delen, oppnås en tetravalent form av et Sp35 protein. Slike multivalente former
 15 kan brukes for å oppnå økt bindingsaffinitet til målet. Multivalente former av Sp35
 kan også oppnås ved å plassere Sp35-deler i tandem for å danne kjeder, som kan
 bli benyttet alene eller sammenføyet med en fusjonspartner så som Ig eller HSA.

Konjugerte polymerer (andre enn polypeptider)

Noen av oppfinnelsens former involverer et Sp35 polypeptid i hvilket en eller flere
 20 polymerer er konjugert (bundet kovalent) til Sp35 polypeptidet. Eksempler på po-
 lymerer som passer til slik konjugasjon, inkluderer polypeptider (diskutert ovenfor),
 sukkerpolymerer og polyalkylen glykolkjeder. Typisk, men ikke nødvendigvis, blir
 en polymer konjugert til Sp35-polypeptidet i den hensikt å forbedre en eller flere av
 følgende: løselighet, stabilitet eller biotilgjengelighet.

25 En foretrukket klasse polymerer til konjugasjon til et Sp35 polypeptid er en po-
 lyalkylenglykol. Polyetylen glykol (PEG) er spesielt foretrukket. PEG-enheter, f.eks.
 1, 2, 3, 4 eller 5 PEG-polymerer kan konjugeres til hvert Sp35 polypeptid for å øke
 serumhalveringstid sammenlignet med Sp35 polypeptidet alene. PEG-enheter er

ikke-antigene og i hovedsak biologisk inerte. PEG-enheter kan være forgrenet eller ikke-forgrenet. Antall PEG-enheter bundet til Sp35 polypeptidet samt molekylvekten av de individuelle PEG-kjedene kan variere. Vanligvis, jo høyere molekylvekt polymeren har, desto færre polymerkjeder er bundet til polypeptidet. Fortrinnsvis er den totale polymermasse forbundet med Sp35 polypeptidet fra 20 kDa til 40 kDa. Hvis en polymerkjede blir bundet, er således kjedens molekylvekt 20-40 kDa. Hvis to kjeder blir bundet er foretrukket molekylvekt av hver kjede 10-20 kDa. Hvis tre kjeder er forbundet er foretrukket molekylvekt 7-14 kDa.

Polymeren, f.eks. PEG, kan bindes til Sp35 polypeptidet gjennom enhver passende, eksponert reaktiv gruppe på polypeptidet. Den eller de eksponerte reaktive gruppene kan f.eks. være en N-terminal aminogruppe eller epsilon aminogruppen til en intern lysinrest, eller begge. En aktivert polymer kan reagere og bindes kovalent til enhver fri aminogruppe på Sp35 polypeptidet. Frie karboksylgrupper, passende aktiverte karbonylgrupper, hydroksyl, guanydyl, imidazol, oksyderte karbohydrat-enheter og merkaptogrupper av Sp35 (hvis tilgjengelig) kan også brukes som reaktive grupper til polymerforbindelsen.

Fortrinnsvis blir ca. 1,0 til ca. 10 mol av aktivert polymer pr. mol polypeptid, avhengig av polypeptid-konsentrasjonen, benyttet i en konjugasjonsreaksjon. Vanligvis representerer det valgte forhold en balanse mellom det å maksimere reaksjonens tilleggsreaksjoner (ofte uspesifikke) som kan forringe den ønskede farmakologiske effekten av Sp35-delen, minimeres. Fortrinnsvis blir minst 50 % av den biologiske aktiviteten til Sp35 polypeptidet (som demonstrert f.eks. i enhver test beskrevet her eller kjent i faget) beholdt og aller helst nærmere 100 % beholdt.

Polymeren kan konjugeres til Sp35-polypeptidet ved å benytte konvensjonell kjemi. For eksempel kan en polyalkylen glykoldel være koblet til en lysin epsilon aminogruppe på Sp35 polypeptidet. Bindingen til lysinsidekjeden kan utføres med en N-hydroxylsuccinimid (NHS) aktiv ester slik som PEG succinimidylsuccinat (SS-PEG) og succinimidylpropionat (SPA-PEG). Passende polyalkylen glykolenheter inkluderer f.eks. karboksymetyl-NHS, norlausin-NHS, SC-PEG, tresylat, aldehyd, epoksid, karbonylimidazol og PNP-karbonat. Disse reagensene er tilgjengelig på markedet.

Ekstra aminreaktive PEG-linkere kan byttes ut med succinimidylgruppen. Disse inkluderer f.eks. isothiocyanat, nitrofenylkarbonat, epoksider og benzotriazolkarbonater. Man velger helst betingelser som maksimerer selektiviteten og reaksjonens om-

fang. Slik optimalisering av reaksjonsbetingelsene er innenfor vanlig dyktighet i faget.

PEGylering kan utføres ved hjelp av PEGyleringsreaksjonene som er kjent i faget. Se f.eks. Focus on Growth Factors, 3: 4-10,1992, publiserte europeiske patentsøknader EP 0 154 316 og EP 0 401 384. PEGylering kan utføres ved hjelp av en asyleringsreaksjon eller en alkyleringsreaksjon med et reaktivt polyetylenglykolmolekyl (eller en analog reaktiv vannløslig polymer).

PEGylering ved asylering involverer vanligvis reaksjon av et aktivt esterderivat av polyetylenglykol. Ethvert reaktivt PEG-molekyl kan benyttes i PEGylering. En foretrukket aktivert PEG-ester er PEG esterifisert til N-hydroksysuccinimid (NHS). Som brukt her, inkluderer asylering uten begrensning de følgende typer av binding mellom det terapeutiske protein og en vannløslig polymer slik som PEG; amid, karbamat, uretan og lignende. Se Bioconjugate Chem. 5: 133-140, 1994. Reaksjonsparametere bør velges for å unngå temperatur, løsningsmiddel og pH-forhold som kan ødelegge eller inaktivere Sp35 polypeptid.

Fortrinnsvis er forbindelsesbindingen et amid. Fortrinnsvis er minst 95 % av sluttproduktet mono, di- eller tri-PEGylert. Imidlertid kan noen typer med høyere grader av PEGylering dannes i mengder avhengig av den spesifikke reaksjonsbetingelsen som er benyttet. Optimalt blir rensede, PEGylerte typer utskilt fra blandingen, spesielt ikkereagerte typer, ved konvensjonelle rensemetoder, inkludert f.eks. dialyse, utsalting, ultrafiltrering, ionebyttekromatografi, gelfiltrerings-kromatografi og elektroforese.

PEGylering ved alkylering involverer vanligvis en reaksjon av et terminalt aldehyderivat av PEG med Sp35 i nærvær av et reduserende agens. I tillegg kan man manipulere reaksjonsbetingelsene for å favorisere PEGylering betraktelig bare ved N-terminalens aminogruppe på Sp35 (dvs. et mono-PEGylert protein). I begge tilfeller av mono-PEGylering eller poly-PEGylering er PEG-gruppene fortrinnsvis bundet til proteinet via en -CH₂-NH-gruppe. Med spesiell referanse til -CH₂-gruppen er denne type binding kjent som en "alkyl"-binding.

Derivatisering via reduserende alkylering for å produsere et mono-PEGylert produkt utnytter differensiert reaktivitet av forskjellige typer primære aminogruupper (lysin versus N-terminalen) tilgjengelig for derivatisering. Reaksjonen utføres ved en pH som tillater en å dra fordel av pK_a-forskjellen mellom epsilon-aminogruupper på ly-

sinrester og proteinets N-terminale aminogruppe. Ved slik selektiv derivatisering, blir festing av en vannløslig polymer som inneholder en reaktiv gruppe, slik som et aldehyd, til et protein, kontrollert: konjugasjon med polymeren finner hovedsakelig sted på N-terminalen i proteinet, og ingen signifikant modifikasjon av andre reaktive grupper slik som lysin sidekjede aminogru-
 5 ve grupper slik som lysin sidekjede aminogru-
 5 ve grupper slik som lysin sidekjede aminogru-
 5 ve grupper slik som lysin sidekjede aminogru-

Polymermolekylene som benyttes i både asylerings- og alkyleringsmetoder blir valgt blant vannløslige polymerer. De valgte polymerene bør modifiseres til å ha en enkel, reaktiv gruppe slik som en aktiv ester for asylering eller et aldehyd for alky-
 10 lering, fortrinnsvis slik at graden av polymerisering kan kontrolleres, slik som det er vist i de foreliggende metoder. Et egnet reaktivt PEG-aldehyd er polyetylenglykol propionaldehyd som er vannstabil, eller mono-, C1-C10-, alkoksy- eller aryloksyde-
 10 rivater av disse (se U.S. Patent 5, 252,714). Polymeren kan være forgrenet eller ikke-forgrenet. Til asyleringsreaksjoner bør valgt(e) polymer(er) ha en enkel reakt-
 10 tiv estergruppe. For reduserende alkylering bør valgt(e) polymer(er) ha en enkel,
 15 reaktiv aldehydgruppe. Vanligvis vil den vannløslige polymeren ikke bli valgt fra naturlig forekommende glykocylrester siden disse vanligvis blir laget enklere ved rekombinante ekspresjonssystemer hos pattedyr.

Metoder for å forberede en PEGylert Sp35 inkluderer vanligvis trinn av (a) reaksjon mellom et Sp35 protein eller polypeptid med polyetylenglykol (slik som en reaktiv
 20 ester eller aldehydderivat av PEG) under betingelser hvor molekylet blir festet til en eller flere PEG-grupper, og (b) oppnår reaksjonsprodukt(er). Vanligvis vil den opti-
 20 male reaksjonsbetingelsen for asyleringsreaksjoner bli bestemt fra tilfelle til tilfelle basert på kjente parametere og ønsket resultat. For eksempel, jo større forhold mellom PEG:protein, dessto større prosent poly-PEGylert produkt.

25 Redusert alkylering for å danne en vesentlig homogen populasjon av mono-polymer/Sp35 inkluderer vanligvis trinn som: (a) reaksjon mellom et Sp35-protein eller polypeptid med et reaktivt PEG-molekyl under reduserende alkyleringsbeting-
 25 elser ved en pH passende til pen-nit selektiv modifikasjon av N-terminalamino-
 25 gruppen på Sp35; og (b) oppnå reaksjonsprodukt(er).

30 For en vesentlig homogen populasjon av mono-polymer/Sp35, er reduserte alkyle-
 30 ringsreaksjonsbetingelser de som tillater selektiv festing av den vannløslige poly-
 30 merenheten til N-terminalen på Sp35. Slike reaksjonsbetingelser fremskaffer van-
 30 ligvis pKa-forskjeller mellom lysin sidekjedeaminogru-
 30 ppene og den N-terminale

aminogruppen. For den foreliggende oppfinnelsens formål, er foretrukket pH i området fra 3-9, fortrinnsvis 3-6.

Sp35 polypeptider kan inkludere en markør, f.eks. en enhet som deretter kan bli fjernet ved proteolyse. Slik kan lysindelen bli selektivt modifisert ved først å reagere med en His-markør, modifisert med en lav molekylvektbinding slik som Trauts reagens (Pierce) som kan reagere med både lysin og N-terminal, og deretter fjerne His-markøren. Polypeptidet vil så inneholde en fri SH-gruppe som kan bli selektivt modifisert med en PEG som inneholder en tiolreaktiv hovedgruppe så som en maleimidgruppe, en vinylsulfongruppe, en haloacetatgruppe eller en fri eller beskyttet SH.

Trauts reagens kan bli erstattet med en hvilken som helst linker som vil danne et spesifikt sted til PEG-festing. For eksempel kan Trauts reagens bli erstattet med SPDP, SMPT, SATA eller SATP (Pierce). På samme måte kan man få proteinet til å reagere med en aminreaktiv linker som setter inn et maleimid (f.eks. SNCC, AMAS, BMPS, MBS, EMCS, SMPB, SMPH, KMUS eller GMBS), en haloacetatgruppe (SBAP, SIA, SIAB), eller en vinylsulfongruppe, og få endeproduktet til å reagere med et PEG som inneholder en fri SH.

I noen former er polyalkylenglykolhalvdelen koblet til en cysteingruppe på Sp35 polypeptidet. Kobling kan effektueres ved bruk av f.eks. en maleimid-gruppe, en vinylsulfongruppe, en haloacetatgruppe eller en tiolgruppe.

Det er valgfritt om Sp35 polypeptidet er konjugert til polyetylenglykoldelen gjennom en labil binding. Den labile bindingen spaltes f.eks. ved biokjemisk hydrolyse, proteolyse eller sulfhydryldeling. For eksempel kan bindingen bli spaltet under *in vivo* (fysiologiske) betingelser.

Reaksjonene kan finne sted ved bruk av enhver passende metode som brukes for å få biologisk aktivt materiale til å reagere med inerte polymerer, fortrinnsvis ved pH ca. 5-8, f.eks. pH 5, 6, 7 eller 8 hvis de reaktive gruppene er på alfa-aminogruppen ved N-terminalen. Vanligvis involverer prosessen forberedelse av en aktivert polymer og deretter en reaksjon mellom proteinet med den aktiverte polymeren for å produsere det løselige proteinet som er egnet for en formulering.

Vektorer

Oppfinnelsen fremskaffer vektorer som består av nukleinsyrene som koder for Sp35 polypeptider. Valg av vektor og ekspresjonskontrollsekvenser som nukleinsyrene i denne oppfinnelsen brukes sammen med, avhenger av de ønskede funksjonelle egenskaper, f.eks. proteinekspresjon og vertsceller som kan transformeres.

Ekspresjonskontrollelementer som er nyttige for å regulere ekspresjonen operativt bundet til en kodesekvens, er kjent i faget. Eksempler inkluderer, men er ikke begrenset til induserbare forsterkerelementer, konstruktive forsterkerelementer, sekresjonssignaler og reguleringselementer. Når en induserbar forsterker blir brukt, kan den bli kontrollert av f.eks. en endring i næringsstatus eller en forandring i temperatur i vertscellemediet.

Vektoren kan inkludere et prokaryotisk replikon, dvs. en DNA-sekvens som har evnen til direkte autonom replisering og vedlikehold av det rekombinante DNA-molekyl ekstrakromosomt i en bakteriell vertscelle. Slike replikoner er kjente i faget. I tillegg kan vektorer som inkluderer et prokaryotisk replikon også inkludere et gen hvis ekspresjon danner en påviselig markør så som medikamentresistens. Eksempler på bakterielle medikamentresistens gener er de som gir resistens mot ampicillin eller tetracyklin.

Vektorer som inkluderer et prokaryotisk replikon kan også inkludere en prokaryotisk eller bakteriofag forsterker for direkte uttrykk av de kodende gensekvensene i en bakteriell vertscelle. Forsterkersekvenser forenlig med bakterielle verter er typisk fremskaffet i plasmidvektorer som inneholder et egnet restriksjonssted for å sette inn et DNA-segment som skal uttrykkes. Eksempler på slike plasmidvektorer er pUC8, pUC9, pBR322 og pBR329 (Bio-Rad), pPL og pKK223 (Pharmacia). Enhver passende prokaryotisk vert kan bli brukt for å uttrykke et rekombinant DNA-molekyl som koder for et av oppfinnelsens proteiner.

Eukaryotiske celleekspresjonsvektorer er kjent i faget og er kommersielt tilgjengelige. Typisk inneholder slike vektorer egnede restriksjonssteder til innsetting av det ønskede DNA-segmentet. Egnede vektorer inkluderer pSVL og pKSV-10 (Pharmacia), pBPV-1, pMI2d (International Biotechnologies), pTDT1 (ATCC 31255), retroviral ekspresjonsvektor pMIG, adenovirus shuttle vektor pDC315 og AAV-vektorer.

Eukaryotiske celleekspresjonsvektorer kan inkludere en utvalgbare markør, f.eks. et medikamentresistens-gen. Neomycin fosfotransferase (neo) gen (Southern et al., 1982, J. Mol. Anal. Genet. 1:327-341) er et eksempel på et slikt gen. For å uttrykke antistoff eller antistoff-fragmenter er DNAer som koder for partiell eller full lengde lette eller tunge kjeder satt inn i ekspresjonsvektorer slik som plasmider, retrovirus, kosmider, YACer, EBV-deriverte episomer og lignende. Ekspresjonsvektoren og ekspresjonskontrollsekvenser er valgt for å være i samsvar med den benyttede ekspresjonsvertscelle. Antistoff lett-kjede-genet og antistoff tung-kjede-genet kan settes inn i separate vektorer. I noen former blir begge gener satt inn i samme ekspresjonsvektor.

En egnet vektor er en som koder for en funksjonell, fullstendig human C_H eller C_L immunoglobulinsekvens. Foretrukket er restriksjonssteder som er konstruert slik at enhver V_H - eller V_L -sekvens lett kan settes inn og uttrykkes. I slike vektorer finner vanligvis spleisingssteder mellom spleisedonorstedet i den innsatte J-regionen og spleise-akseptorstedet som kommer foran den humane C-regionen og også ved spleiseregioner som opptrer innenfor det humane C_H -område. Polyadenylering og overføringsterminering finner sted ved iboende kromosomale steder nedstrøms for koderegionen. Den rekombinante ekspresjonsvektoren kan også kode for et signalpeptid som letter utskillelse av antistoffkjeden fra en vertscelle.

Foretrukne reguleringssekvenser for vertscelleekspresjon hos pattedyr inkluderer viruselementer som dirigerer høye nivåer av proteinekspresjon i pattedyrceller så som fremmere og forsterkere derivert fra retrovirale LTRer, cytomegalovirus (CMV) (slike som CMV fremmer/forsterker), Simian Virus 40 (SV40) (slik som SV40 fremmer/forsterker), adenovirus, f.eks. adenovirus sen hovedfremmer (AdMLP)), polyomer og sterke pattedyrfremmere, slik som medfødt immunoglobulin og aktin-fremmere. For ytterligere beskrivelse av virusreguleringsselementer og sekvenser av disse, se f.eks. Stinski U.S. Pat. No.5,168,062; Bell U.S. Pat. Nr. 4,510,245; og Schaffner U.S. Pat. Nr. 4,968,615. De rekombinante ekspresjonsvektorene kan være sekvenser som regulerer reproduksjon av vektoren i vertsceller (f.eks. reproduksjonsorigo) og utvalgbare markørgener. De utvalgbare markørgenene letter utvalg av vertsceller hvor vektorer har blitt introdusert (se f.eks. Axel U.S. Pat. Nr. 4,399,216; 4,634,665 og 5,179,017). For eksempel er det typisk at det utvalgte markørgenet overfører resistens til medikamenter, slik som G418, hygromycin eller metotrexat på en vertscelle hvor vektoren har blitt introdusert. Foretrukne utvalgte

markørgener inkluderer dihydrofolatreduktase (DHFR) genet (til bruk i dhfr vertsceller med metotrexat seleksjon/forsterkning og neogenet (til G418 seleksjon).

Nukleinsyremolekyler som koder for Sp35 polypeptider og anti-Sp35 antistoff, og vektorer som inneholder disse nukleinsyremolekylene kan brukes til transformasjon av en passende vertscelle. Transformasjon kan forekomme ved enhver passende metode. Metoder til innføring av eksogent DNA i pattedyrceller er godt kjent i faget og inkluderer dextranmediert transfeksjon, kalsiumfosfatfelling, polybren-mediert transfeksjon, protoplast fusjon, electroporasjon, innkapsling av polynukleotid(er) i liposomer og direkte mikroinjeksjon av DNA i kjerner. I tillegg kan nukleinsyremolekyler bli introdusert i pattedyrceller ved virusvektorer.

Transformasjon av vertsceller kan oppnås ved konvensjonelle metoder som passer til den benyttede vektore og vertscelle. For transformasjon av prokaryotiske vertsceller, kan electroporasjon og saltbehandlingsmetoder bli brukt (Cohen et al., 1972, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2110-2114). For transformasjon av ryggvirvelceller, kan electroporasjon, kationisk lipid eller saltbehandlingsmetoder brukes. Se f.eks. Graham et al., 1973, Virology 52:456-467; Wigler et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:1373-1376f.

Pattedyrcellelinjer som er tilgjengelige som verter for ekspresjon, er kjent i faget og inkluderer mange udødelige cellelinjer som er tilgjengelig fra American Type Culture Collection (ATCC). Disse inkluderer *inter alia* kinesisk hamster eggstokk (CHO) celler, NSO, SP2, He, La celler, babyhamster nyre (BHK), apenyre celler (COS), humane lever karcinom celler (dvs. HeP G2), A549 celler og flere andre cellelinjer.

Ekspresjon av polypeptider fra produksjonscellelinjer kan forsterkes ved å bruke kjente teknikker. For eksempel blir glutaminsyntetase (GS)-systemet vanligvis brukt for å forsterke ekspresjon under visse betingelser, se, f.eks. European Patent Nr. 0216846, 0256055, og 0323997 og European Patentsøknad Nr. 89303964.4.

Vertsceller

Vertsceller kan være prokaryotiske eller eukaryotiske. Foretrukne eukaryotiske vertsceller inkluderer, men er ikke begrenset til, gjær og pattedyrceller, f.eks. kinesisk hamster eggstokk (CHO) celler (STCC aksesjonsnr. CCL61), NIH sveitsisk musembryoceller NIH-3T3 (ATCC aksesjonsnr. CRL1658), og baby hamster nyreceller (BHK). Andre brukbare eukaryotiske vertsceller inkluderer insektsceller og plante-

celler. Egnede prokaryotiske vertsceller er E.coli og streptomyces-arter. Sammen-
 setninger som inneholder Sp35 polypeptider, anti-Sp35 antistoff eller antigenbin-
 dende fragmenter av anti-Sp35 antistoff, kan inneholde egnede farmasøytisk ak-
 5 septable bærere. For eksempel kan de inneholde tilsetninger og/eller hjelpeutstyr
 som gjør det enklere å behandle de aktive forbindelser i preparater som er laget for
 levering til virkningsstedet. Passende formuleringer til parenteral administrering
 inneholder vannholdige løsninger av den aktive forbindelsen i vannløselig form,
 f.eks. vannløselige salter. I tillegg kan suspensjoner av de aktive forbindelsene av
 10 passende oljeinjeksjonssuspensjoner administreres. Passende lipofile løsemidler
 eller bindemidler inkluderer fete oljer, f.eks. sesamolje eller syntetiske fettsyreeste-
 re, f.eks. etyloleat eller triglycerider. Vannholdige injeksjonssuspensjoner som kan
 inneholde substanser som øker suspensjonens viskositet, inkluderer f.eks. natrium,
 karboksy metyl, cellulose, sorbitol og dextran. Valgfritt kan suspensjonen også in-
 15 neholde stabilisatorer. Liposomer kan også brukes for å innkapsle oppfinnelsens
 molekyler for levering inn i celler eller interstitielle rom. Egnede farmasøytisk ak-
 septable bærere er fysiologisk samsvarende løsemidler, dispersjonsmedia, belegg,
 antibakterielle og antisoppmidler, isotonisk og absorpsjonsforsinkende midler,
 vann, saltvann, fosfatbufret saltvann, dekstrose, glyserol, etanol o.l. I noen former
 inneholder blandingen isotoniske midler, f.eks. sukker, polyalkoholer slike som ma-
 20 nitol, sorbitol og natriumklorid. I noen former inneholder blandingene farmasøytisk
 akseptable substanser som fuktende eller minimale mengder hjelpestoff så som
 fuktende eller emulgeringsmidler, konserveringsmidler eller buffere, som øker hold-
 barhetstiden eller de aktive ingrediensenes effektivitet.

Oppfinnelsens blandinger kan være i forskjellige former inkludert f.eks. væske
 25 (f.eks. løsninger som kan injiseres og infunderbare løsninger), dispersjon, suspen-
 sjon, halvfast og faste doseringsformer. Den foretrukne formen avhenger av ad-
 ministrasjonsmåten og den terapeutiske anvendelse.

Blanding kan formuleres som en løsning, en mikroemulsjon, dispersjon, liposom
 eller andre ordnede strukturer som er egnet til å øke medikamentkonsentrasjonen.
 30 Sterile løsninger som kan injiseres, kan lages ved å inkorporere den aktive ingredi-
 ensen i den nødvendige mengde i et passende løsningsmiddel med en eller en
 kombinasjon av ingredienser opplistet ovenfor, etter behov, etterfulgt av filtrert
 sterilisering. Vanligvis lages dispersjoner ved å inkorporere den aktive ingrediensen
 i et sterilt bindemiddel som inneholder et basisk dispersjonsmedium og de nødven-
 35 dige andre ingredienser fra de som er opplistet ovenfor. I tilfelle av sterile pulvere
 for å lage sterile, injiserbare løsninger er den foretrukne tillagningsmetoden va-

cumtørring og frysetørring som resulterer i et pulver av den aktive ingrediensen pluss enhver ønsket tilleggsingrediens fra en tidligere sterilfiltrert løsning. En løsnings-egnede fluiditet kan beholdes f.eks. ved å bruke belegg som lecitin, når det gjelder dispersjon ved vedlikehold av den nødvendige partikkelstørrelse og ved bruk av overflateaktive stoffer. Forlenget absorpsjon av injiserbare blandinger kan 5 skjje ved å inkludere et middel i blandingen som forlenger absorpsjon, f.eks. monostearatsalter og gelatin.

Den aktive ingrediensen kan formuleres med en formulering eller anordning for kontrollert frigjøring. Eksempler på slike formuleringer og anordninger inkluderer 10 implantater, transdermale plastre og mikroinnkapslet leveringssystem. Bionedbrytbare og biokompatible polymerer kan brukes, f.eks. etylenvinylacetat, polyanhydri-der, polyglycolisk syre, kollagen, polyortoestere og polyaktisk syre. Metoder for å klargjøre slike formuleringer og anordninger er kjente i faget. Se f.eks. Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, 15 Inc., New York, 1978.

Injiserbare depotformuleringer kan lages ved å lage mikroinnkapslede matriser av medikamentet i bionedbrytbare polymerer som polyaktid-polyglykolid. Avhengig av forholdet medikament til polymer og den brukte polymerens egenskap kan medikamentets frigjøringshastighet kontrolleres. Andre anvendbare bionedbrytbare po- 20 lymerer er polyortoestere og polyanhydri-der. Depotinjiserbare formuleringer kan også lages ved å stenge medikamentet inne i liposomer og mikroemulsjoner.

Supplerende aktive bestanddeler kan inkorporeres i blandingene. I noen former blir et Sp35 polypeptid, anti-Sp35 antistoff eller et fragment av dette, koadministrert med et anti-NgR1 antistoff eller et antigenbindende fragment av dette eller løslige 25 NgR1 polypeptider eller NgR1 fusjonsprotein.

Doseringsregimer kan justeres for å fremskaffe den optimalt ønskede respons. For eksempel kan en enkel bolus administreres, flere separate doser kan administreres over tid eller dosen kan reduseres proporsjonalt eller økt som indisert av den terapeutiske situasjonens krav. Det er en fordel å formulere parenterale blandinger i 30 doseenhetsformer for å lette administrering og doseringens uniformitet. Se f.eks. Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., Easton, PA 1980).

I tillegg til den aktive blandingen kan flytende doseringsformer inneholde inerte ingredienser som vann, etylalkohol, etylkarbonat, etylacetat, benzylalkohol, benzyl-

bensoat, propylenglykol, 1,3 butylenglykol, dimetylformamid, oljer, glycerol, tetrahydrofurfuryl alkohol, polyetylen glykol og fettsyreestere av sorbitan.

Genterapi

Et Sp35 polypeptid kan produseres *in vivo* i et pattedyr, f.eks. et menneske, ved å
 5 bruke tilnæringsmåten genterapi ved behandling av en CNS sykdom, forstyrrelse eller skade hvor hemming av aksonal utvekst ville være en terapeutisk fordel. Dette involverer administrering av et passende Sp35 polypeptid som koder for nukleinsyre bundet operativt til passende ekspresjonskontrollsekvenser. Fortrinnsvis er disse sekvensene inkorporert i en virusvektor. Passende virusvektorer til slik genterapi
 10 inkluderer adenovirus-vektorer, lentivirus-vektorer, baculovirus-vektorer, Epstein Barr-virusvektorer, papovavirus-vektorer, vaccinavirus-vektorer, herpes simplexvirus-vektorer og adenoassosierte virus-(AAV) vektorer. Virusvektoren kan være en replikasjonsdefekt virusvektor. En foretrukket adenovirus-vektor har en utelatelse i sitt E1 gen eller E3 gen. Når en adenovirus-vektor benyttes, er pattedyret
 15 fortrinnsvis ikke utsatt for en nukleinsyre som koder for et valgbart markørgen.

Eksempler

Oppfinnelsen belyses videre gjennom følgende forsøkseksempler. Eksemplene er fremskaffet kun som illustrasjon.

Eksempel 1: Sp35 ekspresjonsmønster

20 Sp35s ekspresjon i menneskelig vev ble evaluert ved Northern blot-analyse. Multiple vevsblotter som inneholder 12 humane hovedvev eller 14 humane CNS-vev ble hybridisert over natten ved 68°C med P³²-merket Sp35 probe (nukleotider 150 – 450 av Sp35 cDNA-sekvens). Blottene ble vasket 3 ganger med 2x SSC, 0,5 % SDS, deretter 3 ganger med 0,5x SSC, 0,1 % SDS. Blotten ble deretter utsatt for
 25 røntgenfilm og mRNA-nivåene visualisert ved autoradiografi.

Sp35 blir sterkt uttrykt i den menneskelige hjerne men ikke i hjerte, skjelettmuskulatur, tykktarm, tymus, milt, nyre, lever, tynntarm, placenta, lunge og perifere blodleukocytter. Sp35 ble uttrykt i alle hjernevev som ble festet inkludert vev isolert fra frontal cortex og posterior cortex, entorhinal cortex, hippocampus, lukt
 30 bulb, striatum, talamus, cerebellum, midthjerne, pons, medulla og ryggmargen. En

gradient av gen uttrykk langs den rostrale/cordale akse ble observert for Sp35 med det høyeste nivået i den corticale bark og det laveste nivået i ryggmargen.

5 Immunohistokjemisk (IHC) farging ble brukt for å bestemme om Sp35 blir uttrykt i spesifikke hjerneceller. 4 % paraformaldehyd-fikserte rottehjerner, ryggmargssnitt eller primære, granulære nevronkulturer ble inkubert med primære antistoff til Sp35, som vist, etterfulgt av sekundære antistoff konjugert til Alexa 480 eller 590 (Molecular Probes Inc). Snittene ble montert i Vectashield og visualisert ved fluorescensmikroskopi. Spesifikke anti-Sp35 antistoff brukt til IHC ble generert fra en Fab-fag utstillingsbibliotek som bruker MorPhosys-teknologi.

10 Sp35 blir uttrykt spesifikt i nevroner og oligodendrocytter, men ikke i astrocytter. Dette ble bestemt i forsøk hvor rottehjernevevs-snitt ble farget med forskjellige stoffer, inkludert antiastrocytt-markør GFAP, et antistoff til en oligodendrocytt-markør (O4) og et antistoff til den nevronale β III-tubulin-markør, all motfarging med et anti-Sp35 antistoff. Oligodendrocytter og nevroner ble intenst farget med
15 anti-Sp35 antistoff. Ingen farging av astrocytter ble observert.

Som en uavhengig bekreftelse på ekspresjonsmønsteret til Sp35, utførte vi semikvantitativt RT-PCR ved bruk av mRNA ekstrahert (Ambion kit) fra primære rottecellekulturer av rensede astrocytter, oligodendrocytter og granulære nevroner fra cerebellum. Forover primer AAGGCCAGCAGGTGTTTGTGGA (SEQ ID NO:14) og
20 revers primer TACTCGATCTCGATGTTGTGCTTT (SEQ ID NO: 15) ble brukt. Etter 26 sykluser ble et sterkt bånd observert i mRNA fra nevroner, et distinkt men svakere signal ble oppdaget i oligodendrocytt mRNA og ikke noe bånd ble observert i astrocytter.

Eksempel 2: Sp35-Fc fusjonsprotein

25 For å studere den biologiske funksjonen til Sp35 ble det laget en konstruksjon hvor man blandet en ekstracellulær posjon human Sp35 (rest 1-531) til hengeleiet og Fc-regionen i humant IgG1. En partiell kodesekvens for humant Sp35 ble oppnådd ved PCR fra klonen 227,2 (Incyte) ved bruk av forover-primer
5'CAGCAGGTCGACGCGGCCGCATGCTGGCGGGGGCGT3' (SEQ ID NO: 16) og re-
30 vers primer 5'CAGCAGGTCGACCTCGCCCGGCTGGTTGG3' (SEQ ID NO: 17).

Det butte PCR sluttproduktet ble subklonet inn i Srf1-stedet på PCR SCRIPT AMP vektor (Stratagene) for å danne PCR SCRIPT AMP-sp35. Et SaII-fragment ble isolert

fra PCR SCRIPT AMP-sp35 og subklonet inn i PCRCAMP Ig vektor (derivat av Strategene vektor PCR SCRIPT AMP hvori Fc gamma sekvens er subklonet som en SaII(5') til NotI(3') fragment, og sammensmelter Sp35 signalsekvens og ektodomensekvens (kodon 1-531) i system med sekvenser som koder for hengselet og Fc-regionen i humant Ig1. Korrekte isolater ble identifisert og et NotI-fragment omfattende Sp35 Fc-fragmentet ble subklonet i det enkle NotI kloningsstedet på 293E uttrykksvektor, CH274 og et derivat av kommersiell uttrykksvektor REP4 (Invitrogen). Sp-35 Fc-fusjonen som er kodet av den nye vektoren CH274/Sp35 Fc, ble bekreftet av DNA-sekvensering som plasmid GT123.

Stabile cellelinjer som uttrykker Sp35 Fc-fusjonsproteiner ble generert ved elektroporasjon av CHO vertsceller DG44 med plasmid GT123. Transfekterte CHO-celler ble dyrket i alfa minus MEM i nærvær av 10 % dialysert serum og 4mM glutamin, for å velge nukleocid uavhengig vekst. Fjorten dager etter transfeksjonen ble cellene tilsatt nytt medium. For å screene for celler som uttrykker Sp35-Fc ble CHO-celler merket med Phycoerythrin (PH)-merket antihumant IgG fra geit (Jackson Labs) og utsatt for høyhastighets flow cytometri sortert i en FACS MoFlo (Cytomation). Cellene som uttrykte det høyeste nivå av Sp35-Ig ble valgt. Disse cellene ble utvidet i en kultur i 7 dager, deretter merket og sortert igjen. Celler som uttrykker det høyeste nivå av Sp35 Ig, ble isolert som individuelle kloner i 96-brønnsplater. Disse klonene ble dyrket i to uker og så tilført nytt medium en dag før FACS-analyse for å sjekke for ekspresjonsnivåer. Kloner som uttrykte de høyeste nivåer av Sp35-Fc ble utvidet og frossede cellebanker ble etablert. Cellelinjene ble tilpasset vekst i suspensjonskultur i serumfritt medium BCM16. Titere av Sp35-Fc produsert av disse klonene ble bestemt ved voksende cellelinjer ved 37°C i 4-5 omganger, deretter ble cellene dyrket til 50 % av maksimal celletetthet og dyrket i 10-15 dager ved 28°C inntil levedyktig celletetthet sank til 75%. På dette tidspunktet ble kulturmediet høstet, rensset for celler og avfall ved sentrifugering og kultursupernatantene ble titrert for Sp35-Fc-nivåer ved Western blot-analyse ved bruk av antihumant Ig antistoff (Jackson Lab) som proben.

Sp35-Fc fusjonsprotein ble rensset fra det klarede kulturmediet som følger: 9 ml av 1M HEPES pH 7,5 ble tilsatt 900 ml kondisjonert medium. Mediet ble batch-ladet i 3 timer ved 4 °C i 3 ml Protein A Sepharose (Pharmacia). Resinet ble samlet i en 1,5 cm (I.D) søyle og vasket fire ganger med 3 ml PBS, to ganger med 4 ml PBS som inneholder 800 mM NaCl, og deretter igjen med 3 ml PBS. Sp35-Fc ble vasket ut av søylen med 25 mM NaH₂PO₄ pH 2,8, 100 mM NaCl i 1,5 ml fraksjoner og nøytralisert ved å tilsette 75 µl 0,5 M NaH₂PO₄ pH 8,6. Proteininnholdende topp-fraksjoner

ble identifisert ved opptak ved 280 nm, slått sammen og utsatt for videre rensing i en 1 ml protein A-søyle. Før lastning ble NaCl tilsatt 600 mM og HEPES pH 7,5 til 50 mM. Søylene ble vasket to ganger med 600 µl 10mM HEPES pH 7,5, 1 M NaCl og deretter med 1 ml PBS. Sp-35-Fc ble vasket ut fra søylen med 25 mM NaH₂PO₄ pH 2,8, 100 mM NaCl, innsamling av 0,5 ml fraksjoner og nøytralisert ved å tilsette 25 µl av 0,5 M NaH₂PO₄ pH 8,6. Proteininnholdende topp-fraksjoner ble identifisert ved opptak ved 280 nm og samlet. I reduserende SDS-PAGE migrerte Sp-35-Ig som et enkelt bånd (>95 % rent) med en observert masse på 90 kDa. Under ikke-reducerende betingelser løp proteinet som en dimer med en omtrentlig masse på 180 kDa. Det rensede Sp35-Fc ble delt opp og lagret ved -70 °C. NotI-fragmentet av GT123, som inneholder Sp35 aminosyre 1-531 og humant IgG1 Fc, ble subklonet i PV90-vektorens NotI-sete for å danne DB002.

Eksempel 3: His-AP-Sp35 fusjonsprotein

For å studere og isolere reseptoren for Sp35 ble proteinet uttrykt i COS7 og CHO-celler som et His-merket alkalisk fosfatase (His-AP) fusjonsprotein. Plasmidet ble konstruert som følger: Det ekstracellulære området av Sp35 (a.a.34-532) ble PCR amplifisert ved bruk av primere (forover) 5'-
 AATTAAGAATTCACGGGCTGCCCGCCCCGCTGCGAGT-3' (SEQ ID NO: 18) som inneholder et Eco R1 restriksjonssete (understreket), og (revers) 5'-
 TATATTCTAGATCACTCGCCCGGCTGGTTGGAGATGAAAGCGA-3' (SEQ ID NO: 19), som inneholder Xba I delingssted (understreket). PCR-produktet ble delt med Xba I, den resulterende klebrige ende ble utfylt med T4 DNA polymerase, deretter spaltet med Eco RI og gelrenset. Det spaltede produktet ble ligert til et Hind III-ifylt/EcoR I His-AP fragment fra His-AP-pcDNA 1,1 vektor (Invitrogen). His-AP-Sp35-fragmentet ble spaltet med Hind III og Eco RI, fylt inn og deretter ligert i et Not I-fylt sted på vektor pV90. DNA-sekvensen på det innsatte ble bekreftet ved DNA-sekvensering.

COS7-celler ble splittet dagen før transfeksjon. His-AP-Sp35-vektor DNA (8 µg) ble brukt for å transfektere 5×10^6 celler ved bruk av lipofektamin (Invitrogen). Det betingede mediet ble høstet 48 timer etter transfeksjonen.

Det ble utviklet en CHO cellelinje som uttrykker His-AP-Sp35 fusjonsprotein ved bruk av pV90 plasmidet. CHO vertsceller DG44 (2×10^6 celler) ble transfektert med 100 µg plasmid ved elektroporasjon. Celler ble dyrket i alfa minus MEM i nærvær av 10 % dialysert serum og 4 mM glutamin for å utvelge nukleosid-uavhengig vekst.

14 dager etter transfeksjon ble cellene tilsatt nytt medium i påvente av screening ved FACS Mo-Flo (Cytomation) sortering. Transfektete CHO-celler ble merket med musemonoklonalt antistoff 8B6 rettet mot human placenta alkalisk fosfatase (Sigma). Et sekundært antistoff, PE-merket anti-mus IgG fra geit ble brukt for å produsere et signal spesifikt for transfektete celler. Etter PE-merking ble cellene utsatt for høyhastighets flow cytometri-sortering og de øverste 5 % valgt ut.

For å produsere kondisjonert medium med His-AP-Sp35, ble cellene som uttrykte det høyeste nivå av His-AP-Sp35, valgt ut. Cellelinjene ble tilpasset vekst i suspensjonskultur i serumfritt medium (BCM16). Titere til His-AP-Sp35 som ble produsert av disse klonene, ble bestemt ved vekst av cellelinjer ved 37 °C i 4-5 omganger, deretter ble cellene dyrket til 50 % av maksimal celletetthet og dyrket i 10-15 dager ved 28 °C inntil den levedyktige celletettheten falt til 75 %. Dyrkningsmediet ble høstet, klarert for celler og avfall ved sentrifugering og kultursupernatantene titrert for His-AP-Sp35-nivåer med Western blot-analyse ved bruk av anti-humant AP-antistoff (Jackson Labs) som proben.

His-AP-Sp35 ble rensset fra det betingede mediet som følger: 400 ml betinget medium fra CHO-celler som uttrykker His-AP-Sp35, ble fortynnet med 400 ml vann. Trietanolamin pH 8,5 ble tilsatt til 25 mM fra en 0,5 M beholdning og prøven ble batchpakket i 2 timer ved 4°C i 6 ml Fractogel TMAE (EM Industries) anionbytte resin. Resinet ble samlet i en 1,5 cm (I.D.) søyle og vasket to ganger med 6 ml 10 mM HEPES pH 7,5, 50 mM NaCl. Ap-Sp35 ble vasket ut av søylen med 10 mM HEPES pH 7,5, 200 mM NaCl i 2 ml fraksjoner. Toppfraksjoner ble identifisert ved å overvåke AP-aktivitet og ved SDS-PAGE. Gjennomstrømningsfraksjonen fra TMAE-søylen ble videre fortynnet med 300 ml vann og pakket i batcher natten over ved 4 °C i 6 ml TMAE-resin. Resinet ble samlet og vasket som beskrevet ovenfor og vasket ut med 10 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl. Toppfraksjoner ble igjen identifisert ved overvåking av AP-aktivitet og ved SDS-PAGE. His-AP-Sp35 fra den første søylen var 50 % ren og AP-Sp35 fra den andre søylen var 90 % ren. Under reduserende betingelser migrerte His-AP-Sp35 på SDS-PAGE-geler med en tydelig masse på 130 kDa. Mens det 90 % rene materialet var passende til de fleste undersøkelser, ble His-AP-Sp35 rensset på Ni-NTA agarose resin (Qiagen) for andre studier. NaCl ble tilsatt til de utvaskede fraksjoner fra TMAE-søylen til 800 mM og 0,5 M trietanolamin pH 8,5 og 1 M imidazol pH 7,0 ble tilsatt henholdsvis til 25 mM og 15 mM. 4,5 ml av prøven ble pakket i en 400 µl NiNTA søyle. Søylen ble vasket tre ganger med 25 mM trietanolamin pH 8,5, 800 mM NaCl, 15 mM imidazol og His-AP-Sp35 ble vasket ut av søylen med 200 mM imidazol pH 7,0, 350 mM NaCl, hvoret-

ter 200 µl fraksjoner ble samlet opp. AP-inneholdende topp fraksjoner ble samlet og dialysert natten over mot 250 volumer av 10 mM HEPES pH 7,5, 200 mM NaCl. MgCl₂ og ZnCl₂ ble tilsatt til det som var igjen til henholdsvis 2 og 0,25 mM. Sluttproduktet var renere enn 95 % ved SDS-PAGE og løp som et enkelt bånd med masse på ca. 140 kDa under reduserende betingelser.

Sp35-konstruksjoner ble også laget som Fc-blandinger. En Sp35LRR-Fc konstruksjon ble laget ved PCR ved bruk av primere (forover)
 5'CTTGACACGGGATCCGCGGCCGCATGCTGGCGGGGGGCGTGAGG3' (SEQ ID NO: 20)
 og (tilbake) 5'GCAGCGGGGCGGGCAGCCCGTGGCCGAGCCTGACAGCACTGAGCC3'
 (SEQ ID NO: 21). PCR-produktet ble satt inn i Not1-stedet på PV90 vektoren. Sp35
 IG-Fc-konstruksjon ble laget ved PCR ved bruk av primere (forover)
 5'CTTGACACGGGATCCGCGGCCGCATGCTGGCGGGGGGCGTGAGG3' (SEQ ID NO: 22)
 og (tilbake) 5'GTCCCGGATGCGGGCGCGGGCCGAGCCTGACAGCACTGAGCCCAG3'
 (SEQ ID NO: 23). PCR-produktet ble satt inn i Not1-stedet på PV90-vektor. Protei-
 ner ble uttrykt i CHO-celler og renses ved bruk av protein A sepharose-søyle.

Eksempel 4: Sp35 binding til NgR1-uttrykkende celler

Fire forskjellige metoder ble brukt for å vise Sp35-binding til NgR1. Først ble det oppdaget interaksjonen i en direkte bindingsanalyse hvor alkalisk fosfatase Sp35-konjugat (AP-Sp35) ble inkubert med NgR1-uttrykkende celler og bindingen ble bedømt ved bruk av en kromogen AP påvisningsreagens. 90 % konfluente COS7-celler ble dyrket på 100 mm vevskulturskåler og transfektert med NgR1-uttrykkende plasmider ved bruk av Fugene 6-reagenser (Roche). Etter 48 timer ble de transfekterte cellene vasket en gang med HBH (Hank's balanced salt buffer), 1 mg/ml BSA, 20 mM HEPES, pH 7,0, og deretter inkubert i 1,5 time ved 23°C med 4 µg/ml AP-Sp35 fusjonsprotein i HBH. Cellene ble vasket med iskald HBH-buffer tre ganger i tre minutter hver, deretter fiksert med 3,7 % formaldehyd i 20 mM HEPES, pH 7,0, 150 mM NaCl i 15 minutter og overført tilbake til HBH-bufferen. Endogen, varmelabil AP ble varmeinaktivert i 2 timer ved 67 °C. Bundet AP-Sp35 ble oppdaget ved inkubering med nitroblå tetrazolium NBT (Roche). Ap-Sp35 bandt seg til COS7-celler som uttrykker human NgR1-reseptor, men ikke til COS7-kontrollcellene som er transfektert med vektorene alene. Et punktfarget mønster for NgR1 ble observert, hvilket viser at bare en fraksjon, sannsynligvis 50 % av cellene, var transfektert med NgR1.

For å kunne kvantifisere bindingen bedre ble det samme forsøket utført, men parallelle celleprøver ble behandlet med 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,125, 0,06 µg/ml av Ap-Sp35. Bundet AP ble inkubert med 4 nitrofenylfosfat og AP-aktivitet bedømt i en 96-brønnsplateleser (Molecular Devices). Fra disse data estimerte vi at EC50 til binding av AP-Sp35 til humant NgR1 var ca. 6 nM.

For det andre oppdaget vi binding av Sp35 med NgR1 i en ELISA-metode. ELISA-plater (Costar) ble belagt med 10 µg/ml løslige NgR1-Fc-reseptorer (sNgR310-Fc som inneholder rotte-NgR1 peptid 35-310 bundet til hengslet og rotte-IgG1 Fc og sNgR344-Fc inneholdende rotte-NgR1 peptid 35-344 bundet til rotte-IgG1) i 0,01 M NaHCO₃, pH 9,0 i en time ved 37 °C. Platene ble blokkert og vasket med 25 mM HEPES, pH 7,0, 0,1 % BSA, 0,1 % ovalbumin, 0,1 % skummet tørrmelk og 0,001 % NaN₃. AP-Sp35-protein, 4 µg/ml ble tilsatt til platen og inkubert natten over ved 4 °C. Platene ble deretter vasket med 10 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl og bundet AP påvist ved bruk av 10 µg/ml kromogent substrat 4-nitrofenyl fosfat fortynt i 0,1 M glysin, 1 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂ pH 10,5. OD₄₁₀ ble bestemt i en ELISA-leser (Molecular Devices) utstyrt med Softmax-program. AP-Sp35 bandt seg til immobilisert sNgR-344-Fc, men ikke til sNgR-310-Fc protein, noe som indikerer at den lange versjonen av NgR1 var påkrevet for Sp35-binding. Det var mulig å konkurrere bindingen av AP-Sp35 til sNgR344-Fc med 80 % ved preinkubering av AP-Sp35 med 100-ganger overskudd av sNgR344-Fc. Ingen konkurrerende binding ble sett ved bruk av pinnsvin-rotte Ig1 fusjonsprotein som et rotte-Ig fusjonskontrollprotein.

For det tredje påviste vi binding av Sp35 til NgR1 ved coimmunoutfellingss-
Sp35 med NgR1. I denne studien ble 80 % konfluente COS7-celler dyrket på 100 mm vevskulturskåler transfektert med plasmider som koder for Sp35 hemagglutinin (Sp35-HA) og NgR-FLAG ved bruk av Fugene 6 reagenser (Roche). 48 timer etter transfeksjon ble celler høstet og løst i en 1 ml lysisbuffer (50 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 % Triton X-100 og 10 % glyserol) ved 4 °C i 30 min. Lysatet ble deretter sentrifugert ved 14.000 x g i 15 min. og supernatantene innsamlet og inkubert ved 4 °C natten over med risting ved å bruke anti-HA affinitetsmatrix (Roche). Prøvene ble vasket 3 ganger med 1 ml lysis buffer, deretter kokt i 3 min. i Laemmli prøvebuffer, utsatt for 4-15 % SDS-PAGE og analysert ved immunoblotting med Anti-FLAG M2 antistoff (Sigma). Anti-HA-merket affinitetsresin bandt et kompleks som inneholder både Sp35-HA og FLAG-NgR. Dette er åpenbart ved nærvær av FLAG. Dette komplekset ble ikke sett i lysater fra kontrollert transfeksjoner hvor cellene ble behandlet med Sp35-HA-plasmid eller FLAG-

NgR1-plasmid alene eller celler som ble cotransfektet med FLAG-NgR1 og et HA-merket kontrollprotein som ikke binder NgR1.

Sp35-HA ble laget som følger. Sp35 signalsekvensen og ekstracellulært område (aminosyrer 1-531) ble PCR-utvidet ved bruk av primere

5 5'ATATTCTAGAATGCTGGCGGGGGCGTGAG3' (SEQ ID NO: 24) og

5'ATATACTAGTGTGCGTTGCCGCCCGCGTTGG3' (SEQ ID NO: 25) som inneholder XbaI og SpeI-setet (understreket). PCR-produktet ble spaltet med XbaI og SpeI og satt inn i vektor pCGCHA mellom XbaI og SpeI-setene. Sekvensen av det innsatte ble bekreftet ved DNA-sekvensering. FLAG NgR1-konstruksjonen var en presang fra Dr. Zhigang He (Nature, Vol. 420, Nov. 7, 2002).

For det fjerde viste vi at AP-Sp35 blir bundet til rotte cerebellum granulære nevroner (CGN) som uttrykker NgR1. I dette forsøket ble 90 % konfluente postnatal dag 8 CGN-celler dyrket på 100 mm vevskulturskåler. Etter 48 timer ble cellene vasket en gang med HBH-buffer og deretter inkubert med 4 µg/ml AP-Sp35 i HBH-buffer i 1,5 time ved 23 °C. Cellene ble deretter vasket med iskaldt HBH tre ganger i 3 min. hver, deretter fiksert med 3,7 % formaldehyd i 20 mM HEPES, pH 7,0 og 150 mM NaCl i 15 min. og ført tilbake til HBH. Endogent varmelabilt AP ble varmeinaktivert i 2 timer ved 67 °C. Bundet AP-Sp35 ble påvist ved inkubering med nitroblå tetrazolium NBT (Roche). AP-Sp35 ble bundet til postnatal 8 cerebellum granulære nevroner, som uttrykker NgR1. Bindingen av AP-Sp35 til nevroner ble hemmet ved å behandle CGN med PIPLC (5 enhet/ml) som spalter de fleste GPI-forankrede proteiner fra membranoverflater. Siden NgR1 er et GPI-linket protein støtter dette videre forestillingen om at Sp35 binder seg til NgR1 på CGN-celler.

Eksempel 5: Co-lokalisering av Sp35 med NgR1

For å bestemme om Sp35 og NgR1 blir uttrykt i samme nevroner ble en co-lokaliseringstudie utført. 4 % paraformaldehydfiksert rotte p8 primære granulære nevronkulturer ble inkubert med antistoff mot Sp35 og NgR1 (Santa Cruz) og deretter med passende Alexa-merket sekundære antistoff (Molecular Probes Inc.). Cellene ble visualisert ved konfokal fluorescens mikroskopi. Nevroner ble intenst farget med Sp35 og NgR1 antistoff. Begge proteiner ble uttrykt i cellelegemer og aksoner i nevroner. For å hjelpe til med co-lokaliseringanalysen ble forskjellige fargede prober brukt for de 2 typene antistoff. Når fargene (rød for NgR-positive celler og grønn for Sp35-positive celler) ble slått sammen så vi en gul farge gjennom hele cellen som indikerer at de to proteinene var co-lokalisert inni nevronene.

Eksempel 6: NgR1 bindingssteder inni Sp35

Vi brukte utstryknings oversikt for å definere de spesifikke områdene av Sp35 involvert i NgR1-interaksjoner. De følgende utstrykningskonstruksjonene ble laget ved bruk av Stratagene Quikchange Mutagenesis kit. Vi verifiserte alle vektorkonstruksjoner ved DNA-sekvensering av modifiserte innsetninger.

His-AP-Sp35b som inneholder Sp35s leucinrike repetisjonsområder pluss basalregion (a.a. 35-432), ble klonet fra His-AP-Sp35 (a.a. 34-532) vektor ved PCR. Primere brukt var 5'CCCAGCAGGTGTTTGTGGACGAGTGATCTAGGGCCGCGGATCCCTG-3' (SEQ ID NO: 26) og 5'-
 10 CAGGGATCCGCGGCCCTAGATCACTCGTCCACAAACACCTGCTGGG-3' (SEQ ID NO: 27). His-AP-Sp35d som koder Ig-området på Sp35 pluss basalregionen (a.a. 417-531), ble klonet fra His-AP-Sp35a (a.a. 37-531) vektor med PCR. Primere brukt var 5'CGCCGCGCACCCGGGTGAATTCGCGCCCGCATCCGGGACCGC-3' (SEQ ID NO: 28) og 5'-GCGGTCCCGGATGCGGGCGCGGAATTCACCCGGGTGCGCGGCG-3' (SEQ ID NO: 15 29).

His-AP-Sp35e som koder bare for Ig-området (a.a. 425-531), ble klonet fra His-AP-Sp35 (a.a. 34-532) vektor med PCR. Primere brukt var 5'-
 CGCCGCGCACCCGGGTGAATTCGCCAGCAGGTGTTTGTGGAC-3' (SEQ ID NO: 30) og 5'-GTCCACAAACACCTGCTGGGCGAATTCACCCGGGTGCGCGGCG-3' (SEQ ID NO: 31).
 20 Et kommersielt mutagenesekit og protokoll (Stratagene Quikchange) ble brukt for å mutere aminosyre 456 (fra arginin til glutaminsyre) og aminosyre 458 (fra histidin til valin) på Sp35 i His-AP-Sp35-vektoren (34-532). Primere brukt var 5'-
 CATCCTCTGGCTCTACCCGAAAAGGTACTGGTCTCAGCCAAGAGC-3' (SEQ ID NO: 32) og 5'-GCTCTTGGCTGAGACCAGTACCTTTTCGGGTGAGAGCCAGAGGATG-3' (SEQ ID
 25 NO: 33).

His-AP-Sp35 delesjonskonstruksjoner (fig. 3) ble skapt i PV90 ekspresjonsvektorer og uttrykt i 293 celler. Det betingede medium ble samlet og AP-adduktene renses ved sekvensiell kromatografi trinn på Fractogel TMAE resin og NiNTA-agarose. De rensede proteinene ble testet med hensyn til binding til NgR1 uttrykt på COS7-
 30 celler. Alle de tre konstruksjonene binder seg svakt til Sp35. Disse resultatene indikerer at både Sp35LRR gjentakelse 1-14 (aminosyre 34-417) og Ig-området på Sp35 (aminosyre 425-531) bidrar til Sp35-binding til NgR1. Ig-området viste høyere affinitet enn LRR-området.

En strukturmodell for Ig-området på Sp35 ble generert ved å bruke NCAM krystallstruktur som rammeverk (Rasmussen et al., 2000, Nat. Struct. Biol. 7:389-393). Fra denne modellen observerte vi en loop (restnummer 454-458, aminosyrer: SPRKH; SEQ ID NR: 34) som kan involveres i bindingen. For å teste denne hypotesen skapte vi en Sp35-konstruksjon hvor rest R ved 456 og H ved 458 ble endret til henholdsvis E og V. Når denne konstruksjonen ble testet for NgR1-binding, ble et >10 ganger fall i signal observert. Som en alternativ tilnærming for å teste bidraget av denne loop-regionen i bindingen ble et peptid som korresponderte til sekvensen LSPRKH (SEQ ID NO: 10) syntetisert og som ble syklisert ved å tilsette cysteiner på N- og C-terminalene på peptidet. Ved binding til NgR1 blokkerer, hemmer eller interfererer dette peptidet med NgR1-funksjonen.

Eksempel 7: Sp35 induserer p8 CGN muskelsammentrekning

For å bestemme den biologiske funksjonen til Sp35-nevroner inkuberte vi Sp35-Fc med postnatale dag 8 granulære nevroner for å se om Sp35 kan regulere nevruttvekst. Laktek kulturslides (8 brønner) ble belagt med 0,1 mg/ml poly-de-glysin (Sigma) før spotting av Sp35-Fc-protein (16 µg/brønnprotein). Slidesene ble tørket over natten, deretter renses og belagt med 10 µg/ml laminin (Gibco). Cerebellum granulære nevroner fra postnatal dag 8 ble adskilt og sådd ut på forhåndsbelagte slides. Slideskulturene ble inkubert ved 37 °C i 5 % CO₂ i 24 timer. Slidesene ble deretter fiksert i 4 % paraformaldehyd inneholdende 20 % sukrose og farget med anti βIII tubulin (Covance TUJ1). Etter 24 timer viste CGN klar muskelsammentrekningsmorfologi som var åpenbar ved bunting av nevroner. Muskelsammentrekning ble ikke sett i ubehandlede celler eller Fc-proteinbelagte kontrollprøver.

Eksempel 8: Effekten av Sp35 og RhoA-aktivering/inaktivering

Sp35-Fc induserte postnatale cerebellum granulære nevroner i å gjennomgå fasciculasjon. Fordi signalmolekylet RhoA er kjent for å være involvert i fasciculasjon bestemte vi om Sp35-Fc kan regulere RhoA funksjoner i nevroner. RhoA-aktiveringsforsøket ble utført som følger: 293-celler eller COS7-celler ble transfektert med ekspresjonsvektorer som inneholder kombinasjoner av RhoA, Sp35 eller NgR1 ved å bruke Fugene 6-reagenser (Roche). 48 timer etter transfeksjon ble cellene sultet over natten, deretter løst i 50 mM Tris, pH 7,5, 1 % Triton X-100, 0,5 % natriumdeoksykolat, 0,1 % SDS, 500 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, pluss en proteasehemmende blanding. Cellelysater ble klarert ved sentrifugering ved 13.000xg ved 4°C i 5 min. og 95 % av supernatantene ble inkubert med 20 µg av en immobilisert

GST-Rho-bindende områdeaffinitetsmatriks (Rhotekin kuler, Upstate Biotechnology) ved 4 °C i 45 min. Kulene ble vasket tre ganger med vaskebuffer (50 mM Tris, pH 7,5, 1 % Triton X-100, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ med proteasehemmere). GTP-bundet Rho ble vasket ut fra kulene ved oppvarming til 95°C i 5 min. i SDS-PAGE forsøksbuffer. Bundne og totale Rho-proteiner ble påvist ved Western blotting ved bruk av et monoklonalt antistoff mot RhoA (Santa Cruz). COS7 og HEK293-celler transfektert med Sp35, induserte RhoA-aktivering ved en åpenbar økning i mengden av RhoA-GTP påvist i blottet etter transfeksjon med Sp35-genet. En videre forsterkning i RhoA-GTP ble observert etter behandling med Sp35-Fc. I motsetning til økning i RhoA-GTP etter transfeksjon med Sp35 alene ble RhoA delvis inaktivert når cellene ble transfektert med Sp35 og NgR1. Behandling av disse cellene med Sp35-Fc resulterte i videre inaktivering av RhoA.

En signalrespons ved Sp35 ble bekreftet ved bruk av FLIPR-analyse (Molecular Devices) for å bestemme påvirkningen av Sp35-behandlingen på Ca⁺⁺ fluks. En signifikant Ca⁺⁺ fluks ble observert i celler som uttrykker Sp35 med behandling av Sp35-Fc, men ikke i kontrollceller behandlet med Sp35-Fc. Ca⁺⁺ fluks ble redusert når cellene som var blitt cotransfektet med NgR1 og Sp35, ble behandlet med Sp35-Fc-fusjonsprotein.

Eksempel 9: Sp35 proteininteraksjon med seg selv

Fordi LRR-området ofte er involvert i homotypiske interkasjoner og fordi vi observerte at tillegg av løslig Sp35 til Sp35-transfektete celler forårsaket en økning i RhoA-GTP over det som ble observert med Sp35-transfeksjoner alene, testet vi Sp35-binding til seg selv. For å utføre dette forsøket brukte vi co-immunoutfelling. 80 % konfluente COS7-celler dyrket på 100 mm vevskulturskåler ble transfektert med plasmidene Sp35 HA eller Sp35-FLAG, eller begge, ved å bruke Fugene 6 reagenser (Roche). 48 timer etter transfeksjon ble cellene høstet og løst i 1 ml lysisbuffer (50 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 1 % Triton X-100 og 10 % glyserol) ved 4 °C i 30 min. Lysatet ble deretter sentrifugert ved 14.000xg i 15 min. og supernatantene samlet inn og inkubert ved 4 °C over natten med risting med en anti-HA affinitetsmatriks (Roche). Prøvene ble deretter vasket 3 ganger i 1 ml lysisbuffer, kokt i Laemmli prøvebuffer, utsatt for 4-15 % SDS-PAGE og analysert ved immunoblotting med anti-FLAG antistoff. Anti-HA antistoffresinet bandt kompleks som inneholdt Sp35-FLAG bestemt ved Western blotting. Dette indikerte en direkte interaksjon av Sp35 med seg selv. Vi behandlet også celler

transfektet med HA-Sp35 med Sp35-Fc og brukte en lignende immunutfellingstilnærmelse for å vise at HA-Sp35 ble bundet til Sp35-Fc.

Sp35-FLAG ble laget som følger. Sp35 ekstracellulært området (a.a. 1-531) ble PCR-forsterket ved bruk av primere 5'AATTAAGCGGCCGCATGCTGGCGGGGGGCGT3' (SEQ ID NO: 35) og 5'AATTAAGCGGCCGCTTTGTTCATGT3' (SEQ ID NO: 36) inneholdende NotI-steder (understreket). PCR-produktet ble spaltet med NotI og innsatt i NotI-stedet på vektor PV90. DNA-sekvensen på det innsatte ble bekreftet ved DNA-sekvensering.

Eksempel 10: *In vivo* transplantasjon av Sp35-transformerte celler

For å bestemme den biologiske funksjonen til Sp35 i ryggmargskadede rotter, ble kortikale primær dyrkede celler (blandede kulturer) infisert med retrovirus som uttrykker Sp35 i full lengde eller en retroviruskontroll for levering til det skadede episeret i rotteryggmarger. 2×10^6 celler ble innført og rottene ble avlivet dag 10. Ryggmargene ble fiksert i 4 % formaldehyd over natten, deretter dehydrert i 70 % fulgt av 95 % ETOH. Vevsprøver ble støpt inn i parafin. Snitt (10 mikrons tykkelse) ble brukt til immunohistokjemisk farging. Rotter som mottok Sp35-uttrykkende celler viste mindre aksonsammentrekning og mer β III-tubulinfarging nær episeret sammenlignet med kontrollen. Økt nevronal overlevelse ble observert i skadede rotter som mottok Sp35.

Sp35 retroviruskonstruksjon ble laget som følger: Sp35-genet ble PCR-forsterket ved bruk av primere 5'-GATTACTCGAGATGCTGGCGGGGGGCGTGAGG-3' (SEQ ID NO: 37) som inneholder et XhoI-sete (understreket) og 5'CGCGGGAAATTCTTCATATCATCTTCATGTTGAAGT-3' (SEQ ID NO: 38) som inneholder et EcoRI-sete (understreket). PCR-produktet ble spaltet med XhoI og EcoRI, deretter ligert i Retrovirusvektor pMIG (som inneholder IRES-GFP) som tidligere var spaltet med XhoI og EcoRI. Den nye vektoren ble betegnet pMMC078. Alle isolater av pMMC078 inneholdt ufrivillige punktmutasjoner slik at to isolater av pMMC078 ble ligert sammen. pMMC078.6 ble spaltet med XhoI og AccI og pMMC078.7 ble spaltet med XhoI og AccI. Disse to fragmentene ble ligert sammen for å lage det korrekte sluttplasmidet, pMMC089. DNA-sekvensen av det innsatte ble bekreftet ved DNA-sekvensering. Sp35-retrovirus ble laget som beskrevet. 293G-celler ble delt dagen før transfeksjon. $8 \mu\text{g}$ Sp35-retrovirus-DNA ble brukt for å transfektere 5×10^6 celler med lipofektamin (Invitrogen). Det betingede mediet ble høstet 92 timer etter transfeksjon. Det betingede mediet ble sentrifugert ved 5.000g i 10 mi-

nutter og supernatanten brukt som en Sp35 retrovirusbeholdning. Denne beholdningen ble lagret ved 4 °C i en uke eller -80 °C i 6 måneder.

Eksempel 11: Dyremodell av ryggmargskade

5 Alle kirurgiske prosedyrer utføres ved bruk av aseptisk teknikk. En uke før enhver kirurgisk manipulasjon blir dyrene behandlet. Ampicillin 100 mg/kg SC blir administrert profylaktisk før og etter operasjon for å redusere insidensen av blæreinfeksjonsskade.

10 Dyrene blir bedøvet ved bruk av 2,5 mg/kg IP Midazolam sammen med Isofluran 2-3 % i O₂ til tung bedøvelse målt ved tåklyp. Dyr blir beholdt på en varmeplate med sirkulerende vann gjennom hele operasjonen og ved rekonvalesens. Okkulært smørmiddel ble brukt for å forhindre uttørring av kornea og 0,05 mg/kg SC Atropin ble gitt for å redusere overflødig spyttproduksjon. Et lite snitt ble laget i huden og muskelen trakk seg sammen for å blottlegge ryggraden. En dorsal laminektomi ved spinalnivå L6 (og L7 hvis plassering av et intratekalt kateter er nødvendig, se nedenfor) blir utført, L6/L7 og tilstøtende spinale prosesser blir fast fiksert i et spinalt system (David Kopf Instruments). En dorsal halvdeling blir utført ved L6 med skarpe iridektomi-sakser som fullstendig avbryter hoved dorsomedial og underordnet dorsolateral kortikospinalkanal- (CST) komponenter. Etter operasjon blir laminektomistedet dekket med et beskyttende materiale som durafilm og den overliggende muskel sydd med 4,0 kromokatgut for å beskytte den utsatte spinalsøylen. 20 Huden blir sydd og tørket av med betadinløsning.

Funksjonell helbredelse av dyr ble evaluert ved bruk av Basso Beattie og Bresnehan (BBB) scoremetode vanligvis brukt for å evaluere rotter etter ryggmargskade. Denne metoden kvantifiserer bakre lemfunksjon på rotter ved detaljert analyse av leddbevegelse og vekt bærende evne. Rotter blir evaluert dagen etter ryggmargskade, deretter hver uke. 25

Umiddelbart etter CST-gjennomskjæring blir adenovirus som uttrykker Sp35 eller GFP eller kontrollvirus (10^{10} partikler) injisert på stedet for gjennomskjæring og områder umiddelbart kaudalt og rostralt til skadestedet. Totalt 10 µl Adv blir injisert 30 på fem forskjellige steder (4µl/sted). For intratekal administrering av Sp35-protein blir det laget et lite hull i dura i ryggmargen 2 mm kaudalt for lesjon L7 og et intratekalt kateter blir satt inn i subaraknoidal mellomrommet ved L7. Kateteret blir trukket langsomt og forsiktig over ryggmargen ca. 1 mm kaudalt til skaden. Den

delen av kateteret som ligger utenfor intratekal mellomrommet blir fast sydd på plass i det omgivende vev. En preparert miniosmotisk pumpe (Alza corp.) som inneholder testmaterialet (sp35 protein eller kontrollprotein) blir forbundet med den ubeskyttede enden på styrenålen og satt inn i det subkutane området. Etter operasjon blir laminektomistedene dekket av et beskyttende materiale som durafilm og den overliggende muskel sydd med 4,0 kromkatgut for å beskytte den eksponerte ryggspylen. Huden blir sydd og tørket av med betadinløsning.

Histologisk analyse: Kanalsøkingskirurgi finner sted under operasjonen for å inducere ryggmargsskade. Huden på hodet blir barbert og tørket av med betadin og 70 % alkohol. Dyret blir plassert i et stereotaksisk system. Skallen blir skåret på langs og benhinnen skrapet fra kraniet. Et hull drillles i skallen ca. 1-2 mm i diameter og en glass mikroliter nål settes vertikalt inn på 8 steder i motorbarken (koordinater blir bestemt i henhold til Paxinos og Wastons 1977 rottehjernekart) Ca. 5 µl kanalindikatormateriale (dvs. Biotin dekstranamin, 10.000M.Wt) blir injisert og nålen blir etterlatt i ytterligere fem minutter for å tillate løsningens diffusjon. Etter at nålen er fjernet blir hullet i skallen tettet med et gelskum og skallen stiftet tett over skadestedet. Dyrene tillates å friskne til og får postoperativ omsorg beskrevet nedenfor. 4 – 10 uker senere blir dyrene dypt bedøvet (Inaktin 100-110 mg/kg ip) og perfunderet for histologi som beskrevet nedenfor. Kanalsøkeren bæres av en fremoverrettet transportmekanisme nedover den kortikale spinalkanalen mot den kaudale enden av ryggmargen og skaffer måter til å kvantifisere anatomisk tilkoblingsmulighet innenfor kortikospinalkanalen.

For immunohistokjemiske forsøk blir dyr dypt bedøvet med Inactin (100-110 mg/kg IP) 2-8 uker etter operasjon for å påføre skade. Brysthulen åpnes og hjertet blir eksponert for å tillate perfusjon. En kanyle settes inn i venstre ventrikkel gjennom hvilken 100 cc iskald PBS trykkes langsomt (et hull blir laget i høyre ventrikkel for å sørge for væskeutslipp). Dette følges av en langsom men et jevnt drypp av 4 % paraformaldehyd (50-100 ml) inntil fiksering av øyne/ører/tær er åpenbar. Ryggmargen fjernes forsiktig for å minimalisere endring av skadestedet, frosset i OCT, delt opp og prosessert for immunohistokjemi. Andre valgfrie vev samles også til senere analyse. Dyrene som mottar adenovirus Sp35 viste økt aksonskyting bestemt ved βIII tubulinfarging til nevronakson.

Eksempel 12: Sp-35 virusvektorkonstruksjoner

En pMIG-derivert Sp35 virusvektor ble laget som følger. Sp35 kodesekvens i full lengde ble PCR-forsterket ved bruk av primere 5'-

GATTACTCGAGATGCTGGCGGGGGGCGTGAGG-3' (SEQ ID NO: 37) som inneholder

5 et XhoI-sted og 5'CGCGGGAATTCTCATATCATCTTCATGTTGAACTTG-3' (SEQ ID NO: 38) som inneholder et EcoRI-sted. PCR-produktet ble spaltet med XhoI og EcoRI, deretter ligert inn i retrovirusvektor pMIG (Cheng et al, 1996, Nat. Biotechnol.145:576) som ble spaltet med XhoI og EcoRI. Denne vektoren ble betegnet pMMC078. Alle pMMC078-isolater inneholdt punktmutasjoner slik at to isolater av pMMC078 ble ligert sammen. Vektor pMMC078.6 ble spaltet med XhoI og AccI og pMMC078.7 ble spaltet med XhoI og AccI. Disse to fragmentene ble ligert for å lage plasmidet pMMC089.

En pMIG-derivert Sp35-HA-virusvektor ble laget som følger. Et fragment som koder for Sp35 aminosyrer 326-614 i system med HA-sekvensen ble oppnådd ved bruk av PCR med primere 5'-GCCTTCCGCGGCCTCAACTACCTGCGCGTGCTC-3' (SEQ ID NO: 39) som inneholder et SacII-sete, og 5'-

CCGGAATTCTCAAGCGTAATCAGGAACGTCGTAAGGGTATATCATCTTCATGTTGAACTTG CCGGGCGCGTCGGC-3' (SEQ ID NO: 40) med pMMC089 som tjener som en mal.

Den lengste primeren inkluderer HA-kodesekvens (kursiv) etter Sp35-kodon 614 og før EcoRI-setet. PCR-produktet ble deretter spaltet med SacII og EcoRI og brukt for å erstatte SacII-EcoRI-fragmentet som inneholder villtype Sp35-kodoner 326-614 i den pMIG-deriverte retrovirusvektoren.

En Sp35 baculovirus HA-vektor ble laget som følger. Sp35-HA-kodesekvens fra Sp35-HA-retrovirusvektor ble spaltet butt, med XhoI og EcoRI, klonet inn i Bgl2-fylling på stedet for baculovirus shuttle vektor pBV-CZPG-setet (U.S. Pat. Nr. 6.190.887; og 6.338.953), for å erstatte LacZ-genet under CMV-promoter.

En Sp35-adenovirusvektor ble laget som følger. Sp35-IRES-GFP kodesekvens fra Sp35-retrovirus ble spaltet ut med XhoI-fylling og Nhe I, deretter klonet til EcoRI-fylling/Nhe I-steder på Adenovirus shuttle vektor pDC315, under en minimal CMV-promoter.

Eksempel 13: Dyremodell for remyelinerings

Long Evans hunnrotter er brukt i alle studier. Rotter blir bedøvet ved hjelp av Isofluran og T3/4 eksponert, og en dorsal hemi-laminektomi utført. Den kjemiske demyeliniseringsagens, lysolecitin (3µl 1 % lysolecitin i 0,9 % saltvann) injiseres derpå på høyre side av den dorsale søyle i ryggmargen 0,5-1 mm under ryggmargens overflate). Passende smertestillende behandling administreres før og etter operasjonen.

Tre dager senere blir injeksjonsstedet reeksponert (under Isofluran-anestesi med passende smertestillende behandling) og følgende behandlinger injisert i den skadede ryggmargen og en adenovirusvektor som koder for protein Sp35/kontrollprotein injiseres i skadestedet. 10^{10} partikler av adenovirus som koder for Sp35 eller GFP-kontroll i et volum av 10 µl, vil bli injisert i skadet rotteryggmarg på opptil 5 forskjellige steder i og rundt stedet for lysolecitin-indusert demyelinering. Et volum ikke større enn 2 µl injiseres på hvert av disse 5 injiseringssteder. Dyr blir dypt bedøvet med inactin (100-110 mg/kg IP) og perfundert med et fiksativ via hjertet 2, 3, 4 eller 6 uker etter operasjon for histologisk analyse av ryggmargens demyelinering/remyelinerings. Ryggmargen blir deretter fjernet og bearbeidet for analyse. Dyr som mottar Sp35-behandling viste økt aksonmyelinering bestemt ved IHC ved bruk av anti-MBP-proteinantistoff eller luxol fast blue.

Eksempel 14: Sp35 RNAi

For å behandle Sp35s rolle i hjernefunksjonen introduserte vi lentivirus Sp35 RNAi i postnatale 8 CGN-celler. Sp35 RNAi-infiserte celler hadde kortere nevritter og høyere spredningshastighet enn kontrollceller. Disse resultatene indikerer en rolle for Sp35 i å regulere RhoA-aktivering.

Murine og rotte Sp35 DNA-sekvenser ble sammenlignet for å finne homologe regioner som kan brukes til kandidat shRNAs. CH324 ble konstruert for å avlaste oligonucleotider LVI-035 og LVI-036 og ligering til HpaI og XhoI/spaltet pLL3.7. Oligonucleotider ble kjøpt fra MWG. Sekvensen er LVI-035 (sense-oligo) 5'TGATCGTCATCCTGCTAGACTTCAAGAGAGTCTAGCAGGATGACGATCTTTTTTC (SEQ ID NO: 41).

LVI-036 (antisense-oligo)

5'TCGAGAAAAAAGATCGTCATCCTGCTAGACTCTCTTGAAGTCTAGCAGGATGACGATCA
(SEQ ID NO: 3).

5 Før virusproduksjon ble DNA fra pLL3.7 eller kandidat shRNA i pLL3.7 cotransfektet med murint Sp35-HA-merket plasmid i et forhold på 5 til 1 i CHO-celler av 6 brønnsformat. Deaktiveringen ble analysert med Western blot påvisning av Sp35-HA-markør fra transfektet CHO-cellelysater så vel som ved Northern blot av total RNA preparert fra duplikatbrønner. Blottet ble undersøkt med en 0,7 kb fragment av mSp35. Analyser ble utført 4 timer etter transfeksjon (data ikke vist). Viruset
10 ble produsert fra den beste kandidaten til bruk i rottenevrontale kulturer. Vektoren, tilleggsmetodikk og virusproduksjon var som beskrevet hos Rubinsom et. al. "A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference." Nat. Genet. 33,401-6 (2003).

15 **Eksempel 15: RhoA aktivering**

COS7-celler som samtidig uttrykker både NgRI og Sp35 viste ingen endring i RhoA/GTP-nivåer i respons til OMgp. Dette antydte at Sp35/NgRI-komplekset ikke er tilstrekkelig til å mediere signaltransduksjon ved hjelp av en myelinhemmer.

20 Vi undersøkte muligheten for at et ternært kompleks av Sp35/NgRI/p75 medierer signalering. To metoder ble brukt for å evaluere interaksjoner mellom Sp35, NgRI og p75. Først ble bindingen evaluert i en direkte bindingsanalyse ved bruk av et AP-Sp35-konjugat. AP-Sp35-konjugatet bandt svakt til p75-uttrykkende celler. AP-p75 bandt til NgRI-uttrykkende celler. Binding av AP-Sp35 til NgRI og p75 ble målt ved hjelp av ELISA (fig.4). For det andre ble binding av Sp35 til NgRI og p75 evaluert
25 ved co-immunoutfelling fra COS7-celler som samtidig uttrykker Sp35, NgRI og p75. Et anti-NgRI antistoff immunoutfelte et kompleks som inneholdt Sp35 og p75. Et anti-Sp35 antistoff immunoutfelte også et kompleks som inneholdt p75. Interaksjonen og data for co-immunoutfelling fremskaffet bevis for en direkte interaksjon mellom Sp35, NgRI og p75. Vi brukte konfokal mikroskopi og antistoff mot Sp35,
30 p75 og NgRI for å vise at Sp35, NgRI og p75 samlokaliserer til cellelegemer og aksoner av p7 CG-nevroner fra rotte.

Deretter viste vi at kombinasjonen Sp35, NgRI og p75 er tilstrekkelig for myelinhemmerens aktivitet. Ikke-nevrontale COS7-celler ble skapt for å uttrykke alle tre

komponenter. Ved bruk av disse cellene viste vi at RhoA/GTP-nivåer ble oppregulert av OMgp. OMgp-Fc-behandling økte RhoA/GTP-nivåer i celler som samtidig uttrykker Sp35/p75/NgRI, sammenlignet med andre kombinasjoner av disse tre komponentene. Vi bekreftet proteinekspressjonen ved hjelp av Western blotting av COS7-cellelysater. Affiniteten til myelinhemmere som binder til NgRI, ble ikke berørt av nærvær av p75 eller p75 og Sp35. De kombinerte resultatene understøtter en modell hvorved det tenære komplekset av NgRI, Sp35 og p75 er nødvendig for RhoA-regulering i nærvær av NgRI-ligander (fig. 5). Sp35 inneholder et cytoplasmatisk område som har et mulig direkte eller indirekte engasjement for signalering. For å bestemme det cytoplasmatiske området produserte vi en cytoplasmatisk område-avkutting av Sp35 (aminosyre 34 til 576 av SEQ ID NO: 2) for å virke på en dominant, negativ måte ved forming av et uproduktivt ternært kompleks som ikke var i stand til å signalere. Vi betegnet dette molekylet med det cytoplasmatiske område-avkutting "DN-Sp35" (for dominant, negativ Sp35). Vi transfekterte postnatale dag 7 (p7) CG-nevroner med Sp35 i full lengde eller DN-Sp35, og analyserte deretter for respons på hemmende myelinkomponenter (OMgp, myelin og Nogo66). Som vist i fig. 6 reagerte ikke DN-Sp35 transfekterte celler på hemmende myelinkomponenter og viste lengre nevrer enn kontroller. I motsetning til dette viste celler transfektert med Sp35-konstruksjon i full lengde forhøyet respons til hemmende substrater og hadde kortere nevrer sammenlignet med kontroller. Dette demonstrerte at DN-Sp35 virker som en konkurrent til svekket nevrutveksthemming forårsaket av myelinkomponenter. Vi ventet at eksogent løselig Sp35-Fc også ville binde NgRI og blokkere funksjonen av hemmende substrater. Som vist i fig. 7 reduserte Sp35-Fc nevrutveksthemming ved OMgp, Nogo66 og MAG.

25 **Eksempel 16: Nevrobeskyttende aktivitet**

Et likt antall rotte p6 cerebellære granulære nevroner ble lagt i hver brønn av en 12-brønns cellekulturplate i nærvær eller fravær av 50 nM av Sp35-Fc protein. Disse poly-D-lysinplatene har blitt forhåndsbelagt (tørket av) med 10 µg av CNS-myelin eller 200 ng av Nogo66, MAG og OMgp eller kontroll-Fc. De nevronele kulturer ble opprettholdt i 1 til 7 dager ved 37 °C og 5 % CO₂. Nevronene var friske og vokste bra i PBS kontrollbrønner uavhengig av Sp35-Fc-behandling med full nevrutforlengelse [bestemt av en nevronele spesifikk markør, βIII tubulin] som ble undersøkt etter 3 dager. I fravær av Sp35-Fc vokste ikke nevronele godt i brønner belagt med myelin, Nogo66, MAG og OMgp. Det var minimal nevrutskytting [kort og fordreid] og nevronele syntes ikke å være friske med avrundede cellelegemer og fortettet nukleært materiale. DAPI-farging demonstrerte at antallet nevronele påvist

i disse brønnene var mindre enn i PBS-kontrollbrønner, noe som antyder nevronalt tap. I nærvær av Sp35-Fc var lange nevritter til stede og nevronene syntes friske. DAPI-farging demonstrerte et høyere nevronalt antall i disse brønnene enn i de som ikke hadde mottatt Sp35-Fc. Data er oppsummert i tabell 2 under.

5

Tabell 2

Ved fravær av Sp35-Fc

Avtørket substrat	Omgp/Nogo/MAG/myelin	Fc-kontroll
Nevrittutvekst	Kort Fordreid	Lang Utvidet
Cellekropps-morfologi	Avrundet	Spredt
Kjernemateriale	Fortettet	Klart
Antall nevroner på slutten av forsøket	Redusert	Samme som kontroll-Fc

Ved nærvær av Sp35-Fc

Avtørket substrat	Omgp/Nogo/MAG/myelin	Fc-kontroll
Nevrittutvekst	Lang Utvidet	Lang Utvidet
Cellekropps-morfologi	Spredt	Spredt
Kjernemateriale	Klart	Klart
Antall nevroner på slutten av forsøket	Mindre redusert enn kontroll-Fc	Samme som kontroll-Fc

10 Disse data indikerer at en løselig form av Sp35, dvs. Sp35-Fc har nevrobeskyttende aktivitet.

I rotter som har blitt hemi-transektert (T9, SCT) i ryggmargen, viste β III tubulin-farging av ryggmargssnitt et vesentlig tap av nevroner på skadestedet. Et rekombinant virus som uttrykker Sp35, ble brukt for å infisere SCT-dyr på skadestedet.

15 Histologisk farging av disse ryggmarger viste et økt antall av nevroner rundt skadestedet sammenlignet med kontrollgruppen som ble infisert med vektorvirus. Dette

er i samsvar med *in vitro*-eksperimentelle funn beskrevet over og indikerer videre nevrobeskyttende egenskaper assosiert med Sp35.

Eksempel 17: Sp35 i dyremodell for ryggmargskade

5 Siden Sp35-Fc reduserte nevrutveksthemming forårsaket av OMgp, Nogo66 og
MAG *in vitro*, forventet vi at molekylet skulle fremme funksjonell bedring av CNS-
skader *in vivo*. For å bekrefte dette administrerte vi Sp35-Fc til rotter med hemi-
seksjonert ryggmarg, dvs. en dyremodell for akutte CNS-traumer. Som vist i fig. 8
og fig. 9 demonstrerte Sp35-Fc behandlede rotter signifikant økt funksjonell bed-
10 ring sammenlignet med rotter behandlet med IgG.

Ryggmargskade og adferdsanalyse ble utført som følger. Alle operative prosedyrer
ble utført i henhold til retningslinjer fra Biogen Institutional Animal Use and Care
Committee. Long Evans hunnrotter (190-210g, Charles River, Wilmington, MA) ble
bedøvet ved bruk av 2,5 mg/kg Midazolam, I.P. og 2-3 % Fluothan i O₂. En dorsal
15 laminektomi ble utført ved spinalnivå T6 og T7. En dorsal hemiseksjon ble utført
som fullstendig avbrøt den store dorsomediale og den lille dorsolaterale kortikospi-
nale kanals (CST) komponenter. Umiddelbart etter CST-transeksjon ble et intra-
tekalt kateter satt inn i det subaraknoidale mellomrommet ved T7 og forbundet
med en primet miniosmotisk pumpe (Alzet model 2004) satt inn subkutant. Mini-
20 osmotiske pumper leverte Hu IgT isotype kontrollprotein (5 mg/ml, n=5, Phar-
mingen), PBS (n=3) løselig Hu Sp35-Ig fusjonsprotein (4,3 mg/ml, n=8) i en has-
tighet på 0,25 µl/t. Etter operasjon ble laminektomistedet sydd og hudsåret stiftet
sammen. Postoperativ behandling inkluderte smertebehandling (Buprenorphine
0,05 mg/kg s.c.) i 3 dager og antibiotikabehandling (Ampicillin 100 mg/kg s.c. to
25 ganger daglig) i 7 dager etter operasjonen. Blærene ble manuelt tømt 2 ganger
daglig gjennom hele studien (28 dager) eller inntil funksjonen kom tilbake (dette
tidspunkt ble notert). Alle dyr ble scoret blindt ved bruk av felles BBB scorings-
system (Basso et al., 1995, *J Neurotrauma* 12:1-21; Ono et al., 2003, *J. Neurosci.*
23:5887-5896). Rotter ble evaluert dagen etter CST-transeksjon (dag 2) og ukent-
30 lig deretter i fire uker ved bruk av Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) bevegelige ra-
ting scale. Forskerne var ukjent med hensyn til behandlingsgrupper gjennom hele
studien.

Eksempel 18: Nevronal overlevelse og aksonregenerering i rubro-spinalkanalens (RST) hemiseksjonsskademodell

Vi undersøkte også effekten av Sp35-behandling på regenerering av nevroner i rubro-spinal-kanalen som medvirker direkte til bevegelse.

5 Voksne 9-uker gamle Sprague-Dawley rotter (200-250g) ble bedøvet med en intra-peritoneal injeksjon med ketamin (80 mg/kg) og xylazin (8 mg/kg). Under et operasjonsmikroskop ble dorsal laminektomi utført og den syvende thoraxspinalvirvel (C7) identifisert. Etter å ha åpnet dura mater ble en høyre hemiseksjon utført ved ryggmargsnivå C7 ved bruk av et par fjærsakser. Etter ryggmargshemiseksjonen
10 mottok dyrene et stykke gelskum oppbløtt med enten 10 µl av en 2 µg/ml løsning av Sp35-Fc eller 10 µl av en 2 µg/l løsning av humant Ig eller 10 µl PBS plassert på toppen av skadestedet. Etter operasjonene ble dyrene i hver gruppe delt opp for aksonal tracing og adferdsanalyse. Dyrene i gruppen for aksjonel tracing (n=5 for hver gruppe) og adferdsanalyse (n=7 for hver gruppe) ble tillatt å overleve i en
15 måned.

Fluoro-Gold (FG, 6 % w/v, Fluorochrome) ble brukt for å merke RST-nevroner som hadde regenerert sine aksoner over skadearret og gått tilbake til den kaudale ryggmargen. To dager før slutten av postskade overlevelsperioden (1 måned),
20 ble dyrene bedøvet med en intraperitoneal injeksjon av ketamin (80 mg/kg) og xylazin (8 mg/kg). En dorsal laminektomi ble utført og T2 spinalsegmentet ble identifisert. FG i et volum på 0,5 ml ble injisert manuelt i høyre T2 ryggmarg ved bruk av en Hamilton-sprøyte. To dager senere ble dyrene bedøvet og drept med en dødelig dose ketamin (150 mg/kg) og xylazin (8 mg/kg) og de ble perfundert intrakardinalt med vanlig saltvann, etterfulgt av 400 ml fikseringsmiddel som inneholder
25 5 % paraformaldehyd i 0,1 x PBS. Hjerner og ryggmarger ble fjernet, postfiksert med paraformaldehyd over natten og deretter plassert i 30 % fosfatbufret sukrose. Hjerne og ryggmargsvev ble skåret opp i 30 mm snitt på et kryostat og montert på gelatinbelagte slides. Antallet FG-merkede RST-nevroner på skadesiden ble uttrykt som en prosent av det totale antall FG-merkede nevroner på kontralateral intakt
30 side. Denne prosentdelen i gruppene ble sammenlignet statistisk ved bruk av enveis ANOVA fulgt av en Tukey-Kramer multippel sammenligningstest. Som vist i tabell 3, fremmet 2 µg/ml Sp35-Fc overlevelse av rubro-spinal-kanal (RST) nevroner.

Tabell 3

Behandling	Prosent overlevelse av RST-nevroner (\pm S.E.M.)
PBS	17,1 \pm 2
Sp35-Fc	31,9 \pm 1,5
Kontroll-Fc	14,5 \pm 2,1

For adferdsanalyse, ble bruken av fremre lemmer gjennom spontan vertikal undersøkelse gransket en måned etter forskjellige behandlinger som beskrevet (Liu et al., 1999) med mindre modifikasjoner. Rotter ble plassert i klare pleksiglass-sylindere (15 cm i diameter og 30 cm høye) som oppmuntret bruk av fremlemmene til vertikal undersøkelse i 5 minutter. Følgende oppførsel ble scoret: (1) uavhengig bruk av venstre (uskadde) eller høyre (skadde) fremre lemmer med hensyn på kontakt med sylinderveggen; og (2) simultan bruk av begge fremre lemmer for kontakt med sylinderveggen. Den vertikale undersøkelsesadferd ble uttrykt i betegnelsene (1) prosentvis bruk av venstre (uskadde) fremre lem relativ til det totale antall av skadde, uskadde og begge lemmers bruk; (2) prosentvis bruk av høyre (skadde) fremre lem relativ til det totale antall av skadde, uskadde og begge lemmers bruk; og (3) prosentvis bruk av begge fremre lemmer relativt til det totale antall av skadde, uskadde og begge lemmers bruk. Forskjellen mellom gruppene ble testet med enveis ANOVA fulgt av Bonferroni post hoc analyse. Sp35-Fc-behandlede dyr viste signifikant forbedret bevegelse av fremre lem; 30 % bruk for begge fremre lemmer hos Sp35-Fc-behandlede dyr mot 10 % bruk for begge fremre lemmer hos kontroll-Fc eller PBS-behandlede dyr; 55 % venstre (uskadd) lembruk mot 80 % bruk hos kontroll-Fc eller PBS-behandlede dyr; og 29 % høyre (skadd) lembruk mot ca. 15 % hos kontroll-Fc eller PBS-behandlede dyr.

Eksempel 19: Sp35-Fc fremmer retinalganglioncelleoverlevelse (RGC) i synsnervetranseksjonsmodell

Vi bekreftet videre aktiviteten av Sp35 ved bruk av synsnervetranseksjonsmodell, som undersøker faktorer som påvirker nevronal funksjon. Unge voksne Sprague Dawley (SD) hunnrotter ble brukt i denne studien. Høyre synsnerv på hvert dyr ble transektert intraorbitalt 1,5 mm fra den optiske skiven. En stykke gelskum oppbløtt i 6 % Fluoro-Gold (FG) ble påført det nylig transekterte stedet rett bak den optiske skiven for merking av de overlevende retinale ganglioncellene (RGCs). Dyrene ble delt opp i 6 grupper (n=6 i hver gruppe) som mottok enten Sp35-Fc, human IgGI eller bare PBS ved intravitreal injeksjon. Volumet på hver intravitreale

injeksjon var 4 ml, mens dosen på hver injeksjon var 2 mg. De intravitreale injeksjonene ble utført umiddelbart etter synsnervetranseksjonen.

Alle dyrene fikk lov til å overleve 1 uke. To dager før avliving av dyrene ble den venstre synsnerven på hvert dyr transfektert og 6 % FG ble brukt for å merke de overlevende RGC-ene som en intern kontroll. Dyrene ble avlivet med en dose nembutal og retinaene ble dissektert i 4 % paraformaldehyd. Fire radiale kutt ble laget for å dele retinaene i fire kvadranter (superior, inferior, nasal og temporal). Retinaene ble deretter postfiksert i samme fikseringsmiddel i en time før de ble flatmontert med monteringsmediet (Dako). Slidesene ble undersøkt under et fluorescensmikroskop med ultrafiolett filter (magnetisert bølgelengde = 330-380 nm). Merkede RGCer ble talt langs medianlinjen på hver kvadrant med start fra den optiske skiven til den perifere retinagrensen i 500 μ m intervaller, under et kikkhullsgitter på 200 x 200 μ m. Prosentandel overlevende RGCer fra hver behandling ble uttrykt ved å sammenligne antall overlevende RGCer i de skadede øynene med deres kontralaterale øyne. Alle data ble uttrykt som gjennomsnitt \pm SEM. Statistisk signifikans ble evaluert ved enveis ANOVA, fulgt av en Tukey-Kramer post hoc test. Forskjeller ble ansett for signifikante ved $p < 0,05$. Sp35-Fc-behandlede dyr viste signifikant nevronal overlevelse (83 %) sammenlignet med kontroll-Fc eller PBS-behandlede dyr hvor hver bare viste ca. 50 % nevronal overlevelse.

Patentkrav

1. Isolert nukleinsyre som koder for et oppløselig polypeptid, hvori:

(A) nevnte oppløselige polypeptid består av et polypeptid valgt fra den følgende gruppe, eventuelt kondensert til et heterologt peptid:

- 5 (a) et polypeptid omfattende aminosyrer 34-532 av SEQ ID NO: 2;
- (b) et polypeptid omfattende aminosyrer 34-417 av SEQ ID NO: 2;
- (c) et polypeptid omfattende aminosyrer 34-432 av SEQ ID NO: 2;
- (d) et polypeptid omfattende aminosyrer 417-531 av SEQ ID NO: 2;
- (e) et polypeptid omfattende aminosyrer 425-531 av SEQ ID NO: 2;
- 10 (f) et polypeptid omfattende aminosyrer 1-531 av SEQ ID NO: 2;
- (g) et polypeptid omfattende aminosyrer 433-493 av SEQ ID NO: 2;
- (h) et polypeptid omfattende et LRR-domene av SEQ ID NO: 2, et basisk område av SEQ ID NO: 2 C-terminalt for LRR-domenet, samt et immunoglobulin (Ig) - domene av SEQ ID NO: 2 C-terminalt til det basiske område;
- 15 (i) et polypeptid omfattende et Ig-domene av SEQ ID NO: 2, men som mangler et LRR-domene av SEQ ID NO: 2, et basisk område av SEQ ID NO: 2, samt et cytoplasmisk domene;
- (j) et polypeptid omfattende et LRR-domene av SEQ ID NO: 2, man som mangler et Ig-domene av SEQ ID NO: 2, et basisk område av SEQ ID NO: 2 samt et cytoplasmisk domene; og
- 20 (k) et polypeptid som i (h) og som mangler et cytoplasmisk domene,

hvor det oppløselige polypeptid kodet av nukleinsyren, er i stand til å binde til NgR1 for å lette den NgR1-medierte inhibering av aksonal forlengelse i et sentralnervesystem-nevron;

25 (B) nevnte oppløselige polypeptid består av et polypeptid innbefattende det følgende aminosyremotiv, eventuelt kondensert til et heterologt polypeptid:

LSPRKH (SEQ ID NO: 10);

hvor det oppløselige polypeptid kodet av nukleinsyren er i stand til å blokkere inhibering eller interferering med funksjonen av NgR1; eller

(C) nevnte oppløselige polypeptid består av det følgende polypeptid, eventuelt kondensert til et heterologt polypeptid:

LSPRKH (SEQ ID NO: 10);

5 hvor det oppløselige polypeptid kodet av nukleinsyren er i stand til å blokkere, inhibere eller interferere med funksjonen av NgR1.

2. Isolert nukleinsyre ifølge krav 1, hvor nevnte oppløselige polypeptid består av et polypeptid innbefattende det følgende aminosyremotiv, eventuelt kondensert til et heterologt polypeptid

LSPRKH (SEQ ID NO: 10);

10 hvor det oppløselige polypeptid kodet av nukleinsyren er i stand til å blokkere, inhibere eller interferere med funksjonen av NgR1.

3. Isolert nukleinsyre ifølge krav 1, hvor nevnte oppløselige polypeptid består av det følgende polypeptid:

LSPRKH (SEQ ID O: 10);

15 hvor det oppløselig polypeptid kodet av nukleinsyren er i stand til å blokkere, inhibere eller interferere med funksjonen av NgR1.

4. Isolert nukleinsyre ifølge krav 2,

hvor polypeptidet av SEQ ID NO: 10 er cyclisert.

20 5. Nukleinsyre ifølge ethvert av kravene 1 til 3, hvor det heterologe polypeptid er valgt fra gruppen bestående av en Ig-enhet, en serum albumin-enhet, en målsøkende enhet, en rapporterende enhet og en opprenskningslettende enhet.

6. Nukleinsyre ifølge krav 5, hvor Ig-enheten er en Fc-enhet.

7. Vektor omfattende nukleinsyren ifølge ethvert av kravene 1 til 3.

8. Vektor ifølge krav 7, hvor nevnte nukleinsyre er operativt forbundet til en ekspresjonskontrollsekvens.
9. Vertscelle omfattende vektoren ifølge krav 7 eller krav 8.
10. Vertscelle ifølge krav 9, som uttrykker polypeptidet som er kodet av nevnte nukleinsyre.
5
11. Isolert polypeptid kodet av nukleinsyren ifølge ethvert av kravene 1 til 6, hvor nevnte polypeptid er i stand til å minske inhibering av aksonal vekst av et sentralnervesystemnevron.
12. Polypeptid ifølge krav 11, hvor polypeptidet er konjugert til en polymer.
- 10 13. Polypeptid ifølge krav 12, hvor polymeren er valgt fra gruppen bestående av en polyalkylenglykol, en sukkerpolymer og et polypeptid.
14. Polypeptid ifølge krav 13, hvor polyalkylenglykolet er polyetylenglykol (PEG).
15. Polypeptid ifølge krav 14, hvor polypeptidet er konjugert til 1, 2, 3 eller 4 polymerer.
- 15 16. Polypeptid ifølge krav 15, hvor den totale molekylvekt av polymerene er fra 20.000 til 40.000 Da.
17. Antistoff som binder spesifikt til polypeptidet av SEQ ID NO: 2 eller et antigenbindende fragment av nevnte antistoff, hvor nevnte antistoff eller fragment er i stand til å minske inhibering av aksonal vekst av et sentralnervesystemnevron.
- 20 18. In vitro fremgangsmåte for å inhibere signaltransduksjon av NgR1, hvor nevnte fremgangsmåte omfatter å sette en NgR1-uttrykkende celle i kontakt med en effektiv mengde av et polypeptid ifølge ethvert av kravene 11 til 16.
- 25 19. In vitro fremgangsmåte for å minske inhibering av aksonal vekst av et sentralnervesystemnevron, hvor nevnte fremgangsmåte omfatter å sette nevnte nevron i kontakt med en effektiv mengde av et polypeptid ifølge ethvert av kravene 11 til 16 eller et antistoff eller segment derav ifølge krav 17.

20. In vitro fremgangsmåte for å inhibere vekstkon-kollaps av et sentralnervesystemnevron, hvor nevnte fremgangsmåte omfatter å sette nevnte nevron i kontakt med en effektiv mengde av et polypeptid ifølge ethvert av kravene 11 til 16 eller et antistoff eller fragment derav ifølge krav 17.
- 5 21. In vitro fremgangsmåte for å fremme overlevelse av et nevron som står i fare for å dø, hvor nevnte fremgangsmåte omfatter å sette nevnte nevron i kontakt med en effektiv mengde av et polypeptid ifølge ethvert av kravene 11 til 16.
22. Anvendelse av et polypeptid ifølge ethvert av kravene 11 til 16 eller et antistoff eller fragment derav ifølge krav 17, for fremstilling av et medikament til be-
10 handling av en sentralnervesystem-sykdom, -forstyrrelse eller -skade hos et pattedyr.
23. Anvendelse av en vertscelle ifølge krav 10 for fremstilling av et medikament til behandling av en sentralnervesystem-sykdom, -forstyrrelse eller -skade i et pattedyr, hvor nevnte vertscelle skal introduseres i pattedyret ved eller nær området
15 for sykdommen, forstyrrelsen eller skaden.
24. Anvendelse ifølge krav 23, hvor vertscellen er avledet fra pattedyret som skal behandles.
25. Anvendelse av en viral vektor omfattende en nukleotidsekvens som koder for et polypeptid ifølge krav 11, for fremstilling av et medikament til behandling av
20 en sentralnervesystem-sykdom, -forstyrrelse eller -skade i et pattedyr, hvor nevnte virale vektor skal bli administrert til pattedyret ved eller nær området for sykdommen, forstyrrelsen eller skaden slik at nevnte polypeptid blir uttrykt fra nukleotidsekvensen i pattedyret i en mengde som er tilstrekkelig til å redusere inhibering av aksonal forlengelse av nevroner ved eller nær området for skaden.
- 25 26. Anvendelse av en viral vektor omfattende en nukleotidsekvens som koder for et polypeptid ifølge krav 11, for fremstilling av et medikament for å fremme overlevelse av et nevron som står i fare for å dø, i et pattedyr med en nevrodegenerativ sykdom, forstyrrelse eller skade, hvor nevnte virale vektor skal bli administrert til pattedyret ved eller nær området for nevronet.
- 30 27. Anvendelse ifølge krav 25 eller 26, hvor den virale vektor er valgt fra gruppen bestående av en adenoviral vektor, en lentiviral vektor, en bakuloviral vektor,

en Epstein Barr viral vektor, en papovaviral vektor, en vacciniaviral vektor eller en herpes simplex viral vektor.

28. Anvendelse ifølge krav 25 eller 26, hvor den virale vektor skal administreres ved en rute valgt fra gruppen bestående av topisk administrasjon, intraokular administrasjon, parenteral administrasjon, intratekal administrasjon, subdural administrasjon og subkutan administrasjon.

29. Anvendelse ifølge krav 25, hvor sentralnervesystemsykdommen, -forstyrrelsen eller -skaden er en skade på ryggmargen eller en skade på synsnerven.

30. Anvendelse ifølge ethvert av kravene 25 til 29, hvor nevnte polypeptid fremmer myelinisering.

31. Anvendelse ifølge krav 26, hvor den neurodegenerative sykdom, forstyrrelse eller skade er valgt fra gruppen bestående av multippel sklerose, ALS, Huntingtons sykdom, Alzheimers sykdom, Parkinsons sykdom, diabetisk nevropati, slag, traumatisk hjerneskade og skade på ryggmargen.

32. Interfererende RNA-molekyl som binder spesifikt til nukleinsyren ifølge ethvert av kravene 1 til 3, hvor nevnte interfererende RNA-molekyl er et lite hårnåls-RNA (shRNA) kodet for av et DNA-molekyl omfattende SEQ ID NO: 41 eller SEQ ID NO: 42.

33. Anvendelse ifølge krav 22, hvor sentralnervesystemsykdommen, -forstyrrelsen eller -skaden er multippel sklerose.

34. Anvendelse av antistoff eller antigenbindende fragment derav ifølge krav 17, for fremstilling av et medikament til behandling av multippel sklerose.

35. Anvendelse av antistoff eller antigenbindende fragment derav ifølge krav 17, for fremstilling av et medikament til behandling av ryggmargsskade.

36. Anvendelse av antistoff eller antigenbindende fragment derav ifølge krav 17, for fremstilling av et medikament til behandling av synsnerveskade.

37. Anvendelse av antistoff eller antigenbindende fragment derav ifølge krav 17, for fremstilling av et medikament til behandling av slag.

38. Anvendelse av antistoff eller antigenbindende fragment derav ifølge krav 17, for fremstilling av et medikament til behandling av Parkinsons sykdom.
39. Anvendelse av antistoff eller antigenbindende fragment derav ifølge krav 17, for fremstilling av et medikament til behandling av traumatisk hjerneskade.
- 5 40. Anvendelse av antistoff eller antigenbindende fragment derav ifølge krav 17, for fremstilling av et medikament til behandling av diabetisk nevropati.
41. Farmasøytisk sammensetning omfattende antistoff eller antigenbindende fragment derav ifølge krav 17, samt et farmasøytisk akseptabelt bæremiddel.
- 10 42. Anvendelse av antistoff eller antigenbindende fragment derav ifølge krav 17, til behandling av multippel sklerose.
43. Anvendelse av antistoff eller antigenbindende fragment derav ifølge krav 17, for fremstilling av et medikament til behandling av synsnerveskade.
44. Anvendelse av antistoff eller antigenbindende fragment derav ifølge krav 17, for anvendelse ved behandling av slag.

1/9

FIG. 1

GGAGAGACATGCGATTGGTGACCGAGCCGAGCGGACCGAAGGGCGGCCCGA
GATGCAGGTGAGCAAGAGGATGCTGGCGGGGGCGTGAGGAGCATGCCAG
CCDCCTCCTGGCCTGCTGGCAGCCCATCCTCCTGCTGGTGCTGGGCTCAGTGC
TGTCAGGCTCGGCCACGGGCTGCCCGCCCCGCTGGGAGTGTCCGCCAGGA
CCGGCTGTGCTGTGCCACCGCAAGCGCTTTGTGGCAGTCCCGAGGGCATC
CCCACCGAGAAGCGCCTGCTGGACCTAGGCAAGAACCOCATCAAAAACGCTCA
ACCAGGACGAGTTCGCCAGCTTCOCCACCTGGAGGAGCTGGAGCTCAACGA
GAACATCGTGAGCGCGTGAGCGCGGCGCTTCAACAACCTCTTCAOCTC
CGGACGCTGGGTCTOCCGAGCAACCGCCTGAAGCTCATCCCGTAGGGCTCT
TCACTGGCTCAGCAACCTGACCAAGCTGGACATCAGCGAGAACAAGATTGT
TATCCTACTGGACTACATGTTTCAGGACCTGTACAACCTCAAGTCACTGGAGG
TTGGGACAATGACCTCGTCTACATCTCTCACCGCGCCTTCAGCGGCTCAAC
AGCTGGAGCAGCTGACGCTGGAGAAATGCAACCTGACCTCCATCCACCAG
AGGGCTGTCCACCTGCACGGCCTCATCGTCTGAGGCTCCGGCACCTCAA
CATCAATGCCATCCGGGACTACTCCTCAAGAGGCTCTACCGACTCAAGGTCT
TGGAGATCTOCCACTGGCCCTACTTGGACACCATGACAACCAACTGCTCTAC
GGCCTCAACCTGACGTCCCTGTCCATCACACACTGCAATCTGACCGCTGTGCC
CTACCTGGCCGTCGGCCACCTAGTCTATCTCCGCTTCTCAACCTCTCTACA
ACCCATCAGCACCATTTGAGGGCTCCATGTTGCATGAGCTGCTCCGGCTGCA
GGAGATCCAGCTGGTGGGCGGGCAGCTGGCCGTGGTGGAGCCCTATGCCCTC
CGGGCCCTCAACTACCTGGCGGTGCTCAATGTCTCTGGCAACCACTGACCA
CACTGGAGGAATCAGTCTTCCACTCGGTGGGCAACCTGGAGACACTCATCCT
GGACTCCAACCGCTGGCCTGGGACTGTGGCTCCTGTGGGTGTTCCGGCGOC
GCTGGCGGCTCAACTTCAACCGGCAGCAGCCACGTGGGCCACGCCCGAGTT
TGTCAGGGCAAGGAGTTCAAGGACTTCCCTGATGTGCTACTGCCCAACTACT
TCACCTGCCGCGCGCCCGCATCCGGGACCGCAAGGCCAGCAGGTGTTTGT
GGAGAGGGCCACACCGTGCAAGTTTGTGTGCCGGGGCGATGGCGACCCCGC
CCCGCATCCTCTGGCTCTCACCCCGAAAGCACCTGGTCTCAGCCAAGAGCA
ATGGGCGGCTCACAGTCTTCCCTGATGGCACGCTGGAGGTGCGCTACGCCCA
GGTACAGGACAACGGCACGTACCTGTGCATCGCGGCCAACCGGGCGGCAA
CGACTCCATGCCCGCCACCTGCATGTGCGCAGCTACTCGCCCGACTGGCCOC
ATCAGCCCAACAAGACCTTCCCTTTCATCTCCAACCAAGCCGGGGGAGGGAGA
GGCCAACAGCACCCCGGCACTGTGCTTTCCCTTCGACATCAAGACCCCTCA
TCATGCCACCACCATGGGCTTCATCTCTTCCCTGGGCGTCTGCTCTTCTGCC
TGGTGTGCTGTGTTCTCTGGAGCCGGGGCAAGGGCAACACAAAGCACAAAT
CGAGATCGAGTATGTGCCCGAAAGTCGGAAGCAGGCATCAGCTCCGCGAC
GCGCCCGCAAGTTCAACATGAAGATGATATGAGGCCGGGGCGGGGGGCGAG
GGACCCCGGGGGCGGGCAGGGGAAGGGGCTGGCCGCCACCTGCTCACT
CTCCAGTCTTCCACCTCTCCCTACCCTTCTACACAGTCTCTTTCTCCCT
CCCGCTCCGTCCCTGCTGCCCGCCGACGCTCAACCACTGCCCTCTCTC
TACCAGGACCTCAGAAGCCAGACCTGGGGACCCACCTACACAGGGGCATT
GACAGACTGGAGTTGAAAGCCGACGAACCGACAGCGGGCAGAGTCAATAAT
TCAATAAAAAGTTACGAACCTTCTCTGTAACCTGGGTTTCAATAATTATGGA
TTTTTATGAAAACCTGAAATAATAAAAAGAGAAAAAACTATTTCCTATAGC

2/9

FIG. 1 (forts.)

**TAGTCGGAATGCAAAC TTTTGACGTCTGATTGCTCCAGGGCCCTCTTCCAAC
TCAGTTTCTTGTTTTCTCTTCNTCCTNCTCCTCTTCTTCCCTTCTCTTCTCT
TCCCCAGTGGGGAGGGATCACTCAGGAAAACAGGAAAGGAGGTTCCAGCC
CCACCCAOCCTGCCCACCCCGCCCCAGGCACCATCAGGAGCAGGCTAGGGGGC
AGGCTGGGCCAGCTCCGGCTGGCTTTTTCAGGGGCGCAGGTGGAGGGGA
CAGGTCGCCGATGGGGGTGGGAGCCTGTCTGCTGGGCTGCCAGGCGGCACC
ACTGCAAGGGGTGGGAGCCTGGCTCGGGTGTGGCTGAGACTCTGGACAGAGG
CTGGGGTCCCTCCTGGGGGACAGCACAGTCAGTGGAGAGAGCCAGGGGCTGG
AGGTGGGGCCACCCAGCCTCTGGTCCAGCTCTGCTGCTCACTTGCTGTGT
GGCCCTCAAGCAGGTCCACTGGCCTCTCTGGGCTCAGTCTCCACATCTGTAC
AAATGGGAACATTACCCCTGCCCTGCOCTACCTNANAGGGCTGTINTGAGGN
ATNGATGAGATGATGTATGT**

FIG. 2

MLAGGVRSMPSPLLACWQPILLLVLGSVL
SGSATGCPPRCECSAQDRAVLCHRKRFA
VPEGIPTETRLLDLGKNRIKTLNQDEFASF
PHLEELNENIVSAVEPGAFFNLFLRTL
GLRSNRLKLIPLGVFTGLSNLTKLDISENKI
VILLDYMFQDLYNLKSLEVGDNDLVYISHR
AFSGLNSLEQLTLEKCNLTSIPTREALSHLH
GLIVLRLRHLNINAIRDYSFKRLYRLKYLEI
SHWPYLDTMTPNCLYGLNLTSLSITHCNLT
AVPYLAVRHLVYLRFLNLSYNPISTIEGSM
LHELLRLQEIQLVGGQLAVVEPYAFRQLNY
LRVLNVSGNQLTLEESVFHSGNLETLLIL
DSNPLACDCRLLWVFRRRWRLNFNRQQPT
CATPEFVQGKEFKDFPDVLLPNYFTCRA
RIRDRAKQVVFVDEGHTVQFVCRADGDPP
PAILWLSPRKHLVSAKSNGRLLTVFPDGTLE
VRYAQVQDNGTYLCIAANAGGND SMPAHL
HVRSPDWP HQPNKTF AFISNQPGEGEA
NSTRATVPFPFDIKTLIIATTMGFISFLGVV
LFCLVLLFLWSRGKGN TKH NIEIEYVPRKS
DAGISSADAPRKFNMKMI

FIG. 3

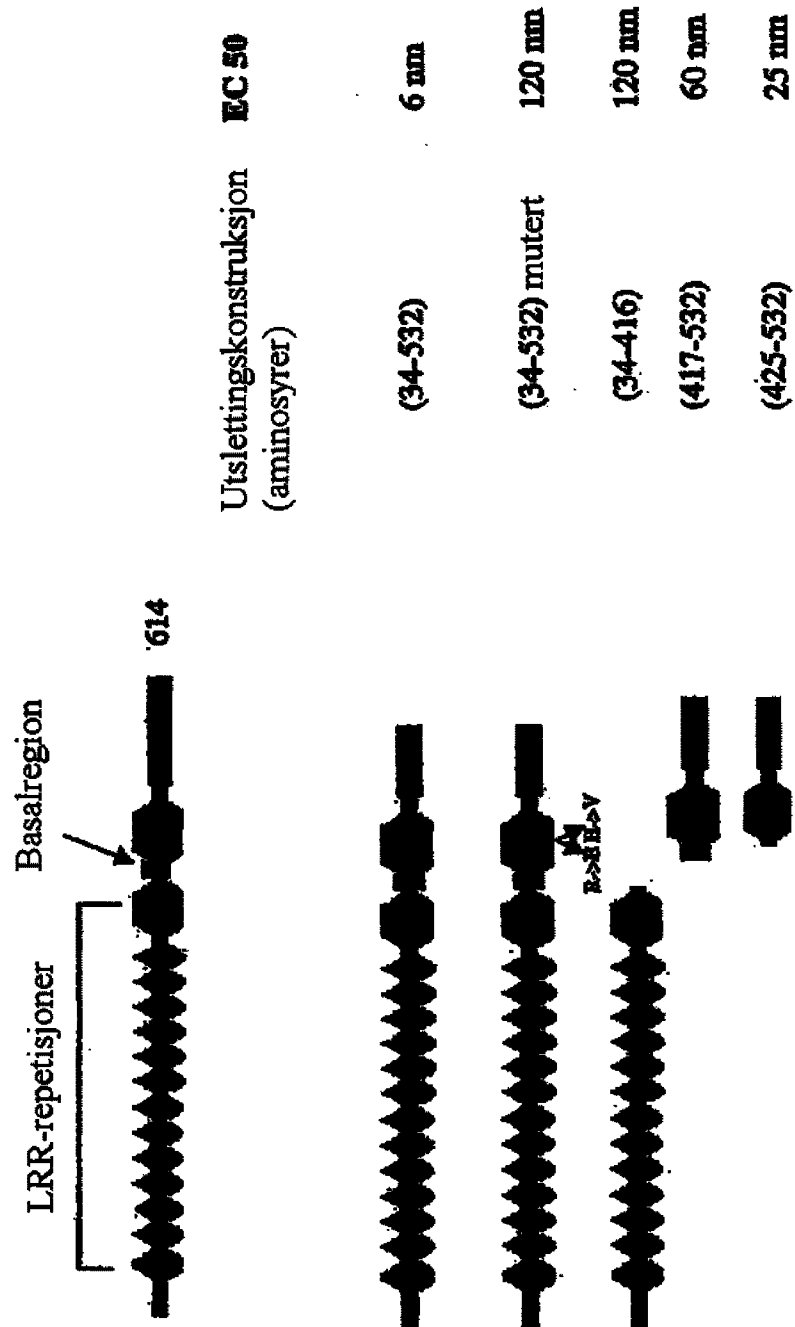


FIG. 4

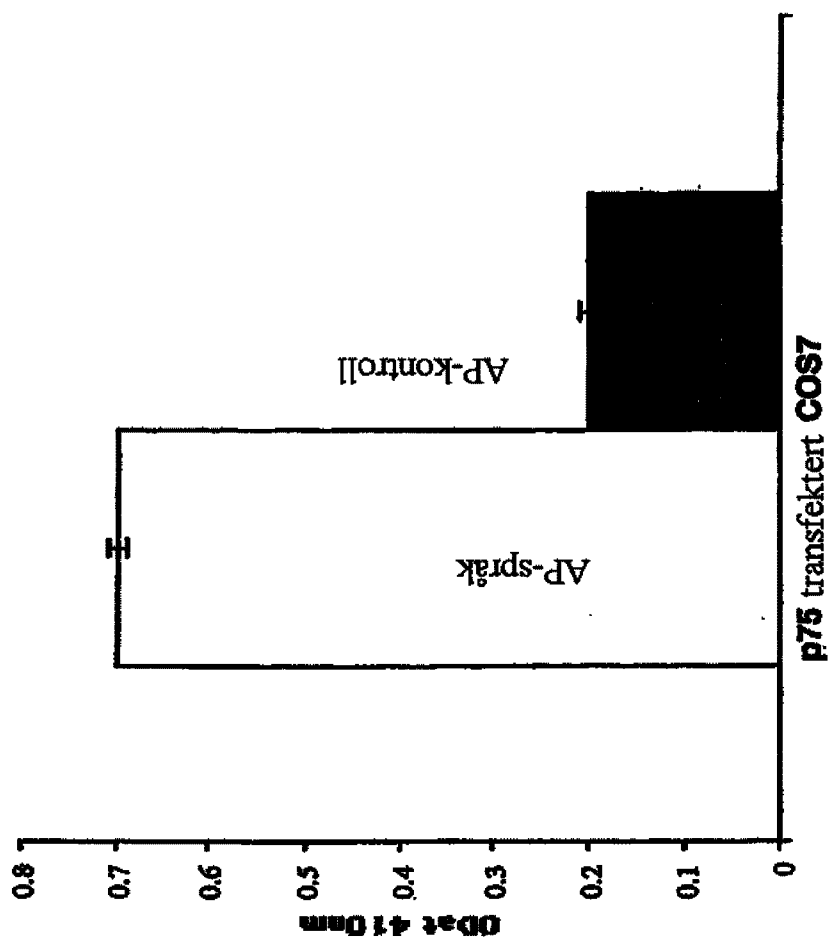
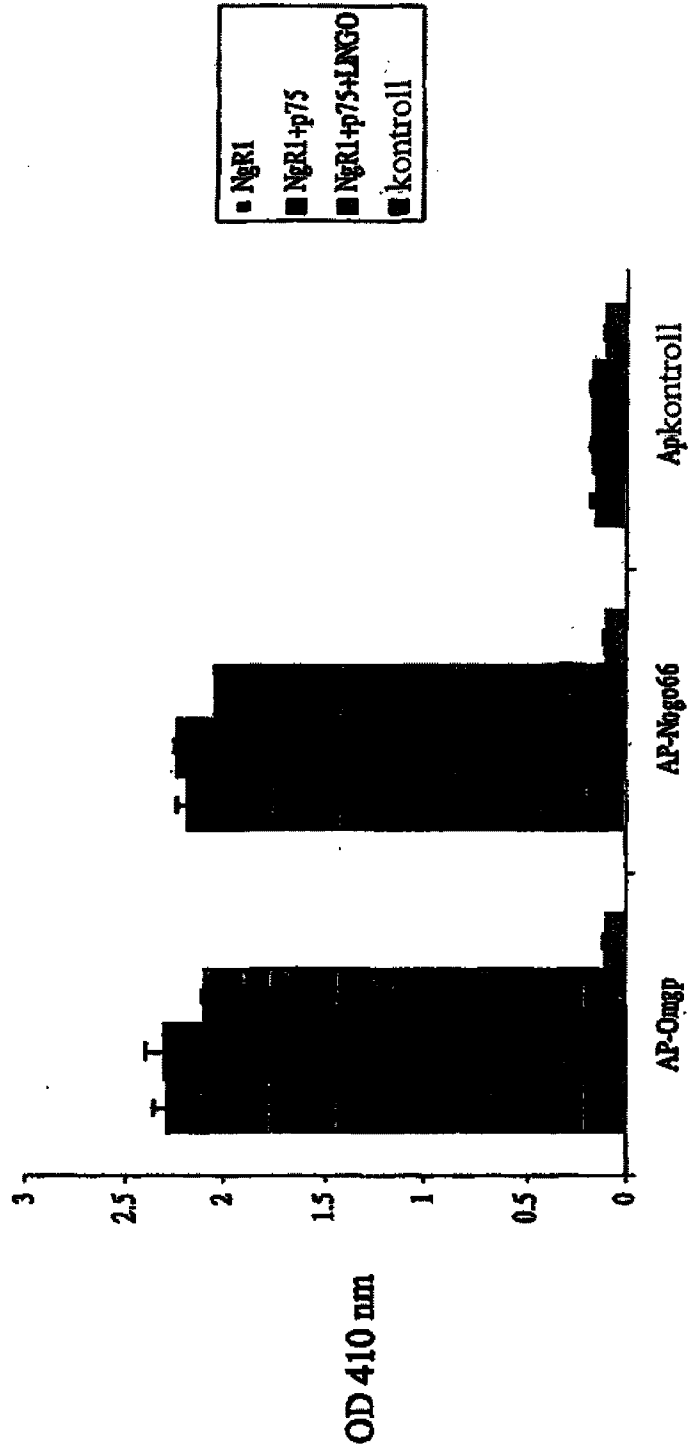
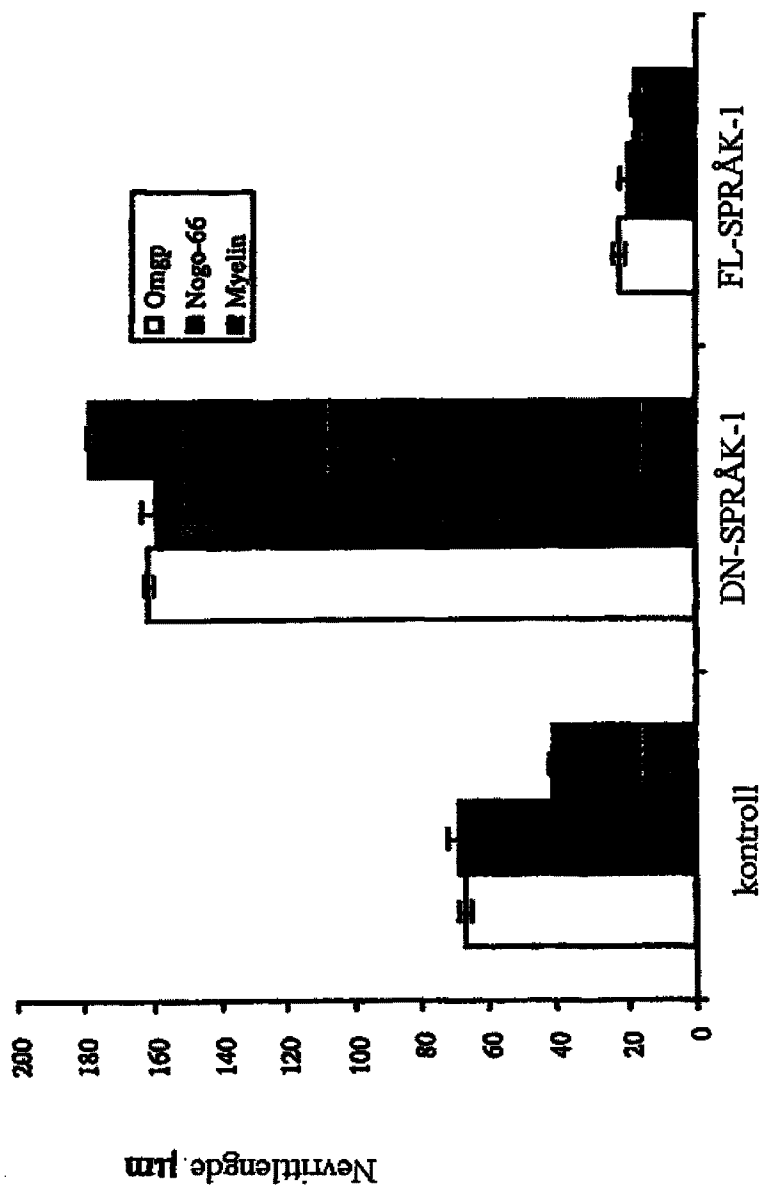


FIG. 5



7/9

FIG. 6



8/9

FIG. 7

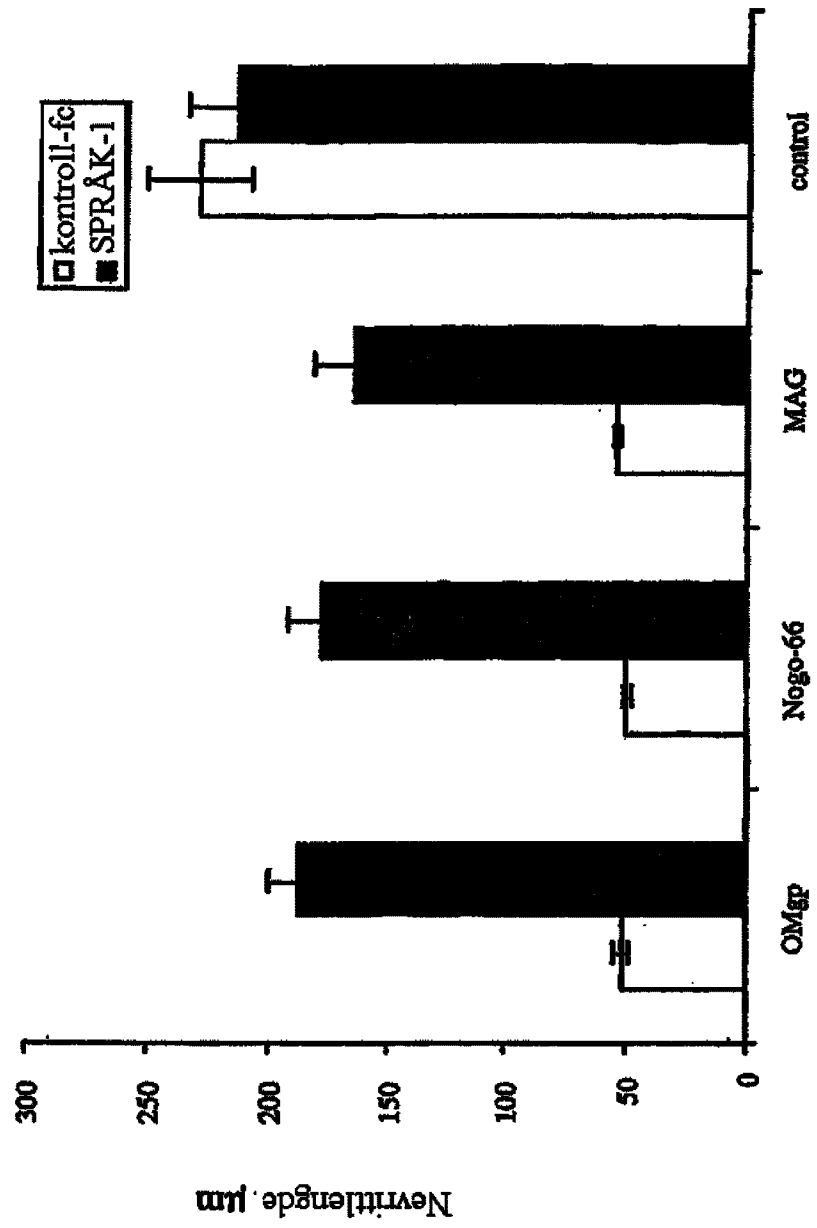


FIG. 9

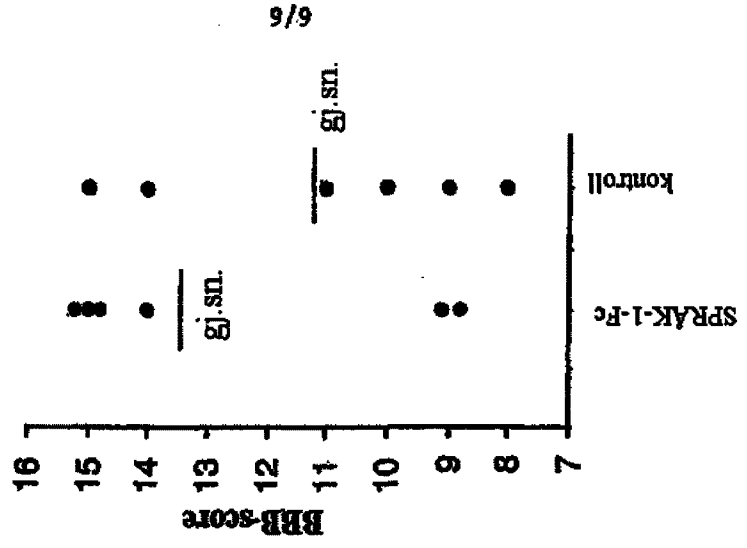


FIG. 8

