

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 030716

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2018.09.28

(51) Int. Cl. A61K 39/395 (2006.01)

(21) Номер заявки
201492102

(22) Дата подачи заявки
2013.05.14

(54) АНТАГОНИСТЫ LINGO-2 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ, В КОТОРЫХ УЧАСТВУЮТ ДВИГАТЕЛЬНЫЕ НЕЙРОНЫ

(31) 61/646,611; 61/798,398

(56) WO-A1-2011121257

(32) 2012.05.14; 2013.03.15

US-A1-20100143362

(33) US

US-A1-20090246189

(43) 2015.04.30

US-A1-20100131432

(86) PCT/US2013/040988

KOTLIAROV et al. "Correlation Analysis

(87) WO 2013/173364 2013.11.21

between Single-Nucleotide Polymorphism and

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
БАЙОДЖЕН МА ИНК. (US)

Expression Arrays in Gliomas Identifies Potentially

Relevant Target Genes". Cancer Res 69: 1596-1603.

03 February 2009, entire document

(72) Изобретатель:
Май Ша, Пепински Р. Блэйк (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к способу лечения заболевания, связанного с двигательными нейронами, у человека, нуждающегося в этом, включающему введение человеку терапевтически эффективного количества композиции, содержащей антагонист LINGO-2, где антагонист LINGO-2 представляет собой антитело LINGO-2 или его связывающий антиген фрагмент, который преимущественно связывается с LINGO-2.

B1

030716

030716
B1

Уровень техники изобретения

Двигательные нейроны представляют собой нейроны, которые контролируют функцию мышц. Они расположены в центральной нервной системе и содержат аксоны, которые простираются вовне центральной нервной системы для того, чтобы контролировать мышцы. Обычно верхние двигательные нейроны, которые располагаются в мозге, передают сигналы нижним двигательным нейронам, которые располагаются в спинном мозге, и нижние двигательные нейроны направляют мышечную активность. Мышицы, конечно, являются важными для многих активностей, включая дыхание, глотание, говорение и хождение. Следовательно, повреждение двигательных нейронов или ослабление функционирования двигательных нейронов может оказывать разрушительные клинические эффекты, и обнаружен ряд состояний, связанных с двигательными нейронами.

Такие состояния включают, но не ограничиваясь ими, следующие заболевания, расстройства и повреждения: амиотрофический боковой склероз (ALS), первичный латеральный склероз (PLS), прогрессирующую мышечную атрофию (PMA), наследственный спастический парапарез (HSP), спинобульбарную мышечную атрофию, связанную с X хромосомой (SBMA; болезнь Кеннеди), прогрессирующий бульбарный паралич, псевдобульбарный паралич, спинальную мышечную атрофию (SMA), постполиомиелитный синдром (PPS), болезнь Хантингтона, эссенциальный тремор (ET), болезнь двигательных нейронов, паралич и болезнь Паркинсона. ALS является одним, выделяющимся из данных заболеваний, развивающимся у 1-2 из 100000 человек каждый год. ALS представляет собой быстро прогрессирующую заболевание, которое связано с разрушением как верхних, так и нижних двигательных нейронов и которое приводит в результате к потере произвольного движения мышц.

Некоторые модифицирующие заболевания терапии являются общедоступными для ALS и других заболеваний, связанных с двигательными нейронами, включая применение рилузола, который блокирует определенные натриевые каналы, связанные с поврежденными нейронами. Тогда как такая терапия может замедлять развитие заболевания, в настоящее время нет лекарственных средств против болезни двигательных нейронов. Следовательно, терапии, которые способствуют регенерации аксонов двигательных нейронов и/или способствуют выживаемости двигательных нейронов, востребованы для пациентов с заболеваниями, связанными с недостаточностью функционирования двигательных нейронов.

Краткое описание изобретения

LINGO-2 (FLJ31810, белок 2, взаимодействующий с pogo рецепторами и содержащий иммуноглобулиноподобный домен и богатые лейцином повторы, LERN3, нейрональный белок с богатыми лейцином повторами 3, нейрональный белок с богатыми лейцином повторами 6C, LRRN6C, PRO31993 или UNQ9234) экспрессируется в кортикальных нейронах и нейронах ганглия заднего корешка (DRG) и отрицательно регулирует выживаемость двигательных нейронов и длину аксонов двигательных нейронов. Антагонисты LINGO-2 могут быть использованы, чтобы способствовать выживаемости и росту двигательных нейронов как *in vivo*, так и *in vitro*. Например, антитела, их антигены связывающие фрагменты и их производные можно использовать в качестве антагонистов LINGO-2. Растворимые полипептиды LINGO-2 и нуклеиновые кислоты, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, который соответствует области LINGO-2, можно также применять в качестве антагонистов LINGO-2. Соответственно, настоящее изобретение относится к способам стимулирования выживаемости двигательных нейронов и росту аксонов двигательных нейронов путем контакта двигательного нейрона с антагонистом LINGO-2.

Настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания, связанного с двигательными нейронами у млекопитающего, включающему введение нуждающемуся в этом млекопитающему терапевтически эффективного количества композиции, содержащей антагонист LINGO-2, где антагонист LINGO-2 представляет собой антитело LINGO-2 или его связывающий антиген фрагмент, который преимущественно связывается с LINGO-2.

В одном из вариантов осуществления изобретения указанное заболевание выбрано из группы, состоящей из амиотрофического бокового склероза (ALS), первичного латерального склероза (PLS), прогрессирующей мышечной атрофии (PMA), наследственного спастического парапареза (HSP), спинобульбарной мышечной атрофии, связанной с X хромосомой (SBMA; болезни Кеннеди), прогрессирующего бульбарного паралича, псевдобульбарного паралича, спинальной мышечной атрофии (SMA), постполиомиелитного синдрома (PPS), болезни Хантингтона, эссенциального тремора (ET), болезни двигательных нейронов, паралича и болезни Паркинсона.

В другом варианте осуществления изобретения указанное заболевание представляет собой амиотрофический боковой склероз (ALS).

В следующем варианте осуществления изобретение относится к способу, в котором указанный антагонист LINGO-2 вводят болюсной инъекцией или непрерывным вливанием.

В еще одном варианте осуществления изобретение относится к способу, в котором указанный антагонист LINGO-2 вводят непосредственно в центральную нервную систему.

В следующем варианте осуществления изобретение относится к способу, в котором указанный антагонист LINGO-2 вводят системно.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 - количественная ПЦР тканей крысы. LINGO-2 значительно экспрессируется в тканях мозга взрослых крыс. Количественную оценку экспрессии мРНК LINGO-2 осуществляли количественной ПЦР.

Фиг. 2 - количественная ПЦР тканей Р6 мыши. LINGO-2 значительно экспрессируется в тканях спинного мозга и головного мозга мышей на 6 день постнатального периода (Р6). Количественную оценку экспрессии мРНК LINGO-2 осуществляли количественной ПЦР.

Фиг. 3 - количественная ПЦР популяций нейронов крыс. LINGO-2 значительно экспрессируется в нейронах коры головного мозга и ганглии заднего корешка (DRG). Количественную оценку экспрессии мРНК LINGO-2 осуществляли количественной ПЦР.

Фиг. 4 - LINGO-2-Fc и анти-LINGO-2 антитело способствуют выживаемости двигательных нейронов. Человеческие двигательные нейроны обрабатывали арсенитом натрия в течение 30 мин и восстанавливали в присутствии или IgG человека (контроль), растворимого LINGO-2-Fc, или Fab анти-LINGO-2 антитела С09. После выдерживания двигательные нейроны окрашивали иммуноцитохимией анти-βIII тубулином и антineйрофиламентом.

Фиг. 5 - LINGO-2-Fc способствует росту аксонов двигательных нейронов. Двигательные нейроны из спинного мозга эмбрионов крыс (E16) выделяли градиентным центрифугированием Nycodenz. Выделенные двигательные нейроны обрабатывали арсенитом натрия в течение 30 мин и восстанавливали в присутствии или IgG человека или растворимого LINGO-2-Fc. После выдерживания двигательные нейроны окрашивали иммуноцитохимией антineйрофиламентом.

Фиг. 6 - уровень экспрессии LINGO-2 положительно регулируется у мышей SODG93A. Концентрацию РНК LINGO-2 у 65-дневных мышей дикого типа и SODG93A измеряли, применяя гибридизацию *in situ*. Считали количество LINGO-2 положительных клеток в областях центрального рога из каждой группы мышей. Графики показывают количество LINGO-2 положительных клеток (слева) и процент LINGO-2 положительных клеток (справа).

Фиг. 7 - анти-LINGO-2 антитело положительно регулирует фосфорилирование АКТ. Степень фосфорилирования АКТ измеряли вестерн-блоттингом в контрольных образцах и образцах, обработанных анти-LINGO-2 антителом С09 или контрольным антителом.

Фиг. 8 - анти-LINGO-2 антитело способствует дифференциации олигодендроцитов. Количество миelin-ассоциированного гликопротеина (MAG) и основного белка миелина (MBP) измеряли в контрольных образцах и образцах, обработанных анти-LINGO-2 антителом С09 при концентрациях 1, 3 или 10 мкг/мл.

Подробное описание изобретения

I. Определения.

Если не определено иное, все технические и научные термины, применяемые в настоящем описании, имеют такое же значение, как обычно известно специалисту в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. В случае конфликта настоящее описание, включающее определения, будет определяющим. Если иное не предусмотрено требованиями контекста, термины в единственном числе будут включать ссылки на множественное число и термины во множественном числе будут включать ссылки в единственном числе. Все публикации, патенты и другие ссылки, приводимые в настоящем описании, включены посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей, как если бы было указано, что каждая отдельная публикация или патентная заявка специально и отдельно включена посредством ссылки.

Хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные способам и материалам, описанным в настоящем документе, можно применять на практике или при испытании настоящего изобретения, подходящие способы и материалы описаны ниже. Материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не предполагаются для ограничения. Другие особенности и преимущества настоящего изобретения будут очевидны из подробного описания и формулы изобретения.

Для того чтобы дополнительно определить настоящее изобретение, приводятся следующие термины и определения.

Следует отметить, что термин элемента в единственном числе относится к одному или более таким элементам. Например, подразумевается, что "иммуноглобулиновая молекула" представляет собой одну или более иммуноглобулиновых молекул. Таким образом, термины в единственном числе "один или более" и "по меньшей мере один" можно применять взаимозаменяя в настоящем описании.

Предполагается, что термин "полинуклеотид" включает единичную нуклеиновую кислоту, а также множество нуклеиновых кислот, и он относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты или конструкту, например матричной РНК (мРНК) или плазмидной ДНК (пДНК). Полинуклеотид может содержать стандартную фосфодиэфирную связь или нестандартную связь (например, амидную связь, такую как присутствующая в пептидо-нуклеиновых кислотах (ПНК)). Термин "нуклеиновая кислота" относится к любому одному или более сегментам нуклеиновой кислоты, например ДНК или РНК фрагментам, присутствующим в полинуклеотиде. Под "выделенной" нуклеиновой кислотой или полинуклеотидом подразумевают молекулу нуклеиновой кислоты, ДНК или РНК, которая удалена из ее природного окружения. Например, рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий анти-LINGO-2 связывающую молекулу, на-

пример антитело или его связывающий антиген фрагмент, содержащийся в векторе, считают выделенным. Дополнительные примеры выделенного полинуклеотида включают рекомбинантные полинуклеотиды, содержащиеся в гетерологичных клетках-хозяевах, или очищенные (частично или по существу) полинуклеотиды в растворе. Выделенные молекулы РНК включают *in vivo* или *in vitro* транскрипты РНК полинуклеотидов. Выделенные полинуклеотиды или нуклеиновые кислоты дополнительно включают молекулы, полученные синтетически. Кроме того, полинуклеотид или нуклеиновая кислота может представлять собой или может содержать регуляторный элемент, такой как промотор, участок связывания рибосомы или терминатор транскрипции. Полинуклеотид может состоять из любого полиривнуклеотида или полидезоксирибонуклеотида, который может представлять собой немодифицированную РНК или ДНК или модифицированную РНК или ДНК. Например, полинуклеотиды могут состоять из одно- и двухцепочечной ДНК, ДНК, которая представляет собой смесь одно- и двухцепочечных областей, одно- и двухцепочечной РНК, и РНК, которая представляет собой смесь одно- и двухцепочечных областей, гибридных молекул, содержащих ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или, более часто, двухцепочечными или смесью одно- и двухцепочечных областей. Кроме того, полинуклеотиды могут состоять из трехцепочечных областей, содержащих РНК или ДНК или как РНК, так и ДНК. Полинуклеотиды могут содержать один или более модифицированных оснований или ДНК, или РНК остаты, модифицированные для увеличения стабильности или по другим причинам. "Модифицированные" основания включают, например, основания, содержащие тритий, и нестандартные основания, такие как инозин. Ряд модификаций можно вводить в ДНК и РНК. Таким образом, "полинуклеотид" включает химически, ферментативно или метаболически модифицированные формы.

Как применяют в настоящем описании, "кодирующая область" представляет собой часть нуклеиновой кислоты, которая состоит из кодонов, транслируемых в аминокислоты. Хотя "стоп-кодон" (TAG, TGA или TAA) не транслируется в аминокислоту, его можно считать частью кодирующей области, но любые фланкирующие последовательности, например промоторы, участки связывания рибосомы, терминаторы транскрипции, интроны и подобные, не являются частью кодирующей области. Две или более кодирующие области могут присутствовать в одном полинуклеотидном конструкте, например в одном векторе, или в различных полинуклеотидных конструктах, например в различных (отличных) векторах. Более того, любой вектор может содержать одну кодирующую область или может содержать две или более кодирующие области, например один вектор может отдельно кодировать вариабельную область тяжелой цепи иммуноглобулина и вариабельную область легкой цепи иммуноглобулина. Кроме того, вектор, полинуклеотид или нуклеиновая кислота могут кодировать гетерологичные кодирующие области или слитые или не слитые с нуклеиновой кислотой, кодирующей анти-LINGO-2 антагонист, например антитело или его фрагмент, вариант или производное. Гетерологичные кодирующие области включают, но без ограничения, специализированные элементы или мотивы, такие как секреторный сигнальный пептид или гетерологичный функциональный домен.

В определенных вариантах осуществления полинуклеотид или нуклеиновая кислота представляют собой ДНК. В случае ДНК полинуклеотид, содержащий нуклеиновую кислоту, которая нормально кодирует полипептид, может содержать промотор и/или другие элементы, контролирующие транскрипцию или трансляцию, функционально связанные с одной или более кодирующими областями. Функциональная связь есть тогда, когда кодирующая область для продукта гена, например полипептида, связана с одной или более регуляторными последовательностями таким способом, чтобы поместить экспрессию продукта гена под влияние или контроль регуляторной(ых) последовательности(ей). Два ДНК фрагмента (такие как область, кодирующая полипептид, и промотор, связанный с ней) являются "функционально связанными", если запуск функционирования промотора приводит в результате к транскрипции мРНК, кодирующей требуемый продукт гена, и если свойства связи между двумя ДНК фрагментами не препятствуют способности последовательностей, регулирующих экспрессию, направлять экспрессию продукта гена или не препятствуют способности ДНК матрицы быть транскрибированной. Таким образом, область промотора будет функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид, если промотор способен вызывать транскрипцию данной нуклеиновой кислоты. Промотор может представлять специфический для клетки промотор, который направляет существенную транскрипцию ДНК только в заранее определенные клетки. Другие элементы, контролирующие транскрипцию, помимо промотора, например энхансеры, операторы, репрессоры и сигналы терминации транскрипции, могут быть функционально связанны с полинуклеотидом, направляя специфическую для клетки транскрипцию. Подходящие промоторы и другие области, контролирующие транскрипцию, описаны в настоящем документе.

Ряд областей, контролирующих транскрипцию, известны специалисту в данной области техники. Они включают, но без ограничения, области, контролирующие транскрипцию, которые функционируют в клетках позвоночных, такие как, но не ограничиваясь ими, промоторные и энхансерные участки из цитомегаловирусов (предранний промотор, в сочетании с инtronом-А), вируса обезьян 40 (ранний промотор) и ретровирусов (таких как вирус саркомы Рауса). Другие области, контролирующие транскрипцию, включают области, полученные из генов позвоночных, такие как актин, белок теплового шока, бычий гормон роста и β -глобин кролика, а также другие последовательности, способные контролировать генную экспрессию в эукариотических клетках. Дополнительные подходящие области, контролирующие

транскрипцию, включают тканеспецифические промоторы и энхансеры, а также индуцибелльные лимфокинами промоторы (например, промоторы, индуцибелльные интерферонами или интерлейкинами).

Аналогично, ряд элементов, контролирующих трансляцию, известны специалисту в данной области техники. Они включают, но не ограничиваясь ими, участки связывания рибосом, кодоны, инициирующие и терминирующие трансляцию, и элементы, полученные из пикорнавирусов (в частности, участок внутренней посадки рибосомы или IRES, также известный как СITE последовательность).

В других вариантах осуществления полинуклеотид представляет собой РНК, например, в виде матричной РНК (мРНК).

Полинуклеотид и кодирующие области нуклеиновой кислоты могут быть связаны с дополнительными кодирующими областями, кодирующими секреторные или сигнальные пептиды, которые регулируют секрецию полипептида, кодируемого полинуклеотидом. Согласно сигнальной гипотезе белки, секрециируемые клетками млекопитающих, содержат сигнальный пептид или секреторную лидерную последовательность, которая отщепляется от зрелого белка после начала экспортации белковой цепи через эндоплазматический ретикулум. Специалистам в данной области техники известно, что полипептиды, секрециируемые клетками позвоночных, содержат сигнальный пептид, слитый с N-концом полипептида, который отщепляется от завершенного или "полнодлинного" полипептида, давая секрециируемую или "зрелую" форму полипептида. В определенных вариантах осуществления применяют нативный сигнальный пептид, например сигнальный пептид тяжелой цепи или легкой цепи иммуноглобулина, или функциональное производное данной последовательности, которая сохраняет способность направлять секрецию полипептида, который функционально связан с ней. Альтернативно, можно применять гетерологичный сигнальный пептид млекопитающего или его функциональное производное. Например, лидерную последовательность дикого типа можно замещать лидерной последовательностью активатора плазминогена ткани человека (TPA) или β -глюкуронидазы мыши.

Как применяют в настоящем описании, предполагается, что термин "полипептид" включает единичный "полипептид", а также множество "полипептидов", и он относится к молекуле, состоящей из мономеров (аминокислот), линейно соединенных амидными связями (также известными как пептидные связи). Термин "полипептид" относится к любой цепи или цепям двух или более аминокислот и не относится к конкретной длине продукта. Таким образом, пептиды, дипептиды, трипептиды, олигопептиды, "белок" "аминокислотная цепь" или любой другой применяемый термин, относящийся к цепи или цепям двух или более аминокислот, включены в определение "полипептида", и термин "полипептид" можно применять вместо или взаимозаменяя с любым из данных терминов. Также предполагается, что термин "полипептид" относится к продуктам постэкспрессионных модификаций полипептида, включая, но без ограничения, гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование, амидирование, дериватизацию любыми известными защитными/блокирующими группами, протеолитическое расщепление или модификацию неприродными аминокислотами. Полипептид можно получить из природного биологического источника или получить рекомбинантным способом, который необязательно транслируется из указанной последовательности нуклеиновой кислоты. Его можно получить любым способом, включая химический синтез.

Полипептид может иметь размер приблизительно 3 или более, 5 или более, 10 или более, 20 или более, 25 или более, 50 или более, 75 или более, 100 или более, 200 или более, 500 или более, 1000 или более или 2000 или более аминокислот. Полипептиды могут иметь определенную трехмерную структуру, хотя они необязательно имеют данную структуру. Полипептиды с определенной трехмерной структурой называют свернутыми, и полипептиды, которые не обладают определенной трехмерной структурой, но скорее могут принимать большое количество различных конформаций, называют несвернутыми. Как применяют в настоящем описании, термин гликопротеин относится к белку, конденсированному по меньшей мере с одной углеводной молекулой, которая присоединена к белку через боковую цепь, содержащую кислород или азот, аминокислотного остатка, например серинового остатка или аспарагинового остатка.

Под "выделенным" полипептидом или его фрагментом, вариантом или производным имеется в виду полипептид, который не находится в его природном окружении. Специальная степень очистки не требуется. Например, выделенный полипептид может быть выделен из его нативного или природного окружения. Полученные рекомбинантно полипептиды и белки, экспрессируемые в клетках-хозяевах, считаются выделенными, как и нативные или рекомбинантные полипептиды, которые выделены, фракционированы или частично или по существу очищены любым подходящим способом.

Полипептид может состоять из аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями или модифицированными пептидными связями, т.е. пептидных изостеров, и могут содержать аминокислоты, отличные от 20 кодируемых генами аминокислот (например, неприродные аминокислоты). Полипептиды могут быть модифицированы или природными способами, такими как посттрансляционный процессинг, или способами химической модификации, которые хорошо известны в данной области техники.

Термины "фрагмент", "вариант", "производное" и "аналог" при ссылке на антагонист LINGO-2 включают любые молекулы антагониста, которые способствуют выживаемости двигательных нейронов. Данные термины также включают любые молекулы антагониста, которые способствуют росту аксонов

двигательных нейронов. Растворимые полипептиды LINGO-2 могут включать протеолитические фрагменты LINGO-2, фрагменты с делецией и, в частности, фрагменты, которые могут легко достигать места действия при доставке животному. Полипептидные фрагменты дополнительно включают любую часть полипептида, которая содержит антигенный или иммуногенный эпитоп нативного полипептида, включая линейные, а также трехмерные эпитопы. Растворимые полипептиды LINGO-2 могут включать варианты области LINGO-2, включая фрагменты, как описано выше, а также полипептиды с измененными аминокислотными последовательностями в результате аминокислотных замещений, делеций или вставок. Варианты могут встречаться в природе, такие как аллельный вариант. Под "аллельным вариантом" имеются в виду альтернативные формы гена, занимающего указанный локус в хромосоме организма. Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, New York (1985). Неприродные варианты можно получить, применяя известные в данной области техники способы мутагенеза. Растворимые полипептиды LINGO-2 могут содержать консервативные или неконсервативные аминокислотные замены, делеции или присоединения. Антагонисты LINGO-2 могут также включать молекулы производных. Например, растворимые полипептиды LINGO-2 могут содержать области LINGO-2, которые изменены так, чтобы проявлять дополнительные признаки, не обнаруживаемые у нативного полипептида. Примеры включают белки слияния и белковые коньюгаты.

Консервативные замены включают замены в следующей группе: валин, аланин и глицин; лейцин, валин и изолейцин; аспарагиновая кислота и глютаминовая кислота; аспарагин и глютамин; серин, цистеин и треонин; лизин и аргинин и фенилаланин и тирозин. Неполярные гидрофобные аминокислоты включают аланин, лейцин, изолейцин, валин, пролин, фенилаланин, триптофан и метионин. Полярные природные аминокислоты включают глицин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин и глютамин. Положительно заряженные (основные) аминокислоты включают аргинин, лизин и гистидин. Отрицательно заряженные (кислые) аминокислоты включают аспарагиновую кислоту и глютаминовую кислоту. Любую замену одного члена приведенных выше полярных основных или кислых групп другим членом той же группы можно считать консервативной заменой.

Неконсервативные замены включают замены, в которых (i) остаток, содержащий электроположительную боковую цепь (например, Arg, His или Lys), заменен электроотрицательным остатком (например, Glu или Asp), (ii) гидрофильный остаток (например, Ser или Thr) заменен гидрофобным остатком (например, Ala, Leu, Ile, Phe или Val), (iii) цистеин или пролин заменен любым другим остатком или (iv) остаток, содержащий объемную гидрофобную или ароматическую боковую цепь (например, Val, Ile, Phe или Trp), заменен остатком, содержащим меньшую боковую цепь (например, Ala, Ser) или не содержащим боковой цепи (например, Gly).

Термины "процент идентичности последовательности" между двумя полинуклеотидными или полипептидными последовательностями относится к количеству идентичных совпадающих положений, разделяемых последовательностями в интервале сравнения, принимая во внимание вставки или делеции (т.е. пропуски), которые нужно ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей. Совпадающее положение представляет собой положение, где идентичный нуклеотид или аминокислота присутствуют как в целевой, так и в контрольной последовательностях. Пропуски, присутствующие в последовательности-мишени, не принимают во внимание, поскольку пропуски не являются нуклеотидами или аминокислотами. Аналогично, пропуски, присутствующие в контрольной последовательности, не принимают во внимание, поскольку принимают во внимание нуклеотиды или аминокислоты последовательности-мишени, а не нуклеотиды или аминокислоты из контрольной последовательности.

Процент идентичности последовательности рассчитывают определением количества положений, в которых присутствует остаток аминокислоты или основание нукleinовой кислоты в обеих последовательностях, получая количество совпадающих положений, деля количество совпадающих положений на суммарное количество положений в интервале сравнения и умножая результат на 100, с получением процента идентичности последовательности. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности последовательности между двумя последовательностями можно осуществлять, применяя легкодоступное программное обеспечение, и для онлайн применения и для скачивания. Имеются подходящие программы из различных источников и для выравнивания как белковых, так и нуклеотидных последовательностей. Одна подходящая программа для определения процента идентичности последовательности представляет собой b12seq, часть BLAST пакета программ, доступного на веб-сайте национального центра при правительстве США по биотехнологической информации BLAST (blast.ncbi.nlm.nih.gov). B12seq проводит сравнение двух последовательностей с применением или BLASTN или BLASTP алгоритма. BLASTN применяют для сравнения последовательностей нукleinовых кислот, тогда как BLASTP применяют для сравнения аминокислотных последовательностей. Другие подходящие программы представляют собой, например, Needle, Stretcher, Water или Matcher часть EMBOSS пакета биоинформационных программ, а также доступны в европейском институте биоинформатики (EBI) по адресу www.ebi.ac.uk/Tools/psa.

Каждая из различных областей в одной полинуклеотидной или полипептидной последовательности-мишени, которая совпадает с полинуклеотидной или полипептидной контрольной последовательностью, может иметь свой собственный процент идентичности последовательности. Следует отметить, что

величину процента идентичности последовательности округляют до одной десятой. Например, 80,11, 80,12, 80,13 и 80,14 округляют до 80,1, тогда как 80,15, 80,16, 80,17, 80,18 и 80,19 округляют до 80,2. Также следует отметить, что величина длины будет всегда представлять собой целое.

Специалисту в данной области техники будет ясно, что получение выравнивания последовательностей для расчета процента идентичности последовательности не ограничивается бинарными сравнениями двух последовательностей, определяемыми исключительно данными о первичных последовательностях. Выравнивание последовательностей может быть получено из множественных выравниваний последовательностей. Одна подходящая программа для получения множественного выравнивания последовательностей представляет собой ClustalW2, доступную по www.clustal.org. Другая подходящая программа представляет собой MUSCLE, доступную по www.drive5.com/muscle/. ClustalW2 и MUSCLE альтернативно являются доступными, например, в EBI.

Также будет ясно, что выравнивание последовательностей можно получать объединением данных о последовательности с данными из инородных источников, такими как структурные данные (например, кристаллографические структуры белков), функциональные данные (например, положение мутаций) или филогенетические данные. Подходящая программа, которая интегрирует инородные данные, давая множественное выравнивание последовательностей, представляет собой T-Coffee, имеющуюся по www.tcoffee.org и, альтернативно, имеющуюся, например, в EBI. Также ясно, что окончательное выравнивание, применяемое для расчета процента идентичности последовательности, может быть выбрано или автоматически, или вручную.

Термины "фрагмент", "вариант", "производное" и "аналог" при ссылке на анти-LINGO-2 антитела или полипептиды антитела включают любой полипептид(ы), который сохраняет по меньшей мере часть из антигенсвязывающих свойств соответствующего антитела или полипептида антитела. Фрагменты полипептидов включают протеолитические фрагменты, а также делеционные фрагменты в добавление к специфическим фрагментам антитела, обсуждаемым в другом месте настоящего описания. Если специально не указано иное, как применяют в настоящем описании, "его фрагмент" со ссылкой на антитело относится к иммunoспецифическому фрагменту, т.е. антигенспецифическому фрагменту. Варианты анти-LINGO-2 антитела и полипептидов антитела включают фрагменты, как описано выше, а также полипептиды с измененными аминокислотными последовательностями в результате аминокислотных замен, делеций или вставок. Варианты могут быть природными или неприродными. Вариантные полипептиды могут содержать консервативные или неконсервативные аминокислотные замены, делеций или вставки. Вариантные полипептиды можно также называть "полипептидными аналогами". Как применяют в настоящем описании, "производное" анти-LINGO-2 антитела или полипептида антитела относится к рассматриваемому полипептиду, содержащему один или более остатков, химически дериватизированных реакцией функциональной боковой группы.

Также включенными в качестве "производных" являются такие пептиды, которые содержат один или более природных аминокислотных производных из 20 стандартных аминокислот. Например, 4-гидроксипролин можно применять вместо пролина; 5-гидроксизизин можно применять вместо лизина; 3-метилгистидин можно применять вместо гистидина; гомосерин можно применять вместо серина; и орнитин можно применять вместо лизина. Производные анти-LINGO-2 антител и антител полипептидов могут включать полипептиды, которые модифицированы так, чтобы они обладали дополнительными особенностями, не обнаруживаемыми у контрольного антитела или антитела полипептида.

"Полипептидный фрагмент" относится к короткой аминокислотной последовательности полипептида. Белковые фрагменты могут быть "автономными" или содержаться в большем полипептиде, фрагмент которого образует часть области. Репрезентативные примеры полипептидных фрагментов включают, например, фрагменты, содержащие приблизительно 5 аминокислот, приблизительно 10 аминокислот, приблизительно 15 аминокислот, приблизительно 20 аминокислот, приблизительно 30 аминокислот, приблизительно 40 аминокислот, приблизительно 50 аминокислот, приблизительно 60 аминокислот, приблизительно 70 аминокислот, приблизительно 80 аминокислот, приблизительно 90 аминокислот, приблизительно 100 аминокислот, приблизительно 200 аминокислот, приблизительно 300 аминокислот, приблизительно 400 аминокислот, приблизительно 500 аминокислот, приблизительно 600 аминокислот и приблизительно 1000 аминокислот в длину.

"Связывающая молекула" или "антигенсвязывающая молекула" относится, в широком смысле, к молекуле, которая специфически связывается с антигенной детерминантой. В одном из вариантов осуществления связывающая молекула специфически связывается с LINGO-2, например полноразмерным LINGO-2 или зрелым LINGO-2. В другом варианте осуществления связывающая молекула представляет собой антитело или его связывающий антиген фрагмент.

Анти-LINGO-2 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты и производные описаны в настоящем документе. Если специально не ссылаются на полноразмерные антитела, такие как природные антитела, термин "анти-LINGO-2 антитела" включает полноразмерные антитела, а также антигенсвязывающие фрагменты, варианты, аналоги или производные данных антител, например природное антитело или иммуноглобулиновые молекулы, или рекомбинантные молекулы антител, или фрагменты, которые связываются с антигеном способом, аналогично молекулам антител.

В определенных вариантах осуществления аминокислотные замены представляют собой консервативную аминокислотную замену. Альтернативно, мутации можно вводить случайным образом вдоль всей или части кодирующей последовательности, например, насыщающим мутагенезом, и полученные в результате мутанты можно скринировать на биологическую активность для определения мутантов, которые сохраняют активность (например, способность связываться с полипептидом LINGO-2, например, человека, примата, мыши или любой комбинацией LINGO-2 человека, крысы или мыши). Данные варианты (или их производные) "человеческих" или "полностью человеческих" антител можно также называть человеческими или полностью человеческими антителами, которые "оптимизированы" или "оптимизированы для связывания с антигеном", и они включают антитела, которые обладают повышенной аффинностью в отношении антигена.

В одном из вариантов осуществления антагонисты LINGO-2 представляют собой молекулы "антитела" или "иммуноглобулина" или их антигенсвязывающие фрагменты, например природные молекулы антител или иммуноглобулинов, или синтезированные молекулы антител или фрагментов, которые связываются с антигеном способом, аналогично молекулам антител. Термины "антитело" и "иммуноглобулин" применяют в настоящем описании взаимозаменяя. Антитело или иммуноглобулин содержит, по меньшей мере, вариабельный домен тяжелой цепи и обычно содержит, по меньшей мере, вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи. Основные иммуноглобулиновые структуры в системах позвоночных являются относительно хорошо изученными. См., например, Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988).

В природных антителах шесть "определяющих комплементарность областей" или "CDR", присутствующих в каждом антигенсвязывающем домене, представляют собой короткие не непрерывные последовательности аминокислот, которые расположены специфически, образуя антигенсвязывающий домен, по мере того, как антитело принимает свою трехмерную конфигурацию в водном окружении. Оставшиеся аминокислоты в антигенсвязывающих доменах, называемые "каркасными" областями, обладают меньшей межмолекулярной вариабельностью. Каркасные области в значительной степени принимают конформацию β -складчатого слоя и CDR образуют петли, которые соединяют и в некоторых случаях образуют часть β -складчатой структуры. Таким образом, каркасные области служат для образования каркаса, который обеспечивает расположение CDR в правильном направлении межцепочечными нековалентными взаимодействиями. Антигенсвязывающий домен, образованный размещенными CDR, определяет поверхность комплементарность к эпитопу на иммунореактивном антигене. Данная комплементарная поверхность способствует нековалентному связыванию антитела с его когнатным эпитопом. Специалист в данной области техники может легко определить аминокислоты, содержащие CDR и каркасные области, для любой указанной вариабельной области тяжелой или легкой цепи соответственно, поскольку они четко обозначены (см., "Sequences of Proteins of Immunological Interest," Kabat, E., et al., U.S. Department of Health and Human Services, (1983) и Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987), которые включены в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте).

В случае, когда имеется два или более определения термина, которые применяют и/или приняты в данной области техники, предполагается, что определение термина, как применяют в настоящем описании, включает все данные значения, если явно не указано иное. Конкретный пример представляет собой применение термина "определяющая комплементарность область" ("CDR"), описывающего не непрерывные антигенсвязывающие центры, находящиеся в вариабельной области полипептидов как тяжелой, так и легкой цепей. Данная конкретная область описана Kabat et al. (1983), U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" и Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), которые включены в настоящее описание посредством ссылки, где определения включают перекрывание или поднаборы аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. Тем не менее, предполагается, что применение любого из двух определений для ссылки на CDR антитела или его варианты включено в объем термина, как определено и применяют в настоящем описании. Подходящие аминокислотные остатки, которые включают CDR, как определено каждой из приведенных выше ссылок, приведены ниже в табл. 1 в качестве сравнения. Точное количество остатков, которое включает конкретную CDR, может изменяться в зависимости от последовательности и размера CDR. Специалисты в данной области техники могут стандартным способом определить, какие остатки содержат указанную CDR, получая аминокислотную последовательность вариабельной области антитела.

Таблица 1
CDR определения¹

	Kabat	Chothia
VH CDR1	31-35	26-32
VH CDR2	50-65	52-58
VH CDR3	95-102	95-102
VL CDR1	24-34	26-32
VL CDR2	50-56	50-52
VL CDR3	89-97	91-96

¹ Количество всех определений CDR в табл. 1 соответствует системам нумерации, приведенным Kabat et al. (см. ниже).

Kabat et al. также определяют систему нумерации для последовательностей вариабельного домена, которая является применимой для любого антитела. Специалист в данной области техники может однозначно применять данную систему "нумерации по Кабату" к любой последовательности вариабельного домена, не полагаясь на любые экспериментальные данные, помимо самой последовательности. Как применяют в настоящем описании, "нумерация по Кабату" относится к системе нумерации, указанной Kabat et al. U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983). Если не указано иное, ссылки на нумерацию конкретных положений аминокислотных остатков в антитеle LINGO-2 или его связывающем антиген фрагменте, варианте или производном, соответствуют системе нумерации по Кабату.

В одном из вариантов осуществления антигенсвязывающая молекула содержит по меньшей мере одну CDR тяжелой или легкой цепи молекулы контрольного антитела. В другом варианте осуществления антигенсвязывающая молекула содержит по меньшей мере две CDR из одной или более молекул контрольных антител. В другом варианте осуществления антигенсвязывающая молекула содержит по меньшей мере три CDR из одной или более молекул контрольных антител. В другом варианте осуществления антигенсвязывающая молекула содержит по меньшей мере четыре CDR из одной или более молекул контрольных антител. В другом варианте осуществления антигенсвязывающая молекула содержит по меньшей мере пять CDR из одной или более молекул контрольных антител. В другом варианте осуществления антигенсвязывающая молекула содержит по меньшей мере шесть CDR из одной или более молекул контрольных антител. В определенных вариантах осуществления молекула контрольного антитела представляет собой C09. Примеры молекул антител, содержащих по меньшей мере одну CDR, которые могут быть включены в рассматриваемые антигенсвязывающие молекулы, известны в данной области техники, и примеры молекул описаны в настоящем документе.

Если специально не ссылаются на полноразмерные антитела, такие как природные антитела, термин "анти-LINGO-2 антитела" включают полноразмерные антитела, а также антигенсвязывающие фрагменты, варианты, аналоги или производные данных антител, например, молекулы природных антител или иммуноглобулинов, или синтезированные молекулы антител или фрагменты, которые связываются с антигеном способом, аналогично молекулам антител.

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты включают, но не ограничиваясь ими, поликлональные, моноклональные, мультиспецифические, человеческие, гуманизированные, приматизированные или химерные антитела, одноцепочечные антитела, эпитоп-связывающие фрагменты, например Fab, Fab' и F(ab')₂, Fd, Fvs, одноцепочечный Fvs (scFv), одноцепочечные антитела, соединенный дисульфидными связями Fvs (sdFv), фрагменты, содержащие или V_L или V_H домен, фрагменты, полученные экспрессирующей Fab библиотекой, и анти-идиотипические (анти-Id) антитела (включая, например, анти-Id антитела к связывающим молекулам, описанным в настоящем документе). ScFv молекулы являются известными в данной области техники и описаны, например, в патенте США 5892019. Молекулы иммуноглобулинов или антител могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂) или подкласса молекул иммуноглобулинов.

Фрагменты антител, включая одноцепочечные антитела, могут содержать вариабельную область(и) отдельно или в комбинации с целым или частью из следующих: шарнирная область, C_H1, C_H2 и C_H3 домены. Также включенными в настоящее изобретение являются антигенсвязывающие фрагменты, также содержащие любую комбинацию вариабельной области(ей) с шарнирной областью, C_H1, C_H2 и C_H3 доменами. Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть любого животного происхождения, включая птиц и млекопитающих. В определенных вариантах осуществления антитела представляют собой антитела человека, мыши, осла, кролика, козы, морской свинки, верблюда, ламы, лошади или курицы. В другом варианте осуществления вариабельная область может быть из класса хрящевых (например, из акул).

Как применяют в настоящем описании, термин "часть тяжелой цепи" включает аминокислотные последовательности, полученные из тяжелой цепи иммуноглобулина. Полипептид, содержащий часть тяжелой цепи, содержит по меньшей мере один из: C_H1 домена, шарнирного (например, верхней, средней и/или нижней шарнирной области) домена, C_H2 домена, C_H3 домена или их варианта или фрагмента. Например, связывающий полипептид может содержать полипептидную цепь, содержащую C_H1 домен; полипептидную цепь, содержащую C_H1 домен, по меньшей мере часть шарнирного домена и C_H2 домен; полипептидную цепь, содержащую C_H1 домен и C_H3 домен; полипептидную цепь, содержащую C_H1 домен, по меньшей мере часть шарнирного домена и C_H3 домен, или полипептидную цепь, содержащую C_H1 домен, по меньшей мере часть шарнирного домена, C_H2 домен и C_H3 домен. В другом варианте осуществления полипептид содержит полипептидную цепь, содержащую C_H3 домен. Кроме того, связывающий полипептид может не содержать по меньшей мере часть C_H2 домена (например, весь или часть C_H2 домена). Как изложено выше, специалисту в данной области техники будет очевидно, что данные домены (например, части тяжелой цепи) можно модифицировать так, чтобы они отличались по аминокислотной последовательности от природной иммуноглобулиновой молекулы. Части тяжелой цепи связывающего полипептида можно получить из различных иммуноглобулиновых молекул. Например, часть тяжелой цепи полипептида может содержать C_H1 домен, полученный из молекулы IgG₁, и шарнирную

область, полученную из молекулы IgG₃. В другом примере часть тяжелой цепи может содержать шарнирную область, полученную частично из молекулы IgG₁ и частично из молекулы IgG₃. В другом примере часть тяжелой цепи может содержать химерный шарнир, полученный частично из молекулы IgG₁ и частично из молекулы IgG₄.

Как применяют в настоящем описании, термин "часть легкой цепи" включает аминокислотные последовательности, полученные из легкой цепи иммуноглобулина. Обычно часть легкой цепи содержит по меньшей мере один из V_L или C_L домена.

Анти-LINGO-2 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, описанные в настоящем документе, можно описать или указать, исходя из эпитопа(ов) или части(ей) антигена, например, полипептида-мишени, описанного в настоящем документе, (например, полноразмерного или зрелого LINGO-2), который они распознают или специфически связываются. Часть полипептида-мишени, которая специфически взаимодействует с антигенсвязывающим доменом антитела, представляет собой "эпипот" или "антигенную детерминанту". Полипептид-мишень может содержать один эпипот, но обычно содержит по меньшей мере два эпипота и может содержать любое количество эпипотов, в зависимости от размера, конформации и типа антигена. Более того, следует отметить, что "эпипот" в полипептиде-мишени может представлять собой или может содержать неполипептидные элементы, например эпипот может содержать углеводную боковую цепь.

Считают, что минимальный размер пептидного или полипептидного эпипота для антитела составляет приблизительно 4-5 аминокислот. Пептидные или полипептидные эпипоты могут содержать по меньшей мере 7, по меньшей мере 9 или по меньшей мере приблизительно от 15 до приблизительно 30 аминокислот. Поскольку CDR может распознавать антигенный пептид или полипептид в его третичной форме, аминокислоты, содержащие эпипот, необязательно должны быть непрерывными и в некоторых случаях, могут даже быть не в одной пептидной цепи. Пептидный или полипептидный эпипот, распознаваемый анти-LINGO-2 антителами, может содержать последовательность по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25 или приблизительно от 15 до приблизительно 30 непрерывных или не непрерывных аминокислот LINGO-2.

Под "специфически связывается" обычно подразумевают то, что антитело связывается с эпипотом посредством его антигенсвязывающего домена и что связывание предусматривает некоторую комплементарность между антигенсвязывающим доменом и эпипотом. Согласно данному определению считают, что антитело "специфически связывается" с эпипотом, когда оно связывается с данным эпипотом посредством его антигенсвязывающего домена более быстро, чем оно бы связывалось со случайным неродственным эпипотом. Термин "специфичность" применяют в настоящем описании для того, чтобы охарактеризовать относительную аффинность, с которой определенное антитело связывается с определенным эпипотом. Например, можно считать, что антитело "A" обладает большей специфичностью относительно указанного эпипота, чем антитело "B", или можно считать, что антитело "A" связывается с эпипотом "C" с большей специфичностью, чем оно обладает относительно родственного эпипота "D".

Под "преимущественно связывается" подразумевается, что антитело специфически связывается с эпипотом более быстро, чем оно бы связывалось с родственным, таким же гомологичным или аналогичным эпипотом. Таким образом, антитело, которое "преимущественно связывается" с указанным эпипотом, сможет, более вероятно, связываться с данным эпипотом, чем связываться с родственным эпипотом, даже в том случае, если данное антитело может перекрестно реагировать с родственным эпипотом.

В качестве неограничивающего примера антитело может считаться связываемым преимущественно с первым эпипотом, если оно связывается с указанным первым эпипотом с константой диссоциации (K_D), которая меньше, чем K_D антитела относительно второго эпипота. В другом неограничивающем примере антитело может считаться связываемым преимущественно с первым антителом, если оно связывается с первым эпипотом с аффинностью, которая по меньшей мере на один порядок меньше по величине, чем K_D антитела относительно второго эпипота. В другом неограничивающем примере антитело может считаться связываемым преимущественно с первым эпипотом, если оно связывается с первым эпипотом с аффинностью, которая по меньшей мере на два порядка меньше по величине, чем K_D антитела относительно второго эпипота.

В другом неограничивающем примере антитело может считаться связываемым преимущественно с первым эпипотом, если оно связывается с первым эпипотом со скоростью диссоциации (k_(off)), которая меньше, чем k_(off) антитела относительно второго эпипота. В другом неограничивающем примере антитело может считаться связываемым преимущественно с первым эпипотом, если оно связывается с первым эпипотом с аффинностью, которая по меньшей мере на один порядок меньше по величине, чем k_(off) антитела относительно второго эпипота. В другом неограничивающем примере антитело может считаться связываемым преимущественно с первым эпипотом, если оно связывается с первым эпипотом с аффинностью, которая по меньшей мере на два порядка меньше по величине, чем k_(off) антитела относительно второго эпипота. Можно считать, что антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное, описанные в настоящем документе, связывается с полипептидом-мишенью, описанным в настоящем документе (например, LINGO-2, например человека, примата, мыши или любой

комбинацией LINGO-2 человека, примата или мыши) или его фрагментом или вариантом со скоростью диссоциации ($k(\text{off})$), меньшей или равной 5×10^{-2} , 10^{-2} , 5×10^{-3} или 10^{-3} c^{-1} . Можно считать, что антитело связывается с полипептидом-мишенью, описанным в настоящем документе (например, LINGO-2, например, человека, примата, мыши или любой комбинацией LINGO-2 человека, примата или мыши) или его фрагментом или вариантом со скоростью диссоциации ($k(\text{off})$), меньшей или равной 5×10^{-4} , 10^{-4} , 5×10^{-5} или 10^{-5} , 5×10^{-6} , 10^{-6} , 5×10^{-7} или 10^{-7} c^{-1} .

Можно считать, что антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное, описанные в настоящем документе, связываются с полипептидом-мишенью, описанным в настоящем документе (например, LINGO-2, например человека, примата, мыши или любой комбинацией LINGO-2 человека, примата, мыши) или его фрагментом или вариантом со скоростью ассоциации ($k(\text{on})$), большей или равной 10^3 , 5×10^3 , 10^4 или $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$. Антитело может связываться с полипептидом-мишенью, описанным в настоящем документе (например, LINGO-2, например, человека, примата, мыши или любой комбинацией LINGO-2 человека, примата, мыши) или его фрагментом или вариантом со скоростью ассоциации ($k(\text{on})$), большей или равной 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , или 5×10^6 , или $10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$.

Считают, что антитело конкурентно ингибит связывание контрольного антитела с указанным эпитопом, если оно преимущественно связывается с данным эпитопом в такой степени, что оно блокирует до некоторой степени связывание контрольного антитела с эпитопом. Конкурентное ингибирование можно определить любым способом, известным в данной области техники, например, конкурентными анализами ELISA. Можно считать, что антитело конкурентно ингибит связывание контрольного антитела с указанным эпитопом по меньшей мере на 90%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 60% или по меньшей мере 50%.

Как применяют в настоящем описании, термин "аффинность" относится к величине силы связывания отдельного эпитопа с CDR иммуноглобулиновой молекулы. См., например, Harlow et al. (1988), *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed.), p. 27-28. Как применяют в настоящем описании, термин "авидность" относится к общей стабильности комплекса между популяцией иммуноглобулинов и антигеном, то есть, функциональной связывающей силы смеси иммуноглобулинов с антигеном. См., например, Harlow на с. 29-34. Авидность связана и с аффинностью отдельных иммуноглобулиновых молекул в популяции с конкретными эпитопами, а также с валентностью иммуноглобулинов и антигена. Например, взаимодействие между двухвалентным моноклональным антителом и антигеном с высокоповторяющейся эпитопной структурой, такой как полимер, может представлять собой взаимодействие с высокой авидностью.

Анти-LINGO-2 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные можно также описать или специфицировать в терминах их перекрестной реактивности. Как применяют в настоящем описании, термин "перекрестная реактивность" относится к способности антитела, специфического относительно одного антитела, реагировать со вторым антителом; мера родства двух различных антигенных веществ. Таким образом, антитело является перекрестно реактивным, если оно связывается с эпитопом, отличным от эпитопа, который вызывает его образование. Перекрестно реактивный эпитоп обычно содержит многие из тех же комплементарных структурных особенностей, как вызывающий образование антитела эпитоп, и, в некоторых случаях, может действительно подходить лучше, чем оригинал.

Например, определенные антитела обладают некоторой степенью перекрестной реактивности, по которой они связываются с родственными, но не одинаковыми эпитопами, например эпитопами по меньшей мере с 95%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 55% и по меньшей мере 50% идентичностью (как рассчитано с применением способов, известных в данной области техники и описанных в настоящем документе) относительно эталонного эпитопа. Можно считать, что антитело обладает небольшой или не обладает перекрестной реактивностью, если оно не связывается с эпитопами менее чем с 95%, менее чем 90%, менее чем 85%, менее чем 80%, менее чем 75%, менее чем 70%, менее чем 65%, менее чем 60%, менее чем 55% и менее чем 50% идентичностью (как рассчитано с применением способов, известных в данной области техники и описанных в настоящем документе) относительно эталонного эпитопа. Можно считать, что антитело является "сильно специфическим" относительно определенного эпитопа, если оно не связывается с любым другим аналогом, ортологом или гомологом данного эпитопа.

Как указано выше, структуры субъединиц и трехмерная конфигурация константных областей различных классов иммуноглобулинов хорошо известны. Как применяют в настоящем описании, термин " V_H домен" включает аминоконцевой вариабельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина и термин " C_H1 домен" включает первый (самый близкий к аминоконцу) домен константной области тяжелой цепи иммуноглобулина. C_H1 домен является соседним V_H домену и является аминоконцевым относительно шарнирной области молекулы тяжелой цепи иммуноглобулина.

Как применяют в настоящем описании, термин " C_H2 домен" включает часть молекулы тяжелой цепи, которая располагается, например, приблизительно от остатка 244 до остатка 360 антитела, с приме-

нением общепринятых схем нумерации (остатки 244-360, система нумерации по Кабату; и остатки 231-340, система нумерации EU; см. Kabat E.A. et al.). C_H2 домен является уникальным по той причине, что он не спарен близко с другим доменом. Скорее, две N-связанные разветвленные углеводные цепи расположены между двумя C_H2 доменами интактной нативной молекулы IgG. Также хорошо задокументировано, что C_H3 домен располагается от C_H2 домена до C-конца молекулы IgG и содержит приблизительно 108 остатков.

Как применяют в настоящем описании, термин "шарнирная область" включает часть молекулы тяжелой цепи, которая соединяет C_H1 домен с C_H2 доменом. Данная шарнирная область содержит приблизительно 25 остатков и является гибкой, таким образом, обеспечивая независимое движение двух N-концевых антигенсвязывающих областей. Шарнирные области можно подразделить на три различных домена: верхний, средний и нижний шарнирные домены (Roux et al., J. Immunol. 161:4083 (1998)).

Как применяют в настоящем описании, термин "дисульфидная связь" включает ковалентную связь, образованную между двумя атомами серы. Аминокислота цистеин содержит тиольную группу, которая может образовывать дисульфидную связь или мостик со второй тиольной группой. В большинстве природных молекул IgG, C_H1 и C_L области соединены дисульфидной связью, и две тяжелые цепи соединены двумя дисульфидными связями в положениях 239 и 242, с применением системы нумерации по Кабату (положение 226 или 229, система нумерации EU).

Как применяют в настоящем описании, термин "химерное антитело" включает любое антитело, где иммунореактивная область или участок получают из первых типов, и константную область (которая может быть интактной, частичной или модифицированной в соответствии с настоящим изобретением) получают из вторых типов. В определенных вариантах осуществления связывающая область-мишень или участок будут получены из нечеловеческого источника (например, мыши или примата), и константная область является человеческой.

Как применяют в настоящем описании, "человеческие" или "полностью человеческие" антитела включают антитела, содержащие аминокислотную последовательность иммуноглобулина человека, и включают антитела, полученные из библиотеки иммуноглобулинов человека или из животных, трансгенных одним или более иммуноглобулинами человека и которые не экспрессируют эндогенные иммуноглобулины, как описано ниже и, например, в патенте США № 5939598 Kucherlapati et al. "Человеческие" или "полностью человеческие" антитела также включают антитела, содержащие, по меньшей мере, вариабельный домен тяжелой цепи или, по меньшей мере, вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи, где вариабельный домен(ы) имеет(ют) аминокислотную последовательность вариабельного домена(ов) иммуноглобулина человека. "Человеческие" или "полностью человеческие" антитела также включают "человеческие" или "полностью человеческие" антитела, как описано выше, которые содержат, состоят по существу из или состоят из вариантов (включая производные) молекул антител (например, V_H области и/или V_L области), описанных в настоящем документе, где антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные иммunoспецифически связываются с полипептидом LINGO-2 или его фрагментом или вариантом.

Стандартные способы, известные специалистам в данной области техники, можно применять для введения мутаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-LINGO-2 антитело человека, включая, но не ограничиваясь ими, сайт-направленный мутагенез и мутагенез с помощью ПЦР, которые приводят в результате к аминокислотным заменам. Варианты (включая производные) могут кодировать менее чем 50 аминокислотных замен, менее чем 40 аминокислотных замен, менее чем 30 аминокислотных замен, менее чем 25 аминокислотных замен, менее чем 20 аминокислотных замен, менее чем 15 аминокислотных замен, менее чем 10 аминокислотных замен, менее чем 5 аминокислотных замен, менее чем 4 аминокислотные замены, менее чем 3 аминокислотные замены или менее чем 2 аминокислотные замены относительно эталонной области V_H, V_H-CDR1, V_H-CDR2, V_H-CDR3, V_L области, V_L-CDR1, V_L-CDR2 или V_L-CDR3. В одном из вариантов осуществления один или более цистеиновых остатков, присутствующих в CDR антитела, заменены на отличные аминокислотные остатки.

Как применяют в настоящем описании, термин "рекомбинантное антитело" относится к антителу, в котором вариабельный домен или в тяжелой цепи, или в легкой цепи, или в обеих церях, изменен, по меньшей мере, частичной заменой одной или более CDR из антитела известной специфичности и, при необходимости, частичной заменой каркасной области и изменением последовательности. Хотя CDR можно получить из антитела того же класса или даже подкласса в виде антитела, из которого получены каркасные области, предусматривается, что CDR будут получены из антитела отличного класса и/или антитела отличных типов. Рекомбинантное антитело, в котором одна или более "донорных" CDR из нечеловеческого антитела известной специфичности привиты каркасной области тяжелой или легкой цепи человека, называют в настоящем описании "гуманизированным антителом". В определенных вариантах осуществления необязательно заменять все из CDR целыми CDR из донорной вариабельной области, передавая антигенсвязывающую способность одного вариабельного домена другому. Скорее, может быть достаточным ввести остатки, которые требуются для сохранения активности связывающего участка-мишени. Принимая во внимание пояснения, приведенные, например, в патентах США № 5585089, 5693761, 5693762 и 6180370, это будет в пределах компетенции специалистов в данной области техники

или этого можно достичь осуществлением стандартных экспериментов или испытанием путем проб и ошибок, с получением функционального рекомбинантного или гуманизированного антитела.

Кроме того, признано, что каркасные области в вариабельном домене в тяжелой или легкой цепи, или обеих, гуманизированного антитела могут содержать только остатки человеческого происхождения, в данном случае данные каркасные области гуманизированного антитела называют "полностью человеческими каркасными областями". Альтернативно, один или более остатков каркасной области(ей) донорного вариабельного домена могут быть встроены в соответствующее положение человеческой каркасной области(ей) вариабельного домена в тяжелой или легкой цепи или в обеих, гуманизированного антитела, при необходимости сохраняя соответствующее связывание или усиливая связывание с LINGO-2 антигеном. Человеческая каркасная область, которая встроена данным способом, будет, таким образом, содержать смесь остатков каркаса человека и донора, и ее называют в настоящем описании "частично человеческой каркасной областью".

Например, гуманизацию анти-LINGO-2 антитела можно, по существу, проводить, следуя способу Winter и сотрудников (Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239:1534-1536 (1988)), заменой CDR анти-LINGO-2 грызунов или мутантных CDR анти-LINGO-2 грызунов или CDR последовательностей соответствующими последовательностями человеческого антитела. См. также патенты США № 5225539; 5585089; 5693761; 5693762; 5859205; включенные в настоящее описание посредством ссылки. Полученное в результате гуманизированное анти-LINGO-2 антитело будет содержать по меньшей мере одну CDR грызунов или мутантную CDR грызунов в полностью человеческих каркасных областях вариабельного домена тяжелой и/или легкой цепи гуманизированного антитела. В некоторых случаях остатки в каркасных областях одного или более вариабельных доменов гуманизированного антитела анти-LINGO-2 заменяют соответствующими нечеловеческими (например, грызунов) остатками (см., например, патенты США № 5585089; 5693761; 5693762 и 6180370), в данном случае полученное в результате гуманизированное анти-LINGO-2 антитело будет содержать частично человеческие каркасные области в вариабельном домене тяжелой и/или легкой цепи.

Более того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которые отсутствуют в рецептиентном антителе или в донорном антителе. Данные модификации можно вводить для дополнительного улучшения свойств антитела (например, получая требуемую аффинность). Как правило, гуманизированное антитело будет содержать по существу все по меньшей мере из одного и обычно двух вариабельных доменов, в которых все или по существу все из CDR соответствуют CDR человеческого иммуноглобулина и все или по существу все из каркасных областей представляют собой каркасные области последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело необязательно также будет содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), обычно часть константной области иммуноглобулина человека. Что касается подробностей, см. Jones et al., *Nature*, 331:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-329 (1988) и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992), включенные в настоящее описание посредством ссылки. Соответственно, данные "гуманизированные" антитела могут включать антитела, где, по существу, менее чем интактный человеческий вариабельный домен заменен на соответствующую последовательность из видов, отличных от человека. На практике, гуманизированные антитела обычно представляют собой человеческие антитела, в которых некоторые остатки CDR и возможно некоторые остатки каркаса заменены остатками из аналогичных участков в антителах грызунов. См., например, патенты США № 5225539; 5585089; 5693761; 5693762; 5859205, см. также патент США № 6180370 и международную публикацию WO 01/27160, в которых описаны гуманизированные антитела и способы получения гуманизированных антител, обладающих повышенной аффинностью в отношении предварительно определенного антигена.

Как применяют в настоящем описании, термины "соединенный", "литый" или "слияние" применяют взаимозаменяя. Данные термины относятся к соединению вместе двух или более элементов или компонентов, независимо от способа, включая химическое конъюгирование или рекомбинантные способы. "Слияние с сохранением рамки считываания" относится к соединению двух или более открытых рамок считываания (ORF) с получением непрерывной более длинной ORF, способом, который сохраняет правильную рамку считываания первоначальных ORF. Таким образом, полученный в результате рекомбинантный слитый белок представляет собой один белок, содержащий два или более сегмента, которые соответствуют полипептидам, кодирующими первоначальные ORF (где сегменты обычно не соединены в природе). Хотя, таким образом, рамку считываания делают непрерывной вдоль всех слитых сегментов, сегменты могут быть физически или пространственно разделены, например, внутрирамочной линкерной последовательностью.

В контексте полипептидов "линейная последовательность" или "последовательность" представляет собой порядок аминокислот в полипептиде в направлении от амино к карбоксильному кольцу, в котором остатки, которые прилегают друг к другу в последовательности, являются непрерывными в первичной структуре полипептида.

Термин "экспрессия", как применяют в настоящем описании, относится к способу, которым ген продуцирует биохимическое вещество, например РНК или полипептид. Способ включает любое прояв-

ление функционального присутствия гена в клетке, включая, но без ограничения, нокдаун гена, а также временную экспрессию и стабильную экспрессию. Он включает, но без ограничения, транскрипцию гена в матричную РНК (мРНК), транспортную РНК (тРНК), короткую шпилечную РНК (кшРНК), малую интерферирующую РНК (миРНК) или любой другой продукт РНК и трансляцию данной мРНК в полипептид(ы). Если конечный требуемый продукт представляет собой биохимическое вещество, экспрессия включает образование данного биохимического вещества и любых предшественников. Экспрессия гена дает "продукт гена". Как применяют в настоящем описании, продукт гена может представлять собой или нуклеиновую кислоту, например матричную РНК, полученную транскрипцией гена, или полипептид, который транслируется с транскрипта. Продукты генов, описанные в настоящем документе, дополнительно включают нуклеиновые кислоты с посттранскрипционными модификациями, например полеаденилированием, или полипептиды с посттрансляционными модификациями, например, метилированием, гликозилированием, присоединением липидов, ассоциацией с другими белковыми субъединицами, протеолитическим расщеплением и подобными.

Как применяют в настоящем описании, "терапевтически эффективное количество" относится к количеству, эффективному при требуемых дозах и в течение требуемых периодов времени для достижения требуемого терапевтического результата.

Терапевтический результат может представлять собой, например, ослабление симптомов, пролонгированное выживание, повышенную подвижность и подобные. Не требуется, чтобы терапевтический результат был "вылечивающим".

Как применяют в настоящем описании, "профилактически эффективное количество" относится к количеству, эффективному при требуемых дозах и в течение требуемых периодов времени для достижения требуемого профилактического результата. Обычно, поскольку профилактическую дозу применяют на субъектах перед или на ранних стадиях заболевания, профилактически эффективное количество будет меньше, чем терапевтически эффективное количество.

Как применяют в настоящем описании, термины "лечить" или "лечение" относятся как к терапевтическому лечению, так и профилактическим или превентивным мерам, где цель заключается в предотвращении или приостановке (ослаблении) нежелательного физиологического изменения или расстройства, такого как развитие аутоиммунного состояния. Полезные или требуемые клинические результаты включают, но не ограничиваясь ими, облегчение симптомов, снижение степени заболевания, стабилизированное (т.е. не ухудшающееся) состояние заболевания, задержку или замедление развития заболевания, уменьшение интенсивности или временное облегчение болезненного состояния и ремиссию (частичную или полную), детектируемую или недетектируемую. "Лечение" может также обозначать продление срока жизни по сравнению с ожидаемым сроком жизни при отсутствии лечения. Субъекты, нуждающиеся в лечении, включают субъектов уже с заболеванием или расстройством, а также субъектов, склонных к приобретению заболевания или расстройства, или субъектов, у которых собираются предотвратить заболевание или расстройство.

Под "субъектом", или "индивидуом", или "животным", или "пациентом", или "млекопитающим" подразумевают любого субъекта, в частности субъекта, являющегося млекопитающим, для которого требуется диагноз, прогноз или терапия. Субъекты, являющиеся млекопитающими, включают, но не ограничиваясь ими, людей, одомашненных животных, сельскохозяйственных животных, животных из зоопарка, спортивных животных, домашних животных, таких как морские свинки, кролики, крысы и мыши, приматов, таких как высшие обезьяны, низшие обезьяны, орангутанг и шимпанзе, собачьих, таких как собаки и волки, животных из семейства кошачьих, таких как кошки, львы и тигры, непарнокопытных животных, таких как лошади, ослы и зебры, животных, используемых для производства пищевых продуктов, таких как коровы, свиньи и овцы, копытных животных, таких как олени и жирафы, медведей и так далее. В определенных вариантах осуществления млекопитающим является субъект, представляющий собой человека.

Как применяют в настоящем описании, фразы, такие как "субъект, который будет получать пользу от введения антагониста LINGO-2" и "животное, нуждающееся в лечении", включают субъектов, таких как субъекты, являющиеся млекопитающими, которые будут получать пользу от введения применяемого антагониста LINGO-2, например для детекции полипептида анти-LINGO-2 (например, для диагностического способа), и/или от лечения, т.е. временного улучшения или предотвращения заболевания, такого как ALS, антагонистом LINGO-2, таким как анти-LINGO-2 антитело.

Термин "РНК интерференция" или "РНКи" относится к подавлению или снижению генной экспрессии миРНК. Он представляет собой способ специфического к последовательности, посттранскрипционного подавления экспрессии генов у животных и в растениях, вызываемый миРНК, которая является гомологичной в ее дуплексной области последовательности подавляемого гена. Ген может быть эндогенным или экзогенным по отношению к организму, встроенным в хромосому или в вектор для трансфекции, который не встраивается в геном. Экспрессия гена или полностью, или частично ингибируется. Можно также считать, что РНКи ингибирует функционирование РНК-мишени; ингибирование функционирования РНК-мишени может быть полным или частичным.

II. LINGO-2.

LINGO-2 экспрессируется в нейронах коры головного мозга и ганглии заднего корешка (DRG) и отрицательно регулирует выживаемость двигательных нейронов и рост аксонов двигательных нейронов.

Природный LINGO-2 человека представляет собой полипептид из 606 аминокислот. Полинуклеотид, кодирующий мРНК LINGO-2 человека, описан под номером доступа NM 152570 в GenBank:

Полипептидная последовательность LINGO-2 человека (кодируемого нуклеотидами 651-2471 SEQ ID NO: 1) описана под номером доступа NP 689783 в GenBank:

MLHTAISWCQPFLGLAVVLIFMGSTIGCPARCECSAQNKSVSCHRRRLIAIPEGIPIETKILDLSKNRLK
SVNPEEFISYPPLLEEIDLSDNIIANVEPGAFNNLFNURSLRLKGNRKLVLVPLGVFTGLSNLTKLDISENK
IVILLDYMFQDLHNLKSLEVGDNDLVLVYISHRAFGSGLLSLEQLTLEKCNLTAVPTEALSHRLSLSLISLHLKH
LNINNMPVYAFKRLFHLKHLEIDYWPLLDMPAANSLYGLNLTSLSVTNTNLSTVPLAFKHLVYLTHLNL
SYNPISTIEAGMFSDLIRLQELHIVGAQLRTIEPHSFQGLRFLRVLNVSQNLLETLEENVFSSPRALSVL
SINNNPLACDCRLLWILQRQPTLQFQGGQQPMCAGPDTIRERSFKDFHSTALSFTYFTCKKKPKIREKKLQHL
LVDEGQTVQLECSADGDPQPVISWVTPRRRFITTGSNGRATVLDGDTLEIRFAQDQDSGMYVCIASNAAG
NDTFTASLTVKGFASDRFLYANRTPMYSNTDSNDTISNGTNANTFSIDLKTIJVSTAMGCFTFLGVVLFCF
LLLFFVWSRGKHKHNSIDLEYVPRKNNGAVVEGEVAGPRRFNMKMI (SEQ ID NO:2).

Полинуклеотид, кодирующий мышиную мРНК LINGO-2, описан под номером доступа NM 175516.4 в GenBank:

Полипептидная последовательность мышиного LINGO-2 описана под номером доступа NP 780725 в GenBank:

```

mlhtaipcwq pflglavvll lmgstigcpa rcecsaqnks vschrrrla ipegipietk
ildlsknrlk sinpeefisy plleeidlsd nianvepga fnnfnlrlsl rlkgnrlklv
plgvftglsn ltkldisenk ivilldymfq dlhnklslev gdndlvyish rafsglisle
qtllekcnlt avptealshl rsliaihlkh lninnmpvya fkrlfhlknl eidywplldl
mpanslygln ltslsitntn lstpflafk hlvylthlnl synpistiea gmfSDLirlq
elhivgaqlr tiephsfqgl rflrvlnvsq niletleenf fsspralevl sinnnplacd
crllwllqrg pnlqfqqqp mcagpdtire rsfkdfhsta lsfyftckp kirekkqlghl
lvdegqtvql ecnadgdpqp viswvtprrr fittksngra tvlgdgtlei rfaqdqdsgm
yvciasnaag ndtftasltv kgftsdrlfly anrtpmymtd sndtvsngtn antfsidlkt
ilvstamgcf tflgvvlfcf lllfvwsrgk gkhknsidle yvprknngav vegevagprr
fnmkmi (SEQ ID NO:4),

```

Полинуклеотид, кодирующий крысиную мРНК LINGO-2, описан под номером доступа NM 001107926.1 в GenBank:

```

gtgccaggc actctagaaa cccagcctgc atgtagacag ccctgcctac tgcagaagat
gattcctgcc ccgggttaaa cgtgtacaac tcgtggaaat gccagtacct tccacctgaa
ggcacttagt ggctagaaaa ccagcaatct accccgaaac acactgtact aaacacagca
agagaccaca atgattggac atagacctat aaggatacac tttgagaaag atgccagttg
ttcctcagga tgcactttga aatgcagtc attctagctg gtaccgcaaa atgagtgcatt
taaggccat aaccaaggtg tagaataaac agtggagtca tgcttcacac ggctatacca
tgctggcagc cattcctggg tctggctatg gtgttactct tcatggatc caccattggc
tgtcctgctc gctgtgagtg ctctgcccag aacaaatctg ttagctgccca cagaagacgc
ttgatcgcga tccccgaagg cattccatt gagaccaaaa tcttggacct gagcaaaaat
cgactaaaga gcataaaccc cgaagaattc atctcatatc ctctgttggaa ggagatagac
ttgagcagaca acatcatcgc caatgtagaa cctgggcat ttaacaatct cttaacactg
cgttccctcc gcctaaaagg caatcgcctt aagttgtcc ctttggaggt attcacggc
ctgtccaacc tcaccaagct tgacattagt gagaataaga ttgtcatttt gctggactac
atgtccagg atctgcataa cctgaagtct cttagagtgg gggacaatga tttggtttat
atatcacaca gggccttcag tggactattt agcttggagc agctcacccct ggagaagtgc
aacttgacag cggtaccaac agaagccctt tcccacatcc gcagcctcat caccctgcac
ctgaagcatc tcaatatcaa caatatgcct gtgtatgcct taaaagatt attccacactg
aaacaactag agatcgacta ttggccattt ctggatatga tgccagccaa tagcctctat
ggctcaacc tcacatccct ctgcatcact aacaccaacc tgtccactgt cccttcctc
gcctttaaac accttgata cctgacccac cttaacactt cctacaatcc catcagcaact
attgaagcag gcatgttctc tgacactgatc cgcctacagg agttcatgt agtcggggcc
cagctccgca ccattgaacc tcactccttc caagggtcc gcttcctccg cgtgctcaat
gtatctcaga acctgctgga aacattggaa gagaatgtct tctcttcccc tagggctttg
gaggtcctga gcattaacaa taacccacta gctgtcgact gccgacttct ctggctccctg
cagcgcacagg ccaccctgca gtttggaggc cagcagccca tgtgtgccgg gccagacacc
atacgtgaga ggtcattaa ggattccat agcactgctc tttctttta ttttacactgc

```

aaaaaaaaaaaaaaaccca aaatccgtga aaagaagtta cagcacctcc tagtggacga aggacagacg
 gtccagctgg agtgcaacgc gnatggagac ccccagcccg tgatttcctg ggtgacacct
 cgaaggcggtt ttatcaccac caagtccaaac ggaaggggca ctgtgttggg ttagtgcacc
 ttagaaatcc gtttcgcccga gnatcaagac agtggatgt atgtttgcat agctagcaat
 gctgctggga atgacacccct cacggcatct ctcactgtga agggattcac ttccagaccgc
 ttcccttacg caaacaggac ccctatgtac atgactgact ccaatgacac cgtttccaac
 ggcactaatg ccaatactt ttccctggac cttaaaacaa tactgttac tacagccatg
 ggctgttca cattcctggg agtggttta ttttgtttc tccttcttt tttgtggagc
 cgagggaaagg gcaaacacaa aaacagcatt gaccttgagt atgtgccccg aaaaaacaat
 ggtgctgtt cagaagggga ggtggctgga cccaggaggt tcaacatgaa aatgatataa
 gggcccacca cacacacact actactgtct ctgtgttact gttggtaatg agtaagacgt
 ctgatatagc gagtccatca caaggtgatc aggccagctc acacagctgc ccctgtgtca
 aagcagggtc catggaagct ggaagacttc tcatggacac tggctgatta gaggcaggca
 ggcatgtgtc agagcccttc acacagtggg atactaattt ttgcattgc aaatattggc
 attctgggaa tctcagtaat gaccctgaac cttggctca tgctgacgga caaaaattca
 acattttcta ccactgcaaa actaaaagaa aaaaaattta aaaggaacaa cctacagtgt
 agattttaca tattaaaaaa agacacattt gtctaaaaca tactctacgg taaaatttgc
 atttatttattt atttggtaaa accttgcattc atacaatact gttggttcag caccaaaaaa
 aaaaaaaaaaaaaa aaaaaaagag agatcaatattt gaaacatata tgctgtatatt
 gttttaaagc aatatgaatg agaggttgc ttttagtta ctcaccagta tagatccaag
 tgggtctca cttccctttt atccgcagag aaacctgaga atagatccct ggaataatag
 gctgagatgt gttgagatgt gtatgtctga tgttagatgc caagatacaa gagccagtc
 aaaaactgctc aactctgtta acttctgtta ctataaataa aggcatgtgc ctatgttgc
 t (SEQ ID NO: 5).

Полипептидная последовательность крысиного LINGO-2 описана под номером доступа NP 001101396 в GenBank:

mlhtaipcwq pflglamvll fmgstigcpa rcecsaqnks vschrrrlia ipegipietk
 ildlsknrlk sinpeefisy p1leeidlsd nianvepgf fnnlfnrlsl rlggnrlk1v
 plgvftglsn lt~~k~~ldisenk ivilldymfq dlhnklslev gdndlvyish rafsglfsle
 qltlekcnlt avptealshl rsliitlhkh lninnmpvya fkrlfhlkql eidywplldm
 mpanslygln ltslsitntn ltvplflak hlvylthlnl synpistiea gmfsdirlq
 elhvvgaglq tiephsfqgl rflrvlnvsq nlletleenv fsspralevl sinnnplacd
 crllwllqrq atlqfqqqp mcagpdtire rsfkdfhsta lsfyftckkp kirekklqhl
 lvdegqtvql ecnadgdppq viswvtprrr fittksngra tvlgdgtlei rfaqdqdsgm
 yvciasnaag ndtftasltv kgftsdrfly anrtpmymtd sndtvsngtn antfsldlk
 ilvstamgcf tflgvvlfcf lllfvwsrgk gkhknsidle yvprknngav aegevagprr
 fnmkmi (SEQ ID NO: 6).

Природный полипептид LINGO-2 человека (также известный как FLJ31810, белок 2, взаимодействующий с ного рецепторами и содержащий иммуноглобулиноподобный домен и богатые лейцином повторы, LERN3, нейрональный белок с богатыми лейцином повторами 3, нейрональный белок с богатыми лейцином повторами 6C, LRRN6C, PRO31993 или UNQ9234) представляет собой белок приблизительно 68 КДа из 606 аминокислот (SEQ ID NO: 2). LINGO-2 представляет собой член белкового семейства LINGO, который включает по меньшей мере три других человеческих паралога, LINGO-1, LINGO-3 и LINGO-4. См. Mi et al., *Nature Neurosci.* 7:221-28 (2004). Полипептид LINGO-2 человека содержит участок обогащенных лейцином повторов (включая N-концевой кэп (LRRNT) и C-концевой кэп (LRRCT)). LINGO-2 также содержит Ig домен, трансмембранный область и внутриклеточный домен. Кроме того, природный белок LINGO-2 содержит сигнальную последовательность на N-конце белка. Как будет очевидно специалисту в данной области техники, длины различных доменов LINGO-2, приводимых в настоящем описании, являются приблизительными. В табл. 2 перечислены приблизительные границы LINGO-2 доменов, исходя из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2.

Таблица 2
LINGO-2 домены

Домен или область	Остатки SEQ ID NO:2
Сигнальная последовательность	1-27
LRRNT	28-57
LRR	58-79
LRR	82-103
LRR	106-127
LRR	130-151
LRR	154-175
LRR	178-199
LRR	202-223
LRR	226-247
LRR	250-271
LRR	274-295
LRR	298-319
LRR	322-343
LRRCT	355-408
Ig	410-500
Трансмембранный	546-566
Внутриклеточный	568-606

Распределение в ткани LINGO-2 исследовали на крысах и мышах. Экспрессия LINGO-2 у взрослых крыс локализована в центральной нервной системе, как определено количественной ПЦР (количественная ПЦР). У P6 (6 день постнатального периода) мышей экспрессия LINGO-2 локализована в нейронах коры головного мозга и ганглии заднего корешка, как определено количественной ПЦР (количественная ПЦР) (см. фиг. 1 и 2).

II. Способы применения антагонистов LINGO-2.

Хотя полипептиды LINGO-1 и LINGO-2 обладают приблизительно 60,7% идентичностью по аминокислотной последовательности, как показано в настоящем описании, антагонизм данных полипептидов обеспечивает разные воздействия на клетки. Более конкретно, антагонисты LINGO-2 не стимулируют ремиелинизацию, тогда как антагонисты LINGO-1 стимулируют. Кроме того, характер экспрессии LINGO-1 и LINGO-2 отличается. В частности, экспрессия LINGO-2 больше в спинном мозге, чем в головном мозге, тогда как экспрессия LINGO-1 больше в головном мозге, чем в спинном мозге.

Настоящее изобретение относится к способам лечения заболевания, расстройства или повреждения, связанного с выживаемостью двигательных нейронов или ростом аксонов двигательных нейронов, например, амиотрофического бокового склероза, у животного, страдающего данным заболеванием. В некоторых вариантах осуществления способ включает, состоит по существу из или состоит из введения животному эффективного количества антагониста LINGO-2. В определенных вариантах осуществления антагонист LINGO-2 выбран из группы, состоящей из растворимого полипептида LINGO-2, антитела LINGO-2 или его связывающего антиген фрагмента, полинуклеотида антагониста LINGO-2, аптамера LINGO-2 и их комбинаций.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу стимулирования выживаемости двигательных нейронов или роста аксонов двигательных нейронов (у млекопитающего или *in vitro*), включающему, состоящему по существу из или состоящему из контакта двигательного нейрона с эффективным количеством антагониста LINGO-2. Когда двигательный нейрон находится в млекопитающем, количество может представлять собой терапевтически эффективное количество. В определенных вариантах осуществления антагонист LINGO-2 выбран из группы, состоящей из растворимого полипептида LINGO-2, антитела LINGO-2 или его связывающего антиген фрагмента, полинуклеотида антагониста LINGO-2, аптамера LINGO-2 и их комбинаций.

Антагонист LINGO-2, например, растворимый полипептид LINGO-2, антитело LINGO-2, полинуклеотид антагониста LINGO-2 или аптамер LINGO-2, которые будут применять в способах, описанных в настоящем документе, можно получить и применять в качестве терапевтического агента, который останавливает, снижает, предотвращает или ингибирует способность LINGO-2 отрицательно регулировать рост аксонов или выживаемость нейронов.

В некоторых вариантах осуществления антагонист LINGO-2 может способствовать росту аксонов конкретного типа двигательных нейронов. Например, антагонист LINGO-2 может способствовать росту аксонов верхнего двигательного нейрона или нижнего двигательного нейрона. Антагонист LINGO-2 может способствовать росту аксонов альфа двигательного нейрона или гамма двигательного нейрона. Антагонист LINGO-2 может способствовать росту аксонов соматического двигательного нейрона, особого висцерального двигательного нейрона (бронхиального двигательного нейрона) или общего висцерального двигательного нейрона (висцерального двигательного нейрона).

В некоторых вариантах осуществления антагонист LINGO-2 может способствовать выживаемости конкретного типа двигательных нейронов. Например, антагонист LINGO-2 может способствовать выживаемости верхнего двигательного нейрона или нижнего двигательного нейрона. Антагонист LINGO-2 может способствовать выживаемости альфа двигательного нейрона или гамма двигательного нейрона. Антагонист LINGO-2 может способствовать выживаемости соматического двигательного нейрона, особого висцерального двигательного нейрона (бронхиального двигательного нейрона) или общего висцерального двигательного нейрона (висцерального двигательного нейрона).

В некоторых вариантах осуществления антагонист LINGO-2 может способствовать дифференциации олигодендроцитов.

В некоторых вариантах осуществления антагонист LINGO-2 может способствовать фосфорилированию АКТ. В некоторых вариантах осуществления антагонист LINGO-2 может способствовать фосфорилированию АКТ в клетках DRG.

Следующие варианты осуществления включают способ стимулирования выживаемости двигательных нейронов для лечения заболевания, расстройства или повреждения, включающего разрушение двигательных нейронов, включающий введение антагониста LINGO-2 млекопитающему, необязательно в или вблизи места заболевания, расстройства или повреждения, в количестве, достаточном для ослабления ингибирования аксонного удлинения двигательных нейронов.

Антагонист LINGO-2 можно вводить прямым введением, например, растворимого полипептида LINGO-2, антитела LINGO-2 или его связывающего антиген фрагмента, полинуклеотида антагониста LINGO-2 или аптамера LINGO-2 пациенту. Альтернативно, антагонист LINGO-2 можно вводить с помощью экспрессионного вектора, который продуцирует конкретный антагонист LINGO-2. В определенных вариантах осуществления антагонист LINGO-2 вводят способом лечения, который включает:

(1) трансформацию или трансфекцию имплантируемой клетки-хозяина нуклеиновой кислотой, например вектором, который экспрессирует антагонист LINGO-2; и

(2) имплантование трансформированной клетки-хозяина млекопитающему.

В некоторых вариантах осуществления клетка-хозяин может быть имплантирована в участок заболевания, расстройства или повреждения. В некоторых вариантах осуществления имплантируемую клетку-хозяина выделяют из млекопитающего, временно выращивают, трансформируют или трансфицируют выделенной нуклеиновой кислотой, кодирующей антагонист LINGO-2, и имплантируют обратно тому же млекопитающему, из которого она выделена. Клетку можно, но не требуется, чтобы она была из него, выделить из того же участка, в который ее имплантируют. Данные варианты осуществления, иногда известные как *ex vivo* генная терапия, могут давать непрерывное обеспечение антагониста LINGO-2 в течение некоторого периода времени.

Заболевания или расстройства, которые можно лечить или облегчать способами, обеспеченными настоящим изобретением, включают заболевания, расстройства или повреждения, которые связаны с выживаемостью двигательных нейронов. Данные заболевания включают, но не ограничиваясь ими, амиотрофический боковой склероз (ALS), первичный латеральный склероз (PLS), прогрессирующую мышечную атрофию (PMA), наследственный спастический парапарез (HSP), спинобульбарную мышечную атрофию, связанную с X хромосомой (SBMA; болезнь Кеннеди), прогрессирующий бульбарный паралич, псевдобульбарный паралич, спинальную мышечную атрофию (SMA), постполиомиелитный синдром (PPS), болезнь Хантингтона, эссенциальный тремор (ET), болезнь двигательных нейронов, паралич, болезнь Паркинсона и другие заболевания, связанные с двигательной функцией.

В некоторых вариантах осуществления введение антагониста LINGO-2 является достаточным для ослабления или предотвращения конкретного симптома, связанного с ослабленным функционированием двигательного нейрона. Например, антагонист LINGO-2 может нормализовать, стабилизировать или предотвращать атрофию мышц, мышечную слабость, фасцикуляцию, фибрилляцию, гипотонию, гипо-рефлексию, слабость, гипертонию, гиперрефлексию, подергивание мышц, паралич (например, квадриплегию, параплегию, или моноплегию), спастичность, тест Бабинского, тремор в покое, атетоз, хорею, баллизм, позднюю дискинезию, ригидность, дистонию, атаксию, дисметрию, дисдиадохокинезию, нистагм, задержку начала движения, брадикинезию или другие расстройства движения.

IV. Растворимые полипептиды LINGO-2.

Полипептиды LINGO-2 включают фрагменты, варианты или их производные растворимого полипептида LINGO-2. В табл. 2 описаны различные домены полипептида LINGO-2 человека. Аналогичные доменные структуры можно вывести для полипептидов LINGO-2 других видов, например мышного LINGO-2 (SEQ ID NO: 4). Растворимые полипептиды LINGO-2 обычно не содержат трансмембранный домена полипептида LINGO-2 и необязательно не содержат цитоплазматического домена полипептида LINGO-2. Например, определенные растворимые полипептиды LINGO-2 человека не содержат аминокислоты 546-566 SEQ ID NO: 2, которые включают трансмембранные домены LINGO-2 человека. Кроме того, определенные растворимые полипептиды LINGO-2 содержат домены LRR и Ig домен полипептида LINGO-2.

Вариант полипептида LINGO-2 может также изменяться по последовательности по сравнению с соответствующим полипептидом дикого типа. В частности, определенные аминокислотные замены можно

вводить в последовательность LINGO-2 без ощутимой потери биологической активности LINGO-2. В примерах вариантов осуществления вариант полипептида LINGO-2 содержит одну или более аминокислотных замен и/или содержит аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 70, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентичной эталонной аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислот 28-408 SEQ ID NO: 2 и аминокислот 28-500 SEQ ID NO: 2 или эквивалентных фрагментов гомологов LINGO-2 (например, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 6). Вариант полипептида LINGO-2, отличающийся по последовательности от любого указанного фрагмента LINGO-2, может содержать одну или более аминокислотных замен (консервативных или неконсервативных), одну или более делеций и/или одну или более вставок. В определенных вариантах осуществления растворимый полипептид LINGO-2 способствует выживаемости двигательных нейронов или росту аксонов двигательного нейрона, например, у млекопитающего.

Растворимый полипептид LINGO-2 может содержать фрагмент по меньшей мере из 6, например, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 100 или более аминокислот SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 6. Кроме того, растворимый полипептид LINGO-2 может содержать по меньшей мере 1, например, 5, 10, 15 или 20 консервативных аминокислотных замен. Также предполагаются соответствующие фрагменты растворимых полипептидов LINGO-2 по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90 или 95% идентичные эталонному полипептиду LINGO-2 SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4. В определенных вариантах осуществления растворимый полипептид LINGO-2 способствует выживаемости двигательных нейронов или способствует росту аксонов двигательных нейронов, например, у млекопитающего.

Под "эталонной аминокислотной последовательностью LINGO-2" или "эталонной аминокислотной последовательностью" подразумевают специфическую последовательность без включения любых аминокислотных замен. Как известно специалисту в данной области техники, если замены отсутствуют, "выделенный полипептид" содержит аминокислотную последовательность, которая идентична эталонной аминокислотной последовательности.

Дополнительные растворимые полипептиды LINGO-2 включают, но не ограничиваясь ими, фрагмент полипептида LINGO-2 человека, включающий, состоящий по существу из или состоящий из аминокислот 1-57 SEQ ID NO: 2; аминокислот 1-79 SEQ ID NO: 2; аминокислот 1-103 SEQ ID NO: 2; аминокислот 1-127 SEQ ID NO: 2; аминокислот 1-151 SEQ ID NO: 2; аминокислот 1-175 SEQ ID NO: 2; аминокислот 1-199 SEQ ID NO: 2; аминокислот 1-223 SEQ ID NO: 2; аминокислот 1-247 SEQ ID NO: 2; аминокислот 1-271 SEQ ID NO: 2; аминокислот 1-295 SEQ ID NO: 2; аминокислот 1-319 SEQ ID NO: 2; аминокислот 1-343 SEQ ID NO: 2; аминокислот 1-408 SEQ ID NO: 2; аминокислот 1-500 SEQ ID NO: 2; аминокислот 1-545 SEQ ID NO: 2; аминокислот 28-57 SEQ ID NO: 2; аминокислот 28-79 SEQ ID NO: 2; аминокислот 28-103 SEQ ID NO: 2; аминокислот 28-127 SEQ ID NO: 2; аминокислот 28-151 SEQ ID NO: 2; аминокислот 28-175 SEQ ID NO: 2; аминокислот 28-199 SEQ ID NO: 2; аминокислот 28-223 SEQ ID NO: 2; аминокислот 28-247 SEQ ID NO: 2; аминокислот 28-271 SEQ ID NO: 2; аминокислот 28-295 SEQ ID NO: 2; аминокислот 28-319 SEQ ID NO: 2; аминокислот 28-343 SEQ ID NO: 2; аминокислот 28-408 SEQ ID NO: 2; аминокислот 28-500 SEQ ID NO: 2; аминокислот 28-545 SEQ ID NO: 2; аминокислот 58-79 SEQ ID NO: 2; аминокислот 58-103 SEQ ID NO: 2; аминокислот 58-127 SEQ ID NO: 2; аминокислот 58-151 SEQ ID NO: 2; аминокислот 58-175 SEQ ID NO: 2; аминокислот 58-199 SEQ ID NO: 2; аминокислот 58-223 SEQ ID NO: 2; аминокислот 58-247 SEQ ID NO: 2; аминокислот 58-271 SEQ ID NO: 2; аминокислот 58-295 SEQ ID NO: 2; аминокислот 58-319 SEQ ID NO: 2; аминокислот 58-343 SEQ ID NO: 2; аминокислот 58-408 SEQ ID NO: 2; аминокислот 58-500 SEQ ID NO: 2; аминокислот 58-545 SEQ ID NO: 2; аминокислот 82-103 SEQ ID NO: 2; аминокислот 82-127 SEQ ID NO: 2; аминокислот 82-151 SEQ ID NO: 2; аминокислот 82-175 SEQ ID NO: 2; аминокислот 82-199 SEQ ID NO: 2; аминокислот 82-223 SEQ ID NO: 2; аминокислот 82-247 SEQ ID NO: 2; аминокислот 82-271 SEQ ID NO: 2; аминокислот 82-295 SEQ ID NO: 2; аминокислот 82-319 SEQ ID NO: 2; аминокислот 82-343 SEQ ID NO: 2; аминокислот 82-408 SEQ ID NO: 2; аминокислот 82-500 SEQ ID NO: 2; аминокислот 82-545 SEQ ID NO: 2; аминокислот 106-127 SEQ ID NO: 2; аминокислот 106-151 SEQ ID NO: 2; аминокислот 106-175 SEQ ID NO: 2; аминокислот 106-199 SEQ ID NO: 2; аминокислот 106-223 SEQ ID NO: 2; аминокислот 106-247 SEQ ID NO: 2; аминокислот 106-271 SEQ ID NO: 2; аминокислот 106-295 SEQ ID NO: 2; аминокислот 106-319 SEQ ID NO: 2; аминокислот 106-343 SEQ ID NO: 2; аминокислот 106-408 SEQ ID NO: 2; аминокислот 106-500 SEQ ID NO: 2; аминокислот 106-545 SEQ ID NO: 2; аминокислот 130-151 SEQ ID NO: 2; аминокислот 130-175 SEQ ID NO: 2; аминокислот 130-199 SEQ ID NO: 2; аминокислот 130-223 SEQ ID NO: 2; аминокислот 130-247 SEQ ID NO: 2; аминокислот 130-271 SEQ ID NO: 2; аминокислот 130-295 SEQ ID NO: 2; аминокислот 130-319 SEQ ID NO: 2; аминокислот 130-343 SEQ ID NO: 2; аминокислот 130-408 SEQ ID NO: 2; аминокислот 130-500 SEQ ID NO: 2; аминокислот 130-545 SEQ ID NO: 2; аминокислот 154-175 SEQ ID NO: 2; аминокислот 154-199 SEQ ID NO: 2; аминокислот 154-223 SEQ ID NO: 2; аминокислот 154-247 SEQ ID NO: 2; аминокислот 154-271 SEQ ID NO: 2; аминокислот 154-295 SEQ ID NO: 2; аминокислот 154-319 SEQ ID NO: 2; аминокислот 154-343 SEQ ID NO: 2; аминокислот 154-408 SEQ ID NO: 2; аминокислот 154-500 SEQ ID NO: 2; аминокислот 154-545 SEQ ID NO: 2; аминокислот 178-199 SEQ ID NO: 2; аминокислот 178-223 SEQ ID NO: 2; аминокислот 178-247 SEQ ID NO: 2; аминокислот 178-271 SEQ ID NO: 2; амино-

кислот 178-295 SEQ ID NO: 2; аминокислот 178-319 SEQ ID NO: 2; аминокислот 178-343 SEQ ID NO: 2; аминокислот 178-408 SEQ ID NO: 2; аминокислот 178-500 SEQ ID NO: 2; аминокислот 178-545 SEQ ID NO: 2; аминокислот 202-223 SEQ ID NO: 2; аминокислот 202-247 SEQ ID NO: 2; аминокислот 202-271 SEQ ID NO: 2; аминокислот 202-295 SEQ ID NO: 2; аминокислот 202-319 SEQ ID NO: 2; аминокислот 202-343 SEQ ID NO: 2; аминокислот 202-408 SEQ ID NO: 2; аминокислот 202-500 SEQ ID NO: 2; аминокислот 202-545 SEQ ID NO: 2; аминокислот 226-247 SEQ ID NO: 2; аминокислот 226-271 SEQ ID NO: 2; аминокислот 226-295 SEQ ID NO: 2; аминокислот 226-319 SEQ ID NO: 2; аминокислот 226-343 SEQ ID NO: 2; аминокислот 226-408 SEQ ID NO: 2; аминокислот 226-500 SEQ ID NO: 2; аминокислот 226-545 SEQ ID NO: 2; аминокислот 250-271 SEQ ID NO: 2; аминокислот 250-295 SEQ ID NO: 2; аминокислот 250-319 SEQ ID NO: 2; аминокислот 250-343 SEQ ID NO: 2; аминокислот 250-408 SEQ ID NO: 2; аминокислот 250-500 SEQ ID NO: 2; аминокислот 250-545 SEQ ID NO: 2; аминокислот 274-295 SEQ ID NO: 2; аминокислот 274-319 SEQ ID NO: 2; аминокислот 274-343 SEQ ID NO: 2; аминокислот 274-408 SEQ ID NO: 2; аминокислот 274-500 SEQ ID NO: 2; аминокислот 274-545 SEQ ID NO: 2; аминокислот 298-319 SEQ ID NO: 2; аминокислот 298-343 SEQ ID NO: 2; аминокислот 298-408 SEQ ID NO: 2; аминокислот 298-500 SEQ ID NO: 2; аминокислот 298-545 SEQ ID NO: 2; аминокислот 322-343 SEQ ID NO: 2; аминокислот 322-408 SEQ ID NO: 2; аминокислот 322-500 SEQ ID NO: 2; аминокислот 322-545 SEQ ID NO: 2; аминокислот 355-408 SEQ ID NO: 2; аминокислот 355-500 SEQ ID NO: 2; аминокислот 355-545 SEQ ID NO: 2; аминокислот 410-500 SEQ ID NO: 2; аминокислот 410-545 SEQ ID NO: 2 или фрагментов, вариантов или производных данных полипептидов. В определенных вариантах осуществления растворимый полипептид LINGO-2 способствует выживаемости двигательных нейронов и/или способствует росту аксонов двигательных нейронов, например, у млекопитающего.

Как будет очевидно специалисту в данной области техники, фрагменты LINGO-2, такие как фрагменты, перечисленные выше, могут изменяться по длине, например, на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот на любом из двух концов (или длиннее или короче), исходя, например, из альтернативных предсказаний LINGO-2 доменных областей. Также предполагаются соответствующие фрагменты растворимых полипептидов LINGO-2 по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90 или 95% идентичные SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 или их фрагментам, описанным в настоящем документе.

Растворимые полипептиды LINGO-2 могут содержать любую комбинацию двух или более растворимых полипептидов LINGO-2. Соответственно, предполагаются растворимые полипептидные димеры LINGO-2, или гомодимеры или гетеродимеры. Два или более растворимых полипептида LINGO-2, как описано в настоящем документе, могут быть соединены непосредственно или могут быть соединены подходящим пептидным линкером. Данные пептидные линкеры описаны в другом месте настоящего описания.

Кроме того, любой из фрагментов, перечисленных выше, может дополнительно содержать секреторный сигнальный пептид на N-конце, например, аминокислоты 1-27 SEQ ID NO: 2. Можно также применять другие секреторные сигнальные пептиды, такие как пептиды, описанные в другом месте настоящего описания.

Растворимые полипептиды LINGO-2 могут быть циклическими. Циклизация растворимых полипептидов LINGO-2 уменьшает конформационную свободу линейных пептидов и приводит в результате к более структурно ограниченной молекуле. Многие способы циклизации пептидов известны в данной области техники. Например, циклизация "остов к оству" образованием амидной связи между N-концевыми и C-концевыми аминокислотными остатками пептида. Способ циклизации "остов к оству" включает образование дисульфидных мостиков между двумя со-тио аминокислотными остатками (например, цистеином, гомоцистеином). Определенные растворимые пептиды LINGO-2 содержат модификации по N- и C-концам пептида, образуя циклический полипептид LINGO-2. Данные модификации включают, но не ограничиваясь ими, цистeinовые остатки, ацетилированные цистeinовые остатки, цистeinовые остатки с NH₂ полипептида и биотина. Другие способы циклизации пептидов описаны в Li & Roller. Curr. Top. Med. Chem. 3:325-341 (2002), которая включена в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте.

V. Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты.

Антагонисты LINGO-2 также включают LINGO-2-специфические антитела или антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, которые представляют собой антагонисты активности LINGO-2, например антитело C09. Например, связывание определенных антител LINGO-2 с LINGO-2, как выражено в двигательных нейронах, блокирует ингибиование выживаемости двигательных нейронов или блокирует ингибиование роста аксонов двигательных нейронов. В определенных вариантах осуществления антагонистические антитела LINGO-2 способствуют выживаемости двигательных нейронов или способствуют росту аксонов двигательных нейронов, например, у млекопитающего.

В определенных вариантах осуществления связывающие молекулы, например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, варианты или производные, например антитело C09, связываются с LINGO-2 и способствуют выживаемости двигательных нейронов или способствуют росту аксонов двигательных нейронов.

В определенных вариантах осуществления анти-LINGO-2 антитела связываются с LINGO-2 человека, крысы, мыши или любой комбинацией LINGO-2 человека, крысы и мыши.

А. Полипептиды анти-LINGO-2 антител.

Настоящее изобретение также относится к выделенной связывающей молекуле, например, антителу или его связывающему антиген фрагменту, варианту или производному, которая может специфически связываться с тем же эпитопом LINGO-2, как антитело C09. В другом варианте осуществления выделенная связывающая молекула, например антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное, может специфически связываться с тем же эпитопом LINGO-2, как антитело, содержащее V_H и V_L C09. В другом варианте осуществления выделенная связывающая молекула, например антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное, может специфически связываться с тем же эпитопом LINGO-2, как антитело, содержащее V_H или V_L C09.

В другом варианте осуществления выделенная связывающая молекула, например антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное, может специфически связываться с LINGO-2 и конкурентно препятствовать специальному связыванию антитела C09 с LINGO-2, например с LINGO-2 человека, крысы, мыши или любой комбинацией LINGO-2 человека, крысы и мыши. В другом варианте осуществления выделенная связывающая молекула, например антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное, может специфически связываться с LINGO-2 и конкурентно препятствовать специальному связыванию антитела, содержащего V_H и V_L C09, с LINGO-2, например LINGO-2 человека, крысы, мыши или любой комбинацией LINGO-2 человека, крысы и мыши. В другом варианте осуществления выделенная связывающая молекула, например антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное, может специфически связываться с LINGO-2 и конкурентно препятствовать специальному связыванию антитела, содержащего V_H или V_L C09, например с LINGO-2 человека, крысы, мыши или любой комбинацией LINGO-2 человека, крысы и мыши.

В определенных вариантах осуществления связывающая молекула имеет аминокислотную последовательность, которая имеет по меньшей мере 80, 85, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94 или 95% идентичность последовательности аминокислотной последовательности молекулы контрольного анти-LINGO-2 антитела. В следующем варианте осуществления связывающая молекула имеет по меньшей мере 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательности с контрольным антителом. В определенных вариантах осуществления контрольное антитело представляет собой C09.

В другом варианте осуществления выделенное антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное включает, состоит по существу из или состоит из вариабельного домена тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H домен), где по меньшей мере одна из CDR V_H домена имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% идентична CDR1, CDR2 или CDR3 области из V_H аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 7, 8 или 9 (см. табл. 3), где антитело или его связывающий антиген фрагмент, содержащий кодируемый V_H домен, может специфически или преимущественно связываться с LINGO-2. В следующем варианте осуществления антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное способствует выживаемости двигательных нейронов или способствует росту аксонов двигательных нейронов.

Таблица 3

Эталонные последовательности V_H -CDR1, -CDR2 и -CDR3*

Название антитела	V_H -CDR1	V_H -CDR2	V_H -CDR3
	P=LYWMN (SEQ ID NO: 7)	P=SISPSGGWTKYADSV KG (SEQ ID NO: 8)	P=DHWGSGSPDY (SEQ ID NO: 9)
C09	N-CTTTACTGGATGAAT (SEQ ID NO: 15)	N=TCTATCTCTCCTTCT GGTGGCTGGACTAAGTA TGCTGACTCCGTTAAAG GT (SEQ ID NO: 16)	N=GATCATTGGGGTTCA GGGAGCCCCGACTAC (SEQ ID NO: 17)

*Определенные системой Кабата (см. выше) N=нуклеотидная последовательность, P=полипептидная последовательность.

В другом варианте осуществления выделенное антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное включает, состоит по существу из или состоит из вариабельного домена тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H домен), где по меньшей мере одна из CDR V_H домена имеет аминокислотную последовательность, которая является по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% идентичной CDR 1, 2 или 3, имеющему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, 8 или 9, соответственно, где антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное, содержащее кодируемый V_H домен, может специфически или преимущественно связываться с LINGO-2. В следующем варианте осуществления антитело или его связывающий антиген фрагмент способствует выживаемости двигательных нейронов или способствует росту аксонов двигательных нейронов.

В другом варианте осуществления выделенное антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное включает, состоит по существу из или состоит из вариабельного домена тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H домен), где по меньшей мере одна из CDR V_H домена имеет аминокислотную последовательность, идентичную, за исключением 1, 2, 3, 4 или 5 консервативных аминокислот-

ных замен, CDR 1, 2 или 3, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, 8 или 9, соответственно, где антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное, содержащее кодируемый V_H домен, может специфически или преимущественно связываться с LINGO-2. В следующем варианте осуществления антитело или его связывающий антиген фрагмент способствует выживаемости двигательных нейронов или способствует росту аксонов двигательных нейронов.

В другом варианте осуществления выделенное антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное включает, состоит по существу из или состоит из V_H домена, который имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична аминокислотной последовательности V_H SEQ ID NO: 10 (см. табл. 4), где антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное, содержащее кодируемый V_H домен, может специфически или преимущественно связываться с LINGO-2. В следующем варианте осуществления антитело или его связывающий антиген фрагмент вариант или производное способствует выживаемости двигательных нейронов или способствует росту аксонов двигательных нейронов.

Таблица 4

Эталонные последовательности V_H

Название антитела	V_H
C09	P=EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLYWMNWRQAPGKLEWVS SISPSGGWTKYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDH WGSGGSPDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO: 10) N=GAAGTTCAATTGTTAGAGTCTGGTGGCGGTCTTGTTCAGCCTGGTGGTT CTTTACGTCTTCTTGCGCTGCTCCGGATTCACTTCTCTCTTACTGGAA TGAATTGGGTTGCCAAGCTCTGGTAAAGGTTGGAGTGGGTTCTTCTA TCTCTCCTTCTGGTGGCTGGACTAAGTATGCTGACTCCGTTAAGGTCGCT TCACATCTCTAGAGACAACCTCTAAGAAACTCTACTTGCAAGAGATCATTGGG GCTTAAGGGCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAGATCATTGGG GTTCAAGGGAGCCCGACTACTGGGGCCAGGGAACCCGGTCACCGTCTCAA GC (SEQ ID NO: 18)

N=нуклеотидная последовательность, P=полипептидная последовательность.

В другом варианте осуществления выделенное антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное включает, состоит по существу из или состоит из вариабельного домена легкой цепи иммуноглобулина (V_L домен), где по меньшей мере одна из CDR V_L домена имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% идентична CDR1, CDR2 или CDR3 области из аминокислотных последовательностей V_L SEQ ID NO: 11, 12 или 13 (см. табл. 5), где антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное, содержащее кодируемый V_L домен, может специфически или преимущественно связываться с LINGO-2. В следующем варианте осуществления антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное способствует выживаемости двигательных нейронов или способствует росту аксонов двигательных нейронов.

Таблица 5

Эталонные последовательности V_L -CDR1, -CDR2 и -CDR3*

Название антитела	V_L -CDR1	V_L -CDR2	V_L -CDR3
C09	P=TGSSRDVGGYDYVS (SEQ ID NO: 11)	P-EVTKRPS (SEQ ID NO: 12)	P=CSYAGANTYV i (SEQ ID NO: 13)

	N=ACTGGATCCAGCCGT GACGTTGGTGGTTATGA TTATGTCTCC (SEQ ID NO: 19)	N=GAGGTCACTAACGCGGCC CTCA (SEQ ID NO: 20)	N= TGCTCATATGCAGGC GCCAACACTTATGTC (SEQ ID NO: 21)
--	--	---	--

*Определенные системой Кабата (см. выше) N=нуклеотидная последовательность, P=полипептидная последовательность.

В другом варианте осуществления выделенное антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное включает, состоит по существу из или состоит из вариабельного домена легкой цепи иммуноглобулина (V_L домен), где по меньшей мере одна из CDR V_L домена имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% идентична CDR 1, 2, или 3, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, 12 или 13, соответственно, где антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное, содержащее кодируемый V_L домен, может специфически или преимущественно связываться с LINGO-2. В следующем варианте осуществления антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное способствует выживаемости двигательных нейронов или способствует росту аксонов двигательных нейронов.

В другом варианте осуществления выделенное антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное включает, состоит по существу из или состоит из вариабельного домена легкой цепи иммуноглобулина (V_L домен), где по меньшей мере одна из CDR V_L домена имеет аминокислотную последовательность, идентичную, за исключением 1, 2, 3, 4 или 5 консервативных аминокислотных замен, CDR 1, 2 или 3, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, 12 или 13 соответ-

ственno, где антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное, содержащее кодируемый V_L домен, может специфически или преимущественно связываться с LINGO-2. В следующем варианте осуществления антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное способствует выживаемости двигательных нейронов или способствует росту аксонов двигательных нейронов.

В следующем варианте осуществления выделенное антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное включает, состоит по существу из или состоит из V_L домена, который имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична V_L аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14 (см. табл. 6), где антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное, содержащее кодируемый V_L домен, может специфически или преимущественно связываться с LINGO-2. В следующем варианте осуществления антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное способствует выживаемости двигательных нейронов или способствует росту аксонов двигательных нейронов.

Таблица 6

Эталонные последовательности V_L

Название антитела	V_H
C09	P=QSVLTQPPSASGSPGQSLTISCTGSSRDVGGYDYVSWFQQHPGKAPKLV ISETVKRPSGVPDFSGSKSGNTASLTVSGLQPEDEADYYCCSYAGANTYV FGSGTRVTVL (SEQ ID NO: 14) N=CAGAGCGTCTTGACTCAGCCTCCCTCCGCGTCCGGGTCTCTGGACAGT CACTCACCACATCTCTGCACTGGATCCAGCCGTGACGTTGGTTATGATT ATGTCCTCTGGTTCCAACAAACACCCAGGCAAAGCCCCAAACTCGTGATT CTGAGGTCACTAAGCGGCCCTCAGGGTCCCTGATCGGTTCTCTGGCTCCA AGTCTGGCAACACGGCCCTCCCTGACCGCTCTGGACTCCAACCTGAGGATG AGGCTGATTATTATTGCTGCTCATATGCAGGCGCCAACAACTTATGTCTTCG GAAGTGGGACCAGAGTCACCGTCCTG (SEQ ID NO: 22)

N=нуклеотидная последовательность, P=полипептидная последовательность.

Определенные антагонистические антитела могут специфически или преимущественно связываться с конкретным LINGO-2 полипептидным фрагментом или доменом, например, полипептидом LINGO-2, фрагментом, вариантом или производным, как описано в настоящем документе.

Подходящие биологически активные варианты анти-LINGO-2 антитела также являются пригодными. Данные варианты будут сохранять требуемые связывающие свойства исходного анти-LINGO-2 антитела. Способы получения вариантов антител обычно являются доступными в данной области техники.

Точная химическая структура полипептида, способного специфически связываться с LINGO-2 и сохраняющего требуемую активность, зависит от ряда факторов. Поскольку в молекуле присутствуют ионизируемые амино и карбоксильные группы, конкретный полипептид можно получить в виде кислой или основной соли, или в природной форме. Все данные препараты, которые сохраняют их биологическую активность при помещении в подходящие окружающие условия, включены в определение анти-LINGO-2 антитела, как применяют в настоящем описании. Кроме того, первичную аминокислотную последовательность полипептида можно дополнить дериватизацией, используя сахарные остатки (гликозилирование) или другие дополнительные молекулы, такие как липиды, фосфатные, ацетильные группы и подобные. Ее можно также дополнить конъюгированием с сахаридаами. Определенные аспекты данного дополнения осуществляют системой посттрансляционной обработки продуцирующего хозяина; другие данные модификации можно вводить *in vitro*. В любом случае, данные модификации включены в определение анти-LINGO-2 антитела, применяемого в настоящем изобретении, при условии, что требуемые свойства анти-LINGO-2 антитела не нарушаются. Ожидают, что данные модификации могут количественно или качественно влиять на активность, или увеличивая или снижая активность полипептида, в различных анализах. Кроме того, отдельные аминокислотные остатки в цепи можно модифицировать окислением, восстановлением или другой дериватизацией, и полипептид можно расщеплять с получением фрагментов, которые сохраняют активность. Данные изменения, которые не будут нарушать требуемые свойства (например, специфичность связывания с LINGO-2, аффинность связывания и связанную с ними активность, например способность ингибировать смерть двигательных нейронов и стимулировать рост аксонов двигательных нейронов) не устраниют полипептидную последовательность из определения соответствующих анти-LINGO-2 антител, как применяют в настоящем описании.

Данная область техники обеспечивает капитальное руководство, касающееся получения и применения вариантов полипептидов. При получении вариантов анти-LINGO-2 связывающей молекулы, например, антитела или его связывающего антиген фрагмента, варианта или производного, специалист в данной области техники может легко определить, какие модификации нуклеотидной или аминокислотной последовательности нативного белка будут приводить в результате к варианту, который будет пригоден для применения в качестве терапевтически активного компонента фармацевтической композиции.

Можно вводить мутации только в каркасные области или только в CDR области молекулы антитела. Введенные мутации могут представлять собой молчание мутации или нейтральные мутации с изме-

нением смысла, т.е. не имеющие или имеющие небольшой эффект на способность антитела связываться с антигеном. Данные типы мутаций могут быть пригодными для оптимизации частоты применения кодона или улучшения получения гибридомных антител. Альтернативно, не-нейтральные мутации с изменением смысла могут изменять способность антитела связываться с антигеном. Большинство молчащих и нейтральных мутаций с изменением смысла, вероятно, будет находиться в каркасных областях, тогда как большинство не-нейтральных мутаций с изменением смысла, вероятно, будет находиться в CDR, хотя это не представляет собой абсолютное требование. Специалист в данной области техники способен сконструировать и испытать мутантные молекулы с требуемыми свойствами, такими как без изменений антигенсвязывающей активности или с изменением связывающей активности (например, увеличением антигенсвязывающей активности или изменением специфичности антитела). После мутагенеза, кодируемый белок можно стандартно экспрессировать, и можно определить функциональную и/или биологическую активность кодируемого белка (например, способность иммunoспецифически связываться по меньшей мере с одним эпипептидом LINGO-2), применяя способы, описанные в настоящем документе, или стандартной модификацией способов, известных в данной области техники.

В определенных вариантах осуществления анти-LINGO-2 антитела содержат по меньшей мере одну оптимизированную определяющую комплементарность область (CDR). Под "оптимизированной CDR" предполагается, что CDR модифицирована и оптимизирована по последовательности, исходя из устойчивой или повышенной аффинности связывания и/или анти-LINGO-2 активности, которая придается анти-LINGO-2 антителу, содержащему оптимизированную CDR. "Анти-LINGO-2 активность" может включать, например, активность, которая модулирует одну или более из следующих активностей, связанных с LINGO-2, например, LINGO-2 зависимую клеточную смерть двигательных нейронов, LINGO-2 зависимое ингибирование роста аксонов двигательных нейронов или любую другую активность, связанную с LINGO-2. Анти-LINGO-2 активность можно также приписать снижению частоты возникновения или тяжести заболеваний, связанных с LINGO-2 экспрессией, включая, но не ограничиваясь ими, определенные типы заболеваний, связанных с двигательными нейронами, например, амиотрофический боковой склероз (ALS), болезнь Паркинсона и эссенциальный трепор (ET). Модификации могут включать замены аминокислотных остатков в CDR так, чтобы анти-LINGO-2 антитело сохраняло специфичность в отношении LINGO-2 антигена и обладало повышенной аффинностью связывания и/или повышенной анти-LINGO-2 активностью.

В. Полинуклеотиды, кодирующие анти-LINGO-2 антитела.

Настоящее изобретение также относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующими анти-LINGO-2 антитела настоящего изобретения, или их антигенсвязывающим фрагментам, вариантам или производным.

В одном из вариантов осуществления выделенный полинуклеотид включает, состоит по существу из или состоит из нуклеиновой кислоты, кодирующей вариабельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина (V_H домен), где по меньшей мере одна из CDR V_H домена кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% идентична полинуклеотидной последовательности V_H -CDR1, -2 или -3 V_H -кодирующей последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 18 (см. табл. 4). В определенных вариантах осуществления полинуклеотид кодирует антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное, которое способствует выживаемости двигательных нейронов и/или росту аксонов двигательных нейронов.

В других вариантах осуществления выделенный полинуклеотид включает, состоит по существу из или состоит из нуклеиновой кислоты, кодирующей V_H домен иммуноглобулина, где последовательность по меньшей мере одной из CDR V_H домена выбрана из группы, состоящей из (a) CDR1 последовательности, содержащей аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO: 7; (b) CDR2 последовательности, содержащей аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO: 8; и (c) CDR3 последовательности, содержащей аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO: 9. В определенных вариантах осуществления полинуклеотид кодирует антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное, которое способствует выживаемости двигательных нейронов и/или росту аксонов двигательных нейронов.

В следующем варианте осуществления выделенный полинуклеотид включает, состоит по существу из или состоит из нуклеиновой кислоты, кодирующей V_H домен, который имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична на эталонной полипептидной последовательности V_H домена, содержащей SEQ ID NO: 10, где анти-LINGO-2 антитело, содержащее кодируемый V_H домен, специфически или преимущественно связывается с LINGO-2. В определенных вариантах осуществления полинуклеотид кодирует антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное, которое способствует выживаемости двигательных нейронов и/или росту аксонов двигательных нейронов.

В одном из вариантов осуществления выделенный полинуклеотид включает, состоит по существу из или состоит из нуклеиновой кислоты, кодирующей вариабельный домен легкой цепи иммуноглобулина (V_L домен), где по меньшей мере одна из CDR V_L домена кодируется последовательностью нуклеиновой кислоты, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% идентична полинуклеотидной

последовательности V_L -CDR1, -2, или -3 V_L -кодирующей последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 22 (см. табл. 6). В определенных вариантах осуществления полинуклеотид кодирует антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное, которое способствует выживаемости двигательных нейронов и/или росту аксонов двигательных нейронов.

В других вариантах осуществления выделенный полинуклеотид включает, состоит по существу из или состоит из нуклеиновой кислоты, кодирующей V_L домен иммуноглобулина, где последовательность по меньшей мере одной из CDR V_L домена выбрана из группы, состоящей из: (a) CDR1 последовательности, содержащей аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO: 11; (b) CDR2 последовательности, содержащей аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO: 12, и (c) CDR3 последовательности, содержащей аминокислотную последовательность, описанную в SEQ ID NO: 13. В определенных вариантах осуществления полинуклеотид кодирует антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное, которое способствует выживаемости двигательных нейронов и/или росту аксонов двигательных нейронов.

В следующем варианте осуществления выделенный полинуклеотид включает, состоит по существу из или состоит из нуклеиновой кислоты, кодирующей V_L домен, который имеет аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична эталонной полипептидной последовательности V_L домена, содержащей SEQ ID NO: 14, где анти-LINGO-2 антитело, содержащее кодируемый V_L домен, специфически или преимущественно связывается с LINGO-2. В определенных вариантах осуществления полинуклеотид кодирует антитело или связывающий антиген фрагмент, вариант или производное, которое способствует выживаемости двигательных нейронов и/или росту аксонов двигательных нейронов.

Любой из полинуклеотидов, описанных выше, может дополнительно содержать дополнительные нуклеиновые кислоты, кодирующие, например, сигнальный пептид для направленной секреции кодируемого полипептида, константные области антитела, как описано в настоящем документе, или другие гетерологичные полипептиды, как описано в настоящем документе. Кроме того, настоящее изобретение относится к композициям, содержащим один или более полинуклеотидов, описанных выше.

В одном из вариантов осуществления композиция содержит первый полинуклеотид и второй полинуклеотид, где указанный первый полинуклеотид кодирует V_H домен, как описано в настоящем документе, и где указанный второй полинуклеотид кодирует V_L домен, как описано в настоящем документе. Конкретно, настоящее изобретение относится к композиции, которая содержит, состоит по существу из или состоит из кодирующего V_H домен полинуклеотида, как описано в SEQ ID NO: 18, и кодирующего V_L домен полинуклеотида, например полинуклеотида, кодирующего V_L домен, как описано в SEQ ID NO: 22. Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей, состоящей по существу из или состоящей из кодирующего V_H домен полинуклеотида, содержащего последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 9, и кодирующего V_L домен полинуклеотида, содержащего последовательности нуклеиновых кислот, кодирующих SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 13.

Настоящее изобретение также относится к фрагментам полинуклеотидов, как описано в другом месте. Кроме того, также предполагаются полинуклеотиды, которые кодируют слитые полиполипептиды, Fab фрагменты и другие производные, как описано в настоящем документе.

Полинуклеотиды можно получить любым способом, известным в данной области техники. Например, если нуклеотидная последовательность антитела является известной, полинуклеотид, кодирующий антитело, можно собрать из химически полученных олигонуклеотидов (например, как описано в Kutmeier et al., Bio Techniques, 17:242 (1994)), который, кратко, включает получение перекрывающихся олигонуклеотидов, содержащих части последовательности, кодирующей антитело, отжиг и легирование данных олигонуклеотидов, и затем амплификацию легированных олигонуклеотидов ПЦР.

Альтернативно, полинуклеотид, кодирующий анти-LINGO-2 антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное, можно получить из нуклеиновой кислоты из подходящего источника. Если клон, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую конкретное антитело, недоступен, но последовательность молекулы антитела является известной, нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, можно получить химически или получить из подходящего источника (например, библиотеки кДНК антител или библиотеки кДНК, полученной из, или нуклеиновой кислоты, например, поли А+РНК, выделенной из любой ткани или клеток, экспрессирующих антитело или другое анти-LINGO-2 антитело, таких как гибридомные клетки, отобранный для экспрессии антитела), амплификацией ПЦР, используя синтетические праймеры, гибридизующиеся с 3'- и 5'- концами последовательности, или клонированием, применяя олигонуклеотидный зонд, специфический для конкретной последовательности гена, для обнаружения, например, клона кДНК в библиотеке кДНК, который кодирует антитело или другое анти-LINGO-2 антитело. Затем амплифицированные нуклеиновые кислоты, полученные ПЦР, можно клонировать в реплицируемых клонирующих векторах, применяя любой способ, хорошо известный в данной области техники.

После определения нуклеотидной последовательности и соответствующей аминокислотной последовательности анти-LINGO-2 антитела или его связывающего антиген фрагмента, варианта или произ-

водного можно манипулировать с его нуклеотидной последовательностью, применяя способы, хорошо известные в данной области техники для манипулирования с нуклеотидными последовательностями, например, способы рекомбинантных ДНК, сайт-направленный мутагенез, ПЦР и т.д. (см., например, способы, описанные в Sambrook et al. (1990), Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.) и Ausubel et al., eds. (1998) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, NY), обе из которых включены в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте), с получением антител, имеющих различные аминокислотные последовательности, например, вводя аминокислотные замены, делеции и/или вставки.

Полинуклеотид, кодирующий анти-LINGO-2 связывающую молекулу, например антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное, может состоять из любого полирибонуклеотида или полидезоксирибонуклеотида, который может представлять собой немодифицированную РНК или ДНК или модифицированную РНК или ДНК. Например, полинуклеотид, кодирующий анти-LINGO-2 антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное, может состоять из одно- и двухцепочечной ДНК, ДНК, которая представляет собой смесь одно- и двухцепочечных областей, одно- и двухцепочечной РНК и РНК, которая представляет собой смесь одно- и двухцепочечных областей, гибридных молекул, содержащих ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или, более конкретно, двухцепочечными, или смесью одно- и двухцепочечных областей. Кроме того, полинуклеотид, кодирующий анти-LINGO-2 связывающую молекулу, например, антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное, может состоять из трехцепочечных областей, содержащих РНК или ДНК или как РНК, так и ДНК. Полинуклеотид, кодирующий анти-LINGO-2 связывающую молекулу, например антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное, может также содержать одно или более модифицированных оснований или ДНК или РНК остатки, модифицированные для увеличения стабильности или по другим причинам. "Модифицированные" основания включают, например, основания, содержащие тритий, и нестандартные основания, такие как инозин. Ряд модификаций можно вводить в ДНК и РНК; таким образом, "полинуклеотид" включает химически, ферментативно или метаболически модифицированные формы.

Выделенный полинуклеотид, кодирующий неприродный вариант полипептида, полученного из иммуноглобулина (например, части тяжелой цепи или части легкой цепи иммуноглобулина), можно получить введением одной или более нуклеотидных замен, присоединений или делеций в нуклеотидную последовательность иммуноглобулина, так чтобы одна или более аминокислотных замен, присоединений или делеций вводились в кодируемый белок. Мутации можно вводить стандартными способами, такими как сайт-направленный мутагенез и мутагенез с помощью ПЦР. Консервативные аминокислотные замены можно вводить по одному или более остаткам заменимых кислот.

С. Характеристики анти-LINGO-2 антител.

В других вариантах осуществления связывающая молекула, например антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное, специфически или преимущественно связываются по меньшей мере с одним эпитопом LINGO-2, где эпитоп включает, состоит по существу из или состоит по меньшей мере из приблизительно 4-5 аминокислот SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, по меньшей мере 7, по меньшей мере 9 или по меньшей мере приблизительно от 15 до приблизительно 30 аминокислот SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4. Аминокислоты указанного эпитопа SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, как описано, могут быть, но необязательно, непрерывными или линейными. В определенных вариантах осуществления по меньшей мере один эпитоп LINGO-2 включает, состоит по существу из или состоит из нелинейного эпитопа, образованного внеклеточным доменом LINGO-2, в экспрессируемом на поверхности клетки виде или в виде растворимого фрагмента, например, слитого с Fc областью IgG. Таким образом, в определенных вариантах осуществления по меньшей мере один эпитоп LINGO-2 включает, состоит по существу из или состоит по меньшей мере из 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7, по меньшей мере 8, по меньшей мере 9, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20, по меньшей мере 25, приблизительно от 15 до приблизительно 30 или по меньшей мере 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 непрерывных или не непрерывных аминокислот SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, где не непрерывные аминокислоты образуют эпитоп при сворачивании белка.

В других вариантах осуществления антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное специфически или преимущественно связывается по меньшей мере с одним эпитопом LINGO-2, где эпитоп включает, состоит по существу из или состоит из, в добавление к одной, двум, трем, четырем, пяти, шести или более непрерывным или не непрерывным аминокислотам SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 4, как описано выше, дополнительный полипептид, который модифицирует белок, например, полипептид, содержащий углеводные остатки, можно включать так, чтобы антитело LINGO-2 связывалось с большей аффинностью с модифицированным целевым белков, чем оно связывается с немодифицированным вариантом белка.

Альтернативно, антитело LINGO-2 вообще не связывается с немодифицированным вариантом целевого белка.

В других вариантах осуществления антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное связывается с LRR доменом LINGO-2.

В дополнительных вариантах осуществления антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное связывается с эпитопом аминокислот 28-408 SEQ ID NO: 2, аминокислот 58-343 SEQ ID NO: 2, аминокислот 82-343 SEQ ID NO: 2, аминокислот 106-343 SEQ ID NO: 2, аминокислот 130-343 SEQ ID NO: 2, аминокислот 154-343 SEQ ID NO: 2, аминокислот 178-343 SEQ ID NO: 2, аминокислот 202-343 SEQ ID NO: 2, аминокислот 226-343 SEQ ID NO: 2 или аминокислот 250-343 SEQ ID NO: 2.

В дополнительных вариантах осуществления антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное связывается с эпитопом аминокислот 202-223 SEQ ID NO: 2, аминокислот 202-247 SEQ ID NO: 2, аминокислот 202-271 SEQ ID NO: 2, аминокислот 202-295 SEQ ID NO: 2, аминокислот 202-319 SEQ ID NO: 2 или аминокислот 202-343 SEQ ID NO: 2.

В дополнительных вариантах осуществления антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное связывается с эпитопом аминокислот 226-247 SEQ ID NO: 2, аминокислот 226-271 SEQ ID NO: 2, аминокислот 226-295 SEQ ID NO: 2, аминокислот 226-319 SEQ ID NO: 2 или аминокислот 226-343 SEQ ID NO: 2.

В дополнительных вариантах осуществления антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное связывается с эпитопом аминокислот 250-271 SEQ ID NO: 2, аминокислот 250-295 SEQ ID NO: 2, аминокислот 250-319 SEQ ID NO: 2 или аминокислот 250-343 SEQ ID NO: 2.

В дополнительных вариантах осуществления антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное связывается с эпитопом аминокислот 274-295 SEQ ID NO: 2, аминокислот 274-319 SEQ ID NO: 2 или аминокислот 274-343 SEQ ID NO: 2.

В дополнительных вариантах осуществления антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное связывается с эпитопом аминокислот 298-319 SEQ ID NO: 2 или аминокислот 298-343 SEQ ID NO: 2.

В определенных вариантах осуществления антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное специфически связывается по меньшей мере с одним эпитопом LINGO-2 или фрагмента или варианта, описанных выше, т.е. связывается с данным эпитопом более быстро, чем оно может связываться с неродственным или случайным эпитопом; связывается преимущественно по меньшей мере с одним эпитопом LINGO-2 или фрагмента или варианта, описанных выше, т.е. связывается с данным эпитопом более быстро, чем оно может связываться с неродственным, аналогичным, гомологичным или аналогичным эпитопом; конкурентно препятствует связыванию контрольного антитела, которое само специфически или преимущественно связывается с определенным эпитопом LINGO-2 или фрагмента или варианта, описанных выше; или связывается по меньшей мере с одним эпитопом LINGO-2 или фрагмента или варианта, описанных выше с аффинностью, характеризующейся константой диссоциации K_D , меньшей, чем приблизительно 5×10^{-2} М, приблизительно 10^{-2} М, приблизительно 5×10^{-3} М, приблизительно 10^{-3} М, приблизительно 5×10^{-4} М, приблизительно 10^{-4} М, приблизительно 5×10^{-5} М, приблизительно 10^{-5} М, приблизительно 5×10^{-6} М, приблизительно 10^{-6} М, приблизительно 5×10^{-7} М, приблизительно 10^{-7} М, приблизительно 5×10^{-8} М, приблизительно 10^{-8} М, приблизительно 5×10^{-9} М, приблизительно 10^{-9} М, приблизительно 5×10^{-10} М, приблизительно 10^{-10} М, приблизительно 5×10^{-11} М, приблизительно 10^{-11} М, приблизительно 5×10^{-12} М, приблизительно 10^{-12} М, приблизительно 5×10^{-13} М, приблизительно 10^{-13} М, приблизительно 5×10^{-14} М, приблизительно 10^{-14} М, приблизительно 5×10^{-15} М или приблизительно 10^{-15} М. В конкретном аспекте антитело или его фрагмент преимущественно связывается с полипептидом LINGO-2 человека или его фрагментом по сравнению с полипептидом LINGO-2 мыши или его фрагментом.

Как применяют в контексте константы диссоциации связывания антитела, термин "приблизительно" делает поправку на степень вариации, присущей способам, применяемым для измерения аффинности антитела. Например, в зависимости от степени точности применяемых измерительных приборов, среднеквадратичной ошибки, исходя из количества измеряемых образцов и погрешности при округлении, термин "приблизительно 10^{-2} М" может включать, например, от 0,05 до 0,005 М.

В конкретных вариантах осуществления антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное связывается с полипептидами LINGO-2 или их фрагментами или вариантами со скоростью диссоциации ($k(\text{off})$) меньше или равной 5×10^{-2} , 10^{-2} , 5×10^{-3} или 10^{-3} с^{-1} . Альтернативно, антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное связывается с полипептидами LINGO-2 или их фрагментами или вариантами со скоростью диссоциации ($k(\text{off})$) меньше или равной 5×10^{-4} , 10^{-4} , 5×10^{-5} или 10^{-5} , 5×10^{-6} , 10^{-6} , 5×10^{-7} или 10^{-7} с^{-1} .

В других вариантах осуществления антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное связывается с полипептидами LINGO-2 или их фрагментами или вариантами со скоростью ассоциации ($k(\text{on})$) больше или равной 10^3 , 5×10^3 , 10^4 или $5 \times 10^4 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. Альтернативно, антитело или его связывающий антиген фрагмент, вариант или производное связывается с полипептидами LINGO-2 или их фрагментами или вариантами со скоростью ассоциации ($k(\text{on})$), больше или равной 10^5 , 5×10^5 , 10^6 , или 5×10^6 , или $10^7 \text{ М}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$.

В определенных антагонистических антителах LINGO-2 или их антигенсвязывающих фрагментах по меньшей мере часть одного или более доменов константной области удалена или иначе изменена так, чтобы обеспечить требуемые биохимические характеристики, такие как пониженные эффекторные функции, способность к нековалентной димеризации, повышенная способность локализоваться в участке опухоли, сниженное время полужизни в сыворотке или повышенное время полужизни в сыворотке при сравнении с полным немодифицированным антителом приблизительно той же иммуногенности. Например, определенные антитела представляют собой антитела с удаленным доменом, которые содержат полипептидную цепь, аналогичную тяжелой цепи иммуноглобулина, но которые не содержат по меньшей мере часть одного или более доменов тяжелой цепи. Например, в определенных антителах один целый домен константной области модифицированного антитела будет удален, например, будет удален весь или часть C_H2 домена.

В определенных антагонистических антителах LINGO-2 или их антигенсвязывающих фрагментах Fc часть может быть мутирована, снижая эффекторную функцию, применяя способы, известные в данной области техники. Например, модификации константной области можно применять для модификации дисульфидных связей или олигосахаридных остатков, которые обеспечивают усиленную локализацию благодаря повышенной антигенной специфичности или гибкости антитела. Полученные в результате физиологический профиль, биодоступность и другие биохимические эффекты модификаций можно легко измерить и количественно определить, применяя хорошо известные иммунологические способы без чрезмерного экспериментирования.

В определенных вариантах осуществления антагонистическое антитело LINGO-2 или его связывающий антиген фрагмент не будет вызывать вредной иммунной реакции у животного, которого будут лечить, например, у человека. В одном из вариантов осуществления антагонистические антитела LINGO-2 или их антигенсвязывающие фрагменты можно модифицировать, снижая их иммуногенность, применяя способы, известные в данной области техники. Например, антитела можно гуманизировать, приматизировать, деиммунизировать или можно получать химерные антитела. Данные типы антител получают из нечеловеческого антитела, обычно мышного или приматного антитела, которое сохраняет или по существу сохраняет антигенсвязывающие свойства исходного антитела, но которое является менее иммуногенным для людей. Этого можно достигнуть различными способами, включая (a) прививку полных нечеловеческих вариабельных доменов человеческим константным областям, с получением химерных антител; (b) прививку по меньшей мере части одного или более человеческих определяющих комплементарность областей (CDR) человеческому остову и константным областям с или без сохранения важных остатков остова; или (c) трансплантацию полных нечеловеческих вариабельных доменов, но "скрывая" их человеческие участки замещением поверхностных остатков. Данные способы описаны в Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81:6851-6855 (1984); Morrison et al., Adv. Immunol. 44:65-92 (1988); Verhoeven et al., Science 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun. 28:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immun. 31:169-217 (1994) и патентах США № 5585089, 5693761, 5693762 и 6190370, все из которых включены в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте.

Модифицированные формы антител или их антигенсвязывающих фрагментов можно получать из цельных предшественников или исходных антител, применяя способы, известные в данной области техники. Примеры способов обсуждаются более подробно в настоящем описании.

Антагонистические антитела LINGO-2 или их антигенсвязывающие фрагменты можно получить, применяя способы, которые известны в данной области техники. В определенных вариантах осуществления молекулы антител или их фрагментов "получены рекомбинантно", т.е. получены с применением способа рекомбинантных ДНК. Примеры способов получения молекул антител или их фрагментов обсуждаются более подробно в настоящем описании.

Антагонистические антитела LINGO-2 или их фрагменты можно получить любым способом, известным в данной области техники, включая получение поликлональных антител или получение моно克лональных антител, например, посредством гибридомы или фагового дисплея.

Ряд систем экспрессионных векторов можно применять для экспрессии молекул антител. Клетку-хозяина можно совместно трансфицировать двумя экспрессионными векторами, первым вектором, кодирующим полипептид, полученный из тяжелой цепи, и вторым вектором, кодирующим полипептид, полученный из легкой цепи. Два вектора могут содержать идентичные селектируемые маркеры, которые обеспечивают равную экспрессию полипептидов тяжелой и легкой цепи. Альтернативно, можно использовать один вектор, который кодирует полипептиды как тяжелой, так и легкой цепи. В данных случаях легкую цепь предпочтительно помещают перед тяжелой цепью, избегая избытка токсичной свободной тяжелой цепи (Proudfoot, Nature, 322:52 (1986); Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:2197 (1980)). Клетку-хозяина можно также трансфицировать одним вектором, кодирующим полипептид, полученный из тяжелой цепи, и полипептид, полученный из легкой цепи. Кодирующие последовательности тяжелой и легкой цепей могут содержать кДНК или геномную ДНК.

Экспрессирующий вектор или векторы трансфицируют в клетку-хозяина общепринятыми способами, и затем трансфицированные клетки выращивают общепринятыми способами с получением антитела. Таким образом, настоящее изобретение относится к клеткам-хозяевам, содержащим полинуклеотид, ко-

дирующий антитело или его тяжелую или легкую цепь, функционально соединенный с гетерологичным промотором. В определенных вариантах осуществления для экспрессии двухцепочечных антител, векторы, кодирующие как тяжелую, так и легкую цепи, можно совместно экспрессировать в клетке-хозяине для экспрессии цельной иммуноглобулиновой молекулы.

Когда антитело экспрессируют рекомбинантно, его можно очистить любым способом, известным в данной области техники для очистки молекулы иммуноглобулина, например, хроматографией (например, ионообменной, аффинной, в частности с аффинностью в отношении специфического антигена после белка A, и гель колоночной хроматографией), центрифугированием, дифференциальной растворимостью или любым другим стандартным способом очистки белков. Альтернативно, способ увеличения аффинности антител описан в US 2002 0123057 A1.

В одном из вариантов осуществления связывающая молекула или антигенсвязывающая молекула содержит синтетическую константную область, в которой один или более доменов частично или полностью удалены ("антитела с удаленным доменом(ами)"). В определенных вариантах осуществления сходные модифицированные антитела будут содержать конструкты или варианты с удаленным доменом(ами), в которых удален целый C_H2 домен (ΔC_{H2} конструкты). Для других вариантов осуществления вместо удаленного домена можно использовать короткий соединяющий пептид, обеспечивая гибкость и свободу движения для вариабельной области. Специалистам в данной области техники будет очевидно, что данные конструкты могут быть желательны в определенных обстоятельствах благодаря регулирующим свойствам C_H2 домена на кatabолическую скорость антитела. Конструкты с удаленным доменом(ами) можно получить, используя вектор (например, из Biogen IDEC Incorporated), кодирующий константный домен IgG₁ человека (см., например, WO 02/060955A2 и WO 02/096948A2). Данный пример вектора получали рекомбинантно, удаляя C_H2 домен, и он обеспечивал синтетический вектор, экспрессирующий константную область IgG₁ с удаленным доменом.

Настоящее изобретение также относится к применению антител, которые содержат, состоят по существу из или состоят из вариантов (включая производные) молекул антител (например, V_H областей и/или V_L областей), описанных в настоящем документе, где антитела или их фрагменты иммunoспецифически связываются с полипептидом LINGO-2.

VI. Конгьюгаты и слияния полипептидов и антител

Настоящее изобретение также относится к полипептиду LINGO-2, например, антагонистическому полипептиду LINGO-2, слитому с гетерологичным полипептидом с образованием слитого белка LINGO-2. Настоящее изобретение также относится к анти-LINGO-2 антителам, слитым с гетерологичными полипептидами. LINGO-2 слитые белки и слияния антител можно применять для достижения различных целей, например, повышения времени полужизни в сыворотке, повышения биодоступности, *in vivo* направленной доставки в конкретный тип органов или ткань, увеличения эффективности рекомбинантной экспрессии, увеличения секреции клеткой-хозяином, простоты очистки и большей авидности. В зависимости от цели(ей), которую(ые) требуется достичь, гетерологичный полипептид может быть инертным или биологически активным. Кроме того, его можно выбрать таким образом, чтобы он был стабильно слитым с полипептидом LINGO-2 или антителом или отщеплялся, *in vitro* или *in vivo*. Гетерологичные молекулы для достижения различных целей известны в данной области техники.

В качестве альтернативы экспрессии антагонистического слитого полипептида LINGO-2 или антитела, выбранный гетерологичный полипептид можно предварительно получать и химически конъюгировать с антагонистическим полипептидом LINGO-2 или антителом. В большинстве случаев, выбранный гетерологичный полипептид будет функционировать аналогично, слит ли или конъюгирован он с антагонистическим полипептидом LINGO-2 или антителом. Следовательно, в следующем обсуждении гетерологичных аминокислотных последовательностей, если не указано иное, ясно, что гетерологичную последовательность можно соединять с антагонистическим полипептидом LINGO-2 или антителом в виде слитого белка или в виде химического конъюгата.

В некоторых способах применяют полипептид LINGO-2, где полипептид LINGO-2 является слитым с Fc областью, т.е. С-концевой частью константной области тяжелой цепи Ig. В одном из вариантов осуществления растворимый полипептид LINGO-2 является слитым с шарнирной областью и Fc областью. Потенциальные преимущества LINGO-2-Fc слияния включают растворимость, стабильность *in vivo* и мультивалентность, например, димеризацию. Применяемая Fc область может представлять собой Fc область IgA, IgD или IgG (шарнир-C_H2-C_H3). Альтернативно, она может представлять собой Fc область IgE или IgM (шарнир-C_H2-C_H3-CH4). Можно также применять Fc область IgG, например, Fc область IgG₁ или Fc область IgG₄. Материалы и способы создания и экспрессии ДНК, кодирующей Fc слияния, известны в данной области техники, и их можно применять для получения LINGO-2 слияний без чрезмерного экспериментирования. В некоторых способах применяют LINGO-2 слитый белок, такой как белок, описанный Capon et al. в патентах США № 5428130 и 5565335.

Полностью интактные Fc области дикого типа обладают эффекторными функциями, которые могут быть необязательными или нежелательными в Fc слитом белке. Следовательно, определенные связывающие участки можно удалять из Fc области в слитом белке. Например, поскольку совместная экспрессия с легкой цепью не является обязательной, связывающий участок для связывающего белка тяжелой

цепи, Bip (Hendershot et al., 1987, Immunol. Today, 8:111-114) удаляют из C_{H2} домена Fc области IgE, чтобы данный участок не препятствовал эффективной секреции. Аналогично, цистеиновые остатки, присутствующие в Fc областях, которые ответственны за связывание с легкой цепью иммуноглобулина, можно удалять или заменять другой аминокислотой, чтобы данные цистеиновые остатки не препятствовали правильному сворачиванию Fc области. Можно также удалять последовательности трансмембранных доменов, таких как домены, присутствующие в IgM.

В определенных вариантах осуществления применяют Fc область IgG₁. Альтернативно, можно применять Fc область других подклассов иммуноглобулина гамма (гамма-2, гамма-3 и гамма-4) в секреторной кассете. Fc область IgG₁ иммуноглобулина гамма-1 содержит по меньшей мере часть шарнирной области, C_{H2} область и C_{H3} область. В некоторых вариантах осуществления Fc область иммуноглобулина гамма-1 представляет собой Fc с удаленной C_{H2} , который содержит часть шарнирной области и C_{H3} область, но не C_{H2} область. Fc с удаленной C_{H2} описана Gillies et al., Hum. Antibody. Hybridomas, 1:47 (1990). В некоторых вариантах осуществления используют Fc область одного из IgA, IgD, IgE или IgM.

LINGO-2-Fc слитые белки можно создавать в виде нескольких различных конфигураций. В одной конфигурации C-конец растворимого полипептида LINGO-2 сливают непосредственно с N-концом Fc шарнирного полипептида. В слегка отличной конфигурации короткий полипептид, например, из 2-10 аминокислот, включают в сливание между N-концом растворимого полипептида LINGO-2 и C-концом Fc полипептида. Данный линкер обеспечивает конформационную гибкость, которая может увеличивать биологическую активность в некоторых обстоятельствах. Если достаточная часть шарнирной области сохраняется в Fc полипептиде, LINGO-2-Fc сливание будет димеризоваться, образуя, таким образом, двухвалентную молекулу. Гомогенная популяция мономерных Fc сливий будет давать моноспецифические двухвалентные димеры. Смесь двух мономерных Fc сливий, каждое из которых обладает отличной специфичностью, будет давать биспецифические двухвалентные димеры.

Полипептиды LINGO-2 и анти-LINGO-2 антитела можно дополнительно рекомбинантно сливать с гетерологичным полипептидом на N- или C-конце. Например, антагонистические полипептиды LINGO-2 или антитела можно рекомбинантно сливать или конъюгировать с молекулами, пригодными в качестве меток в анализах на обнаружение, и эффекторными молекулами, такими как гетерологичные полипептиды, лекарственные средства, радионуклиды или токсины. См., например, PCT публикации WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; патент США № 5314995 и EP 396387.

Настоящее изобретение также относится к слитым белкам, включающим, состоящим по существу из или состоящим из сливания антагонистического полипептида LINGO-2 или антитела, которое ингибирует функционирование LINGO-2. В определенных вариантах осуществления гетерологичный полипептид, с которым сливают антагонистический полипептид LINGO-2 или антитело, является пригодным для функционирования или является пригодным для доставки антагонистического полипептида LINGO-2 или антитела. В определенных вариантах осуществления растворимый антагонистический полипептид LINGO-2, например, полипептид LINGO-2, содержащий LRR домены, Ig домен или полный внеклеточный домен (соответствующий аминокислотам 28-545 SEQ ID NO: 2), или любой другой полипептидный LINGO-2 фрагмент, вариант или производное, описанные в настоящем документе, слит с гетерологичным полипептидом с образованием антагонистического LINGO-2 слитого полипептида. Сигнальная последовательность представляет собой полинуклеотид, который кодирует аминокислотную последовательность, которая вызывает транспорт белка через мембрану эндоплазматического ретикулума. Сигнальные последовательности, пригодные для создания иммunoслияния, включают сигнальные последовательности легкой цепи антитела, например антитела 14.18 (Gillies et al., J. Immunol. Meth. 125:191-202 (1989)), сигнальные последовательности тяжелой цепи антитела, например, сигнальную последовательность тяжелой цепи антитела MOPC141 (Sakano et al., Nature 286:5774 (1980)). Альтернативно, можно использовать другие сигнальные последовательности. См., например, Watson, Nucl. Acids Res. 12:5145 (1984). Сигнальный пептид обычно отщепляется в полости эндоплазматического ретикулума сигнальными пептидазами. Это приводит в результате к секреции иммunoслитого белка, содержащего Fc область и растворимый полипептид LINGO-2.

В некоторых вариантах осуществления ДНК последовательность кодирует сайт протеолитического расщепления между слитым белком и полипептидом LINGO-2. Сайт расщепления обеспечивает протеолитическое отщепление кодируемого слитого белка, с отделением, таким образом, слитого домена (например, Fc домена) от белка-мишени.

Антагонистические полипептиды LINGO-2 и антитела включают производные, которые модифицированы, т.е. ковалентно соединены с любым типом молекул таким образом, чтобы ковалентное соединение не препятствовало ингибированию антагонистическим полипептидом LINGO-2 или антителом биологической функции LINGO-2. Например, но не в качестве ограничения, антагонистические полипептиды LINGO-2 и антитела можно модифицировать, например, гликозилированием, ацетилированием, пегилированием, фосфорилированием, амидированием, дериватизацией известными защитными/блокирующими группами, протеолитическим расщеплением, соединением с клеточным лигандом или другим белком и т.д. Любую из многочисленных химических модификаций можно осуществлять известными способами, включая, но не ограничиваясь ими, специфическое химическое расщепление, ацетили-

рование, формилирование, метаболический синтез туникамицина и т.д. Кроме того, производное может содержать одну или более неклассических аминокислот.

Некоторые варианты осуществления включают растворимый полипептид LINGO-2 или антитело LINGO-2, где один или более полимеров конъюгируют (ковалентно соединяют) с полипептидом LINGO-2 или антителом. Примеры полимеров, пригодных для данного конъюгирования, включают полипептиды (обсуждаемые выше), сахарные полимеры и полиалкиленгликольные цепи. Обычно, но не обязательно, полимер конъюгирован с растворимым полипептидом LINGO-2 или антителом LINGO-2 с целью увеличения одного или более следующих свойств: растворимости, стабильности или биодоступности.

Класс полимера, обычно используемого для конъюгирования антагонистического полипептида LINGO-2 или антитела, представляет собой полиалкиленгликоль. Полиэтиленгликоль (ПЭГ) используют наиболее часто. ПЭГ молекулы, например, 1, 2, 3, 4 или 5 ПЭГ полимеров, можно конъюгировать с каждым антагонистическим полипептидом LINGO-2 или антителом, увеличивая время полужизни в сыворотке, по сравнению с антагонистическим полипептидом LINGO-2 или антителом в отдельности. ПЭГ молекулы не являются антигенными и, по существу, биологически инертны. ПЭГ молекулы могут быть разветвленными или неразветвленными.

Количество молекул ПЭГ, соединенных с антагонистическим полипептидом LINGO-2 или антителом, и молекулярная масса отдельных ПЭГ цепей может изменяться. Как правило, чем больше молекулярная масса полимера, тем меньше полимерных цепей, присоединенных к полипептиду. Обычно суммарная масса полимера, присоединенного к антагонистическому полипептиду LINGO-2 или антителу, составляет от 20 до 40 кДа. Таким образом, если присоединена одна полимерная цепь, то молекулярная масса цепи обычно составляет 20-40 кДа. Если присоединены две цепи, то молекулярная масса каждой цепи обычно составляет 10-20 кДа. Если присоединены три цепи, то молекулярная масса обычно составляет 7-14 кДа.

Полимер, например ПЭГ, может быть соединен с антагонистическим полипептидом LINGO-2 или антителом через любую подходящую, доступную реакционноспособную группу в полипептиде. Доступная реакционная группа(ы) может(гут) представлять собой, например, N-концевую аминогруппу или эпсилон-аминогруппу внешнего лизинового остатка, или обе. Активированный полимер может реагировать и ковалентно связываться по любой свободной аминогруппе в антагонистическом полипептиде LINGO-2 или антителе. Свободные карбоксильные группы, подходящим образом активированные карбонильные группы, гидроксильные, гуанидильные, имидазольные, окисленные углеводные группы и меркаптогруппы антагонистического полипептида LINGO-2 или антитела (если присутствуют) также можно использовать в качестве реакционноспособных групп для присоединения полимера.

В реакции конъюгирования обычно используют приблизительно от 1,0 до приблизительно 10 моль активированного полимера на моль полипептида, в зависимости от концентрации полипептида. Обычно выбранное соотношение представляет собой баланс между доведением до максимума основной реакции, при этом сводя до минимума побочные реакции (часто неспецифические), которые могут нарушать требуемую фармакологическую активность антагонистического полипептида LINGO-2 или антитела. В определенных вариантах осуществления сохраняется по меньшей мере 50% биологической активности (как показано, например, в любом из анализов, описанных в настоящем документе или известных в данной области техники) антагонистического полипептида LINGO-2 или антитела. В следующих вариантах осуществления сохраняется практически 100%.

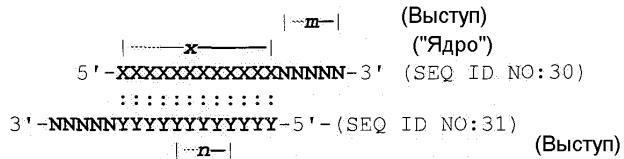
VII. LINGO-2 полинуклеотидные антагонисты.

Полинуклеотиды можно также использовать, вызывая антагонизм LINGO-2 функции. Следовательно, LINGO-2 полинуклеотидные антагонисты могут способствовать выживаемости двигательных нейронов и/или способствовать росту аксонов двигательных нейронов. Конкретные варианты осуществления включают способ лечения расстройства, связанного с двигательными нейронами, включающий введение эффективного количества LINGO-2 полинуклеотидного антагониста, где полинуклеотидный антагонист содержит молекулу нукleinовой кислоты, которая может специфически связываться с полинуклеотидом, который кодирует LINGO-2. LINGO-2 полинуклеотидный антагонист может препятствовать экспрессии LINGO-2 (нокдаун). В определенных вариантах осуществления LINGO-2 полинуклеотидный антагонист способствует выживаемости двигательных нейронов и/или росту аксонов двигательных нейронов, например, у млекопитающего. LINGO-2 полинуклеотидные антагонисты включают, но не ограничиваясь ими, антисмыловые молекулы, рибозимы, миРНК, кшРНК и РНКи. Обычно данные связывающие молекулы вводят отдельно животному (см., например, O' Connor, J. Neurochem. 56:560 (1991)), но данные связывающие молекулы можно также экспрессировать *in vivo* из полинуклеотидов, поглощенных клеткой-хозяином, и экспрессировать *in vivo*. См. также Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988).

Молекулы, которые опосредуют РНКи, включая, но без ограничения, миРНК, можно получить *in vitro* химическим синтезом (Hojo, FEBS Lett., 521:195-199, 2002), гидролизом дсРНК (Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:9942-9947, 2002), *in vitro* транскрипцией T7 РНК полимеразой (Donzeet et al., Nucleic Acids Res 30:e46, 2002; Yu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:6047-6052, 2002) и гидролизом двухцепочечной РНК, используя нуклеазу, такую как РНКаза III E.coli (Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci.

USA, 99:9942-9947, 2002).

Молекулы миРНК можно также получить отжигом двух олигонуклеотидов друг с другом, обычно имеющих следующие общие структуры, которые содержат как двухцепочечные, так и одноцепочечные части:



где N, X и Y представляют собой нуклеотиды;

X водородные связи с Y;

"." показывает водородную связь между двумя основаниями; x представляет собой натуральное целое число, имеющее значение от 1 до приблизительно 100;

m и n представляют собой целые числа, имеющие, независимо, значения от 0 до приблизительно 100.

В некоторых вариантах осуществления N, X и Y независимо представляют собой A, G, C и T или U. Могут присутствовать неприродные основания и нуклеотиды, особенно в случае синтетических миРНК (например, продукта отжига двух олигонуклеотидов). Двухцепочечную центральную часть называют "ядром", и она имеет пары оснований (п.о.) в качестве единиц измерения; одноцепочечные части представляют собой выступы, содержащие нуклеотиды (nt) в качестве единиц измерения. Показанные выступы представляют собой 3'-выступы, но также предполагаются молекулы с 5'-выступами. Также предполагаются молекулы миРНК без выступов (т.е. m=0 и n=0), и молекулы, содержащие выступ с одной стороны ядра, но без выступа с другой стороны (например, m=0 и n>1, или наоборот).

Paddison et al. (Genes & Dev. 16:948-958, 2002) использовали молекулы малых РНК, свернутые в шпильки, в качестве средства для осуществления РНКи. Соответственно, данные молекулы коротких шпилечных РНК (кшРНК) также предпочтительно использовать в способах, относящихся к настоящему изобретению. Длина стебля и петли функциональных кшРНК изменяется; длины стебля могут изменяться в диапазоне приблизительно от 25 до приблизительно 30 nt, и длина петли может изменяться в диапазоне приблизительно от 4 до приблизительно 25 nt без влияния на активность "сайленсинга". Не желая быть связанными любой конкретной теорией, считают, что данные молекулы кшРНК похожи на продукты дцРНК РНКазы DICER и, в любом случае, они обладают аналогичной способностью ингибиовать экспрессию конкретного гена.

В некоторых вариантах осуществления кшРНК экспрессируется из лентивирусного вектора (например, pLL3.7).

Антисенс подход можно применять для контроля генной экспрессии с помощью антисмысловых ДНК или РНК, или посредством образования тройной спирали. Антисенс способы обсуждены, например, в Okano, J. Neurochem. 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988). Образование тройной спирали обсуждается, например, в Lee et al., Nucleic Acids Research, 6:3073 (1979); Cooney et al., Science, 241:456 (1988) и Dervan et al., Science 251:1300 (1991). Способы основаны на связывании полинуклеотида с комплементарной ДНК или РНК.

Например, 5'-кодирующую часть полинуклеотида, которая кодирует LINGO-2, можно использовать для конструирования антисмыслового РНК олигонуклеотида приблизительно от 10 до 40 пар оснований в длину. ДНК олигонуклеотид конструируют так, чтобы он был комплементарным области гена, участвующего в транскрипции, посредством этого препятствуя транскрипции и получению целевого белка. Антисенс РНК олигонуклеотид гибридизуется с мРНК in vivo и блокирует трансляцию молекулы мРНК в полипептид-мишень.

Абсолютная комплементарность антисмысловой молекулы не требуется. Последовательность, комплементарная по меньшей мере части РНК, кодирующей LINGO-2, обозначает последовательность, обладающую достаточной комплементарностью, чтобы быть способной гибридизоваться с РНК с образованием стабильного дуплекса или триплекса. Способность гибридизоваться будет зависеть как от степени комплементарности, так и от длины антисмысловой нуклеиновой кислоты. Обычно, чем длиннее гибридизующаяся нуклеиновая кислота, тем больше ошибочных спариваний оснований она может содержать, и все же образовывать стабильный дуплекс (или триплекс, в зависимости от ситуации). Специалист в данной области техники может определить допустимую степень ошибочных спариваний, применяя стандартные способы определения температуры плавления гибридизованного комплекса.

Олигонуклеотиды, которые являются комплементарными 5'-концу матричной РНК, например, 5'-нетранслируемой последовательности вплоть до и, включая, инициирующий кодон AUG, должны работать наиболее эффективно при ингибировании трансляции. Однако показано, что последовательности, комплементарные 3'-нетранслируемой последовательности мРНК, также являются эффективными при ингибировании трансляции мРНК. В общем, см. Wagner, R., Nature, 372:333-335 (1994). Таким образом, олигонуклеотиды, комплементарные или 5'- или 3'-нетранслируемым некодирующими областям, можно

использовать в антисенс подходе для ингибиования трансляции LINGO-2. Олигонуклеотиды, комплементарные 5'-нетранслируемой области мРНК, должны содержать дополнение стартового кодона AUG. Антисмыловые олигонуклеотиды, комплементарные кодирующим областям мРНК, представляют собой менее эффективные ингибиторы трансляции, но их можно использовать. Антисмыловые нуклеиновые кислоты обычно имеют длину по меньшей мере шесть нуклеотидов, например, длину приблизительно от 6 до приблизительно 50 нуклеотидов. В конкретных аспектах олигонуклеотид содержит по меньшей мере 10 нуклеотидов, по меньшей мере 17 нуклеотидов, по меньшей мере 25 нуклеотидов или по меньшей мере 50 нуклеотидов.

Полинуклеотиды для применения в терапевтических способах, описанных в настоящем документе, могут представлять собой ДНК или РНК или химерные смеси или производные или их модифицированные варианты, одноцепочечные или двухцепочечные. Олигонуклеотид можно модифицировать по основанию, сахарному остатку или фосфатному оству, например, увеличивая стабильность молекулы, гибридизацию и т.д. Олигонуклеотид может содержать другие присоединенные группы, такие как пептиды (например, для направленного взаимодействия с рецепторами клетки-хозяина *in vivo*) или агенты, облегчающие транспорт через клеточную мембрану (см., например, Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:6553-6556 (1989); Lemaitre et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 84:648-652 (1987); РСТ публикацию WO 88/09810, опубликованную 15 декабря 1988 г.) или гематоэнцефалический барьер (см., например, РСТ публикацию WO 89/10134, опубликованную 25 апреля 1988 г.), расщепляющие агенты, инициирующие гибридизацию (см., например, Krol et al., BioTechniques 6:958-976 (1988)), или интеркалирующие агенты (см., например, Zon, Pharm. Res. 5:539-549(1988)). В этой связи олигонуклеотид можно конъюгировать с другой молекулой, например, пептидом, кросс-сшивающим агентом, инициирующим гибридизацию, транспортным агентом, расщепляющим агентом, инициирующим гибридизацию, и т.д.

Полинуклеотидные композиции дополнительно содержат каталитическую РНК или рибозим (см., например, РСТ международную публикацию WO 90/11364, опубликованную 4 октября 1990 г.; Sarver et al., Science, 247:1222-1225 (1990)). Рибозимы типа "головка молотка" расщепляют мРНК в положениях, определяющихся фланкирующими областями, которые образуют комплементарное спаривание оснований с мРНК-мишени.

Единственное требование заключается в том, чтобы мРНК-мишень имела следующую последовательность двух оснований: 5'-UG-3'. Конструирование и получение рибозимов типа "головка молотка" хорошо известны в данной области техники и описаны более полно в Haseloff and Gerlach, Nature, 334:585-591 (1988). В определенных вариантах осуществления рибозим получают рекомбинантно так, чтобы участок распознавания для расщепления находился вблизи 5'-конца целевой мРНК; т.е., увеличивая эффективность и снижая до минимума внутриклеточное накопление нефункциональных транскриптов мРНК.

Как в антисенс подходе, рибозимы могут состоять из модифицированных олигонуклеотидов (например, для увеличения стабильности, направленного взаимодействия и т.д.), и их можно доставлять в клетки, которые экспрессируют LINGO-2 *in vivo*. ДНК конструкты, кодирующие рибозим, можно вводить в клетку аналогичным способом, как описано выше для введения антисмыловой кодирующей ДНК. Один способ доставки включает, применяя ДНК конструкт, "кодирующий" рибозим под контролем сильного конститутивного или индуцибельного промотора, такого как, например, pol III или pol II промотор, так что трансфицированные клетки будут продуцировать значительные количества рибозима для разрушения эндогенных LINGO-2 транскриптов и ингибировать трансляцию. Поскольку рибозимы отличаются от антисенс молекул, для эффективности требуются меньшие внутриклеточные концентрации.

VIII. Аптамерные антагонисты LINGO-2.

В другом варианте осуществления антагонист LINGO-2 представляет собой аптамер. Аптамер может представлять собой полинуклеотид или полипептид, который имеет уникальную последовательность, обладает свойством специфически связываться с требуемой мишенью (например, полипептидом) и представляет собой специфический лиганд указанной мишени. Нуклеотидные аптамеры включают двухцепочечные ДНК и одноцепочечные РНК молекулы, которые связываются с LINGO-2. В определенных вариантах осуществления аптамерный антагонист LINGO-2 способствует выживаемости двигательных нейронов и/или росту аксонов двигательных нейронов, например, у млекопитающего.

Аптамеры на основе нуклеиновых кислот выбирают, применяя способы, известные в данной области техники, например способом систематической эволюции лигандов экспоненциальным обогащением (SELEX). SELEX представляет собой способ оценки *in vitro* эволюции молекул нуклеиновых кислот с очень специфическим связыванием с молекулами-мишениями, как описано, например, в патентах США № 5475096, 5580737, 5567588, 5707796, 5763177, 6011577 и 6699843, включенных в настояще описание посредством ссылки во всей своей полноте. Другой способ скринирования для обнаружения аптамеров описан в патенте США № 5270163 (также включенном в настоящее описание посредством ссылки). Способ SELEX основан на способности нуклеиновых кислот образовывать ряд двух- и трехмерных структур, а также химической изменчивости, доступной в нуклеотидных мономерах, действующих в качестве лигандов (образующих специфически связывающиеся пары) с практически любым химическим соединением, мономерным или полимерным, включая другие молекулы нуклеиновых ки-

слот и полипептиды. Молекулы любого размера или композиция могут служить в качестве мишней.

Применяя белковую структуру LINGO-2, скрининг аптамеров, которые воздействуют на LINGO-2, применяя способ SELEX, можно обеспечить обнаружение аптамеров, которые ингибируют процессы, опосредованные LINGO-2.

Полипептидные аптамеры представляют собой случайные пептиды, выбранные на основе их способности связываться с и, посредством этого, блокировать действие LINGO-2. Полипептидные аптамеры могут содержать короткие вариабельные пептидные домены, присоединенные к обоим концам белкового каркаса. Данное двойное структурное ограничение значительно увеличивает аффинность связывания пептидного аптамера до степени, сравнимой со аффинностью связывания антитела (наномолярный диапазон). См., например, Hoppe-Seyler F et al. (2000), J. Mol. Med. 78(8):426-430. Длина короткого вариабельного пептида обычно составляет приблизительно 10-20 аминокислот, и остав может представлять собой любой белок, который обладает хорошей растворимостью и свойствами совместимости. Один неограничивающий пример белка остава представляет собой бактериальный белок Thioredoxin-A. См., например, Cohen BA et al. (1998), PNAS, 95(24):4272-14277.

Полипептидные аптамеры представляют собой пептиды или небольшие полипептиды, которые действуют как основные ингибиторы белковой функции. Пептидные аптамеры специфически связываются с белками-мишнями, блокируя их функциональные свойства (Kolonin et al. (1998), Proc. Natl. Acad. Sci. 95:14266-14271). Пептидные аптамеры, которые связываются с высокой аффинностью и специфичностью с белком-мишенью, можно выделить рядом способов, известных в данной области техники. Пептидные аптамеры можно выделить из библиотек случайных пептидов дрожжевым двухгибридным скринингом (Xu, C.W., et al. (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. 94: 12473-12478) или рибосомным дисплеем (Hanes et al. (1997), Proc. Natl. Acad. Sci. 94:4937-4942). Их также можно выделить из фаговых библиотек (Hoogenboom, H.R., et al. (1998), Immunotechnology, 4:1-20) или библиотек химически синтезированных пептидов. Кроме того, полипептидные аптамеры можно выделить, применяя отбор регулируемых лигандом пептидных аптамеров (LiRPA). См., например, Binkowski B.F. et al. (2005), Chem. & Biol. 12(7):847-855, включенную в настоящее описание посредством ссылки. Хотя сложные способы, которыми получают пептидные аптамеры, делает их применение более сложным, чем полинуклеотидные аптамеры, поскольку в них используют только четыре нуклеотидных основания, тогда как пептидные аптамеры будут иметь более расширенный репертуар (т.е. 20 аминокислот).

Пептидные аптамеры можно модифицировать (например, конъюгировать с полимерами или сливать с белками), как описано для других полипептидов в другом месте настоящего описания.

IX. Векторы и клетки-хозяева.

Экспрессионные системы представляют собой средство, которым можно получить и затем очистить представляющие интерес кодирующие последовательности, а также представляют собой клетки, которые могут, при трансформации или трансфекции подходящими нуклеотидными кодирующими последовательностями, экспрессировать антагонистический полипептид LINGO-2 или антитело *in situ*. Они включают, но не ограничиваясь ими, микроорганизмы, такие как бактерии (например, *E.coli*, *B.subtilis*), трансформированные экспрессирующими векторами с рекомбинантными бактериофаговыми ДНК, плазмидными ДНК или космидными ДНК, содержащими кодирующие последовательности антител; дрожжи (например, *Saccharomyces*, *Pichia*), трансформированные рекомбинантными дрожжевыми экспрессирующими векторами, содержащими кодирующие последовательности антител; клеточные системы насекомых, инфицированные рекомбинантными вирусными экспрессирующими векторами (например, бакуловирусом); клеточные системы растений, инфицированные рекомбинантными вирусными экспрессирующими векторами (например, вирусом мозаики цветной капусты, *CaMV*; вирусом табачной мозаики, *TMV*) или трансформированные рекомбинантными плазмидными экспрессирующими векторами (например, *Ti* плазмидой), содержащими кодирующие последовательности антител; или клеточные системы млекопитающих (например, COS, CHO, BLK, 293, 3T3 клетки), содержащие рекомбинантные экспрессирующие конструкты, содержащие промоторы, полученные из генома клеток млекопитающих (например, металлотионеиновый промотор) или из вирусов млекопитающих (например, поздний промотор аденоовируса; 7,5K промотор вируса осповакцины). Бактериальные клетки, такие как *Escherichia coli*, или эукариотические клетки, например, для экспрессии рекомбинантных молекул полных антител, используют для экспрессии рекомбинантных молекул антител. Например, клетки млекопитающих, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO), в сочетании с вектором, таким как промоторный элемент основного промежуточного раннего гена из цитомегаловируса человека, представляют собой эффективную экспрессирующую систему для антител (Foecking et al., Gene, 45:101 (1986); Cockett et al., Bio/Technology 8:2 (1990)).

Можно использовать векторы, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие антагонисты LINGO-2, например растворимые полипептиды LINGO-2, LINGO-2 антитела, антагонистические LINGO-2 полинуклеотиды или LINGO-2 аптамеры, с получением антагонистов. Выбор вектора и последовательностей, контролирующих экспрессию, с которыми данные нуклеиновые кислоты функционально соединены, зависит от требуемых функциональных свойств, например белковой экспрессии и клетки-

хозяина, которую будут трансформировать.

Элементы, контролирующие экспрессию, пригодные для регулирования экспрессии функционально присоединенной кодирующей последовательности, известны в данной области техники. Примеры включают, но не ограничиваясь ими, индуцибельные промоторы, конститтивные промоторы, сигналы секреции и другие регуляторные элементы. При использовании индуцибельного промотора, его можно контролировать, например, изменением питательного режима или изменением температуры, в среде с клеткой-хозяином.

В одном из вариантов осуществления можно использовать патентованный экспрессирующий вектор Biogen IDEC, Inc., называемый NEOSPLA (патент США № 6159730). Данный вектор содержит промотор/энхансер цитомегаловируса, основной промотор мышиного бета-глобина, SV40 точку начала репликации, последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста, экзон 1 и экзон 2 неомецин-фосфотрансферазы, ген дигидрофолатредуктазы и лидерную последовательность. Обнаружено, что данный вектор приводит в результате к интенсивной экспрессии при трансфекции в СНО клетки, с последующей селекцией в среде, содержащей G418, и амплификацией в присутствии метатрексата. Конечно, можно использовать любой экспрессирующий вектор, который способен вызывать экспрессию в клетках. Примеры подходящих векторов включают, но не ограничиваются ими, плазмиды pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1 и pZeoSV2 (доступные от Invitrogen, San Diego, CA) и плазмидный pCI (доступные от Promega, Madison, WI). Дополнительные клеточные экспрессирующие векторы известны в данной области техники и являются коммерчески доступными. Обычно данные векторы содержат удобные сайты рестрикции для вставки требуемого сегмента ДНК. Примеры векторов включают pSVL и pKSV-10 (Pharmacia), pBPV-1, pml2d (International Biotechnologies), pTDT1 (ATCC 31255), ретровирусный экспрессирующий вектор pMIG и pLL3.7, адено-вирусный бифункциональный вектор pDC315, AAV векторы, pUC8, pUC9, pBR322 и pBR329 (BioRad), pPL и pKK223 (Pharmacia). Другие примеры векторных систем описаны, например, в патенте США № 6413777.

X. Генная терапия.

Антагонист LINGO-2 можно получить *in vivo* в млекопитающем, например пациенте, являющемся человеком, применяя генно-терапевтический подход для лечения заболевания, расстройства или повреждения нервной системы, при которых стимулирование выживаемости двигательных нейронов и/или роста аксонов двигательных нейронов могут быть терапевтически полезными. Оно включает введение подходящей нуклеиновой кислоты, кодирующей антагонист LINGO-2, функционально связанной с подходящими последовательностями, контролирующими экспрессию. Обычно данные последовательности вводят в вирусном векторе. Подходящие вирусные векторы для данной генной терапии включают адено-вирусный вектор, альфавирусный вектор, энтеровирусный вектор, пестивирусный вектор, лентивирусный вектор, бакуловирусный вектор, герпесвирусный вектор, вектор на основе вируса Эпштейна-Барра, паповавирусный вектор, поксивирусный вектор, вектор на основе вируса осповакцины, вектор на основе аденоассоциированного вируса и вектор на основе простого вируса герпеса. Вирусный вектор может представлять собой вирусный вектор с нарушенной репликацией. Обычно используют адено-вирусные векторы, которые содержат делецию в их E1 гене или E3 гене. При использовании адено-вирусного вектора вектор обычно не содержит гена селектируемого маркера.

XI. Фармацевтические композиции.

Антагонисты LINGO-2 можно формулировать в виде фармацевтических композиций для введения млекопитающим, включая людей. Фармацевтические композиции содержат фармацевтически приемлемые носители, включая, например, ионообменные вещества, оксид алюминия, стеарат алюминия, лецитин, сывороточные белки, такие как сывороточный альбумин человека, буферные вещества, такие как фосфаты, глицин, сорбиновую кислоту, сорбат калия, частичные глицеридные смеси насыщенных растительных жирных кислот, воду, соли или электролиты, такие как протаминсульфат, гидрофосфат динатрия, гидрофосфат калия, хлорид натрия, соли цинка, коллоидный диоксид кремния, триисиликат магния, поливинилпирролидон, вещества на основе целлюлозы, полиэтиленгликоль, натрийкарбоксиметилцеллюлозу, полиакрилаты, воски, полиэтиленполиоксипропиленовые блок-полимеры, полиэтиленгликоль и ланолин.

Композиции можно вводить любым подходящим способом, например парентерально, интравентрикулярно, перорально, путем ингаляции, местно, ректально, назально, буккально, вагинально или через имплантированный резервуар. Термин "парентеральный", как применяют в настоящем описании, включает подкожное, внутривенное, внутримышечное, внутрисуставное, внутрисиновиальное, интрастернальное, интратекальное, внутрипеченочное, внутриочаговое и внутричерепное введение или способы вливания. Как описано выше, антагонисты LINGO-2, используемые в способах по настоящему изобретению, действуют в нервной системе, способствуя выживаемости двигательных нейронов и/или росту аксонов двигательных нейронов. Соответственно, в определенных способах антагонисты LINGO-2 вводят таким путем, что они проходят через гематоэнцефалический барьер. Данное прохождение может быть результатом физико-химических свойств, присущих самой молекуле антагониста LINGO-2, другим компонентам в фармацевтическом составе или результатом использования механического устройства, такого

как игла, канюля или хирургические инструменты для прохождения гематоэнцефалического барьера. Когда антагонист LINGO-2 представляет собой молекулу, которая сама по себе не проходит через гематоэнцефалический барьер, например, слияние с полипептидом, который облегчает прохождение, подходящие пути введения представляют собой, например, интракраниальный или внутричерепной. Когда антагонист LINGO-2 представляет собой молекулу, которая сама по себе проходит через гематоэнцефалический барьер, путь введения может представлять собой один или более различных путей, описанных ниже.

Стерильные инъецируемые формы композиций, применяемые в способах по настоящему изобретению, могут представлять собой водную или масляную супензию. Данные супензии можно формулировать согласно способам, известным в данной области техники, применяя подходящие диспергаторы или смачивающие и супендирующие агенты. Стерильный инъецируемый препарат может также представлять собой стерильный инъецируемый раствор или супензию в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе, например в виде супензии в 1,3-бутандиоле. Среди используемых сред и растворителей, которые можно применять, есть вода, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, стерильные жирные масла традиционно применяют в качестве растворителя или супендирующей среды. По этой причине можно использовать любое безвкусное жирное масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Жирные кислоты, такие как олеиновая кислота и ее глицеридные производные, являются пригодными в получении инъецируемых препаратов, как и являются пригодными природные фармацевтически приемлемые масла, такие как оливковое масло или касторовое масло, особенно в их полиоксиэтилированных вариантах. Данные масляные растворы или супензии могут также содержать разбавитель на основе длинноцепочечного спирта или диспергатор, такой как карбоксиметилцеллюлоза, или аналогичные диспергаторы, которые обычно применяют при получении фармацевтически приемлемых лекарственных форм, включая эмульсии и супензии. Другие обычно используемые поверхностно-активные вещества, такие как Tweens, Spans, и другие эмульгаторы или усилители биодоступности, которые обычно используют в получении фармацевтически приемлемых твердых, жидких или других лекарственных форм, можно также использовать для целей формулирования.

Парентеральные составы могут представлять собой единичную болюсную дозу, инфузионный раствор или загрузочную болюсную дозу, с последующей поддерживающей дозой. Данные композиции можно вводить через конкретные фиксированные или изменяющиеся интервалы, например один раз в день или по мере необходимости.

Определенные фармацевтические композиции можно вводить перорально в виде подходящей дозированной формы, включая, например, капсулы, таблетки, водные супензии или растворы. Определенные фармацевтические композиции также можно вводить назальным аэрозолем или ингаляцией. Данные композиции можно получить в виде растворов в солевом растворе, используя бензиловый спирт или другие подходящие консерванты, агенты, улучшающие поглощение, увеличивающие биодоступность, и/или другие общепринятые агенты, увеличивающие растворимость, или диспергаторы.

Количество антагониста LINGO-2, которое можно комбинировать с материалами носителя, получая единичную дозированную форму, будет изменяться в зависимости от субъекта, подвергаемого лечению, типа применяемого антагониста и конкретного пути введения. Композицию можно вводить в виде единичной дозы, множества доз или в течение установленного периода времени в виде инфузионного раствора. Режимы дозирования также можно регулировать, обеспечивая оптимальный требуемый ответ (например, терапевтический или профилактический ответ).

В способах по настоящему изобретению применяют "терапевтически эффективное количество" или "профилактически эффективное количество" антагониста LINGO-2. Такое терапевтически или профилактически эффективное количество может изменяться в зависимости от факторов, таких как стадия заболевания, возраст, пол и масса индивида. Терапевтически или профилактически эффективное количество также представляет собой количество, при котором любые токсические или вредные эффекты перевешиваются терапевтически полезными эффектами.

Конкретный режим дозирования и лечения для любого конкретного пациента будет зависеть от ряда факторов, включая конкретный применяемый антагонист LINGO-2, возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол и рацион пациента, и время введения, скорость выведения, комбинацию лекарственных средств и тяжесть конкретного заболевания, которое подвергают лечению. Оценка данных факторов лицами, осуществляющими уход, находится в пределах компетентности специалиста в данной области техники. Количество будет также зависеть от конкретного пациента, которого подвергают лечению, пути введения, типа состава, характеристик применяемого соединения, тяжести заболевания и требуемого эффекта. Применяемое количество можно определить фармакологическими и фармакокинетическими принципами, хорошо известными в данной области техники.

Антагонисты LINGO-2 можно вводить непосредственно в нервную систему, интракраниально или интракраниально, или можно вводить системно. Композиции для введения можно формулировать таким образом, чтобы вводить дозу 0,001-10 мг/кг массы тела в день антагониста LINGO-2. В некоторых вариантах осуществления доза составляет 0,01-1,0 мг/кг массы тела в день. В некоторых вариантах осуществления доза составляет 0,001-0,5 мг/кг массы тела в день.

Для лечения антагонистическим антителом LINGO-2 доза может находиться в диапазоне, например, приблизительно от 0,0001 до 100 мг/кг и обычно 0,01-5 мг/кг (например, 0,02, 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2 мг/кг и т.д.) массы тела реципиента. Например, дозы могут составлять 1 или 10 мг/кг массы тела или в диапазоне 1-10 мг/кг, например по меньшей мере 1 мг/кг. Промежуточные дозы в данных диапазонах являются также пригодными. Субъектам можно вводить такие дозы ежедневно, раз в два дня, раз в неделю или согласно любому другому графику, определенному эмпирическим анализом. Иллюстративное лечение включает введение множества доз в течение длительного периода, например по меньшей мере шести месяцев. Дополнительные иллюстративные режимы лечения включают введение один раз в две недели, или один раз в месяц, или один раз каждые 3-6 месяцев. Примерные графики дозирования включают 1-10 или 15 мг/кг в последующие дни, 30 мг/кг в каждый второй день или 60 мг/кг раз в неделю. В некоторых способах два или более моноклональных антитела с различными специфичностями связывания вводят одновременно, в данном случае доза каждого вводимого антитела попадает в указанные диапазоны.

В определенных вариантах осуществления субъекта можно лечить молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей полинуклеотид антагониста LINGO-2. Дозы для нуклеиновых кислот находятся в диапазоне приблизительно от 10 нг до 1 г, 100 нг-100 мг, 1 мкг-10 мг или 30-300 мкг ДНК для одного пациента. Дозы для инфекционных вирусных векторов изменяются в диапазоне 10-100 или более вирионов на дозу.

Дополнительные активные соединения также можно вводить в композиции. Например, растворимый полипептид LINGO-2 или слитый белок можно совместно формулировать с и/или совместно вводить с одним или более дополнительными терапевтическими агентами.

Можно применять любой подходящий способ доставки антагониста LINGO-2 в выбранную ткань-мишень, включая болюсную инъекцию водного раствора или имплантацию системы с контролируемым высвобождением. Применение имплантата с контролируемым высвобождением уменьшает необходимость в повторных инъекциях.

Антагонисты LINGO-2, применяемые в способах настоящего изобретения, можно непосредственно вливать в мозг. Различные имплантаты для прямого вливания в мозг соединений известны и являются эффективными для доставки терапевтических соединений пациентам, являющимся людьми, страдающим нейрологическим расстройством. Они включают непрерывное вливание в мозг, используя стереотаксические имплантируемый насос, временные интерстициальные катетеры, постоянные интракраниальные зондовые имплантаты и хирургически имплантируемые биоразлагаемые имплантаты. См., например, Gill et al., выше; Scharfen et al., "High Activity Iodine-125 Interstitial Implant For Gliomas," Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 24(4):583-591 (1992); Gaspar et al., "Permanent 125I Implants for Recurrent Malignant Gliomas," Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 43(5):977-982 (1999); глава 66, с. 577-580, Bellezza et al., "Stereotactic Interstitial Brachytherapy," in Gildenberg et al., Textbook of Stereotactic and Functional Neurosurgery, McGraw-Hill (1998) и Brem et al., "The Safety of Interstitial Chemotherapy with BCNU-Loaded Polymer Followed by Radiation Therapy in the Treatment of Newly Diagnosed Malignant Gliomas: Phase I Trial," J. Neuro-Oncology, 26:111-23 (1995).

Композиции могут также содержать антагонист LINGO-2, диспергированный в материале биосовместимого носителя, который служит в качестве подходящей системы доставки или системы закрепления для соединений. Подходящие примеры носителей с замедленным высвобождением включают полу-проницаемые полимерные матрицы в виде формованных изделий, таких как суппозитории или капсулы. Имплантируемые или микрокапсульные матрицы с замедленным высвобождением включают полилактиды (патент США № 3773319; EP 58481), сополимеры L-глютаминовой кислоты и гамма-этил-L-глютамата (Sidman et al., Biopolymers, 22:547-56 (1985)); поли(2-гидроксиэтилметакрилат), этиленвинил-ацетат (Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277 (1981); Langer, Chem. Tech. 12:98-105 (1982)) или поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту (EP 133988).

В некоторых вариантах осуществления антагонист LINGO-2 вводят пациенту прямым вливанием в подходящую область мозга. См., например, Gill et al., "Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease", Nature Med. 9:589-95 (2003). Имеются альтернативные способы, и их можно применять для введения антагониста LINGO-2. Например, можно осуществлять стереотаксическое помещение катетера или имплантата, используя аппарат Рихерта-Мундингера и ZD (Заморано-Духовного) многофункциональный локализатор. Снимок с помощью контрастной компьютеризированной томографии (СТ), вводя 120 мл омнипака, 350 мг йода/мл, с 2 мм толщиной среза, может обеспечить трехмерный многоплоскостной план лечения (STP, Fischer, Freiburg, Germany). Данное оборудование обеспечивает планирование на основе исследований с помощью ядерного магнитного резонанса, объединяя СТ и MRI информацию об объекте для четкого подтверждения мишени.

Для данной цели можно применять стереотаксическую систему Лекселля (Downs Surgical, Inc., Decatur, GA), измененную для применения с GE СТ сканнером (General Electric Company, Milwaukee, WI), а также стереотаксическую систему Брауна-Робертса-Уэллса (BRW) (Radionics, Burlington, MA). Таким образом, в начале имплантации кольцевое основание BRW стереотаксической рамки можно присоединять к черепу пациента. Последовательные СТ разрезы можно получить через 3 мм интервалы об-

ласти (ткань-мишень) с помощью рамки локализатора с графитовым стержнем, прикрепленной к опорной пластинке. Компьютерную программу планирования лечения можно запускать на VAX 11/780 компьютере (Digital Equipment Corporation, Maynard, Mass.), применяя СТ координаты изображений графитового стержня на карте между СТ пространством и BRW пространством.

Способы лечения расстройств, связанных с двигательными нейронами, как описано в настоящем документе, обычно испытывают *in vitro*, и затем *in vivo* на приемлемой животной модели, на требуемую терапевтическую или профилактическую активность, перед применением на людях. Подходящие животные модели, включая трансгенных животных, хорошо известны специалистам в данной области техники. Например, *in vitro* анализы для демонстрации влияния на выживаемость антагонистов LINGO-2 описаны в настоящем документе. Влияние антагонистов LINGO-2 на выживаемость двигательных нейронов и рост аксонов двигательных нейронов можно испытывать *in vitro*, как описано в примерах. Наконец, испытания *in vivo* можно проводить, получая трансгенных мышей, которые экспрессируют антагонист LINGO-2, или вводя антагонист LINGO-2 мышам или крысам на моделях, как описано в настоящем документе.

Примеры

Пример 1. LINGO-2 специфически экспрессируется в центральной нервной системе.

Экспрессию LINGO-2 в тканях крыс и мышей оценивали анализом с помощью количественной ПЦР (количественная ПЦР) следующим способом. РНК крыс получали у Clontech и РНК мышей получали из тканей Р6 мышей. мРНК экстрагировали, используя набор Absolutely RNA Miniprep (Stratagene), следуя инструкциям производителя. Специфическую для ткани одноцепочечную кДНК получали из мРНК и подвергали Тацман ПЦР в реальном времени (проводимом, по существу, как описано в Mi et al., *Nature Neuroscience* 7:221-228 (2004)) для количественной оценки концентрации мРНК LINGO-2, используя:

- (i) прямой праймер 5'-ACCTTGATACCTGACCCACCTTAA-3' (SEQ ID NO: 23),
- (ii) обратный праймер 5'-AGAGAACATGCCTGCTTCAATAGTG-3' (крысы) (SEQ ID NO: 24) или 5'-AGAGAACATGCCAGCTTCAATAGTG-3' (мыши) (SEQ ID NO: 25) и
- (iii) MGB зонд (Applied Biosystems) 5'-CCTCTCCTACATCCC-3' (SEQ ID NO: 26).

TaqMan систему генной экспрессии (Mx3000P) применяли для количественного определения концентрации мРНК.

Относительные уровни экспрессии LINGO-2 определяли сначала нормализацией концентрации мРНК LINGO-2 в тканях к концентрации мРНК β-актина в тех же тканях. Концентрацию мРНК β-актина определяли количественно параллельно, используя набор праймеров Rn0067869 m1 (крыса) или Mn00607939 (мышь) (Applied Biosystems). Затем относительные концентрации мРНК LINGO-2 определяли сравнением нормализованной концентрации мРНК LINGO-2 в каждой ткани с нормализованным уровнем экспрессии в универсальном наборе для крыс и ткани легкого для мышей, обоим из которых присваивали величину 1. Относительный уровень экспрессии LINGO-2 для крысы показан на фиг. 1 и для ткани Р6 мышей - на фиг. 2. У крыс LINGO-2 экспрессируется в наибольшей степени в головном мозге. Степень экспрессии в тимусе, желудке, печени, толстой кишке, сердце, плаценте, почках, селезенке, груди и легких была низкой или недектируемой по сравнению с фоном. В ткани Р6 мышей LINGO-2 экспрессируется в наибольшей степени в головном мозге и спинном мозге. Примечательно, степень экспрессии в спинном мозге была больше, чем степень экспрессии в головном мозге. Это является противоположным тому, что наблюдалось для LINGO-1, где экспрессия в головном мозге была больше, чем экспрессия в спинном мозге. Экспрессия LINGO-2 в сердце, почках, печени, селезенке, кишечнике, легком, коже и желудке была низкой или недектируемой по сравнению с фоном.

Пример 2. LINGO-2 значительно экспрессируется в нейронах коры головного мозга и DRG нейронах.

Экспрессию LINGO-2 в нейронах крыс оценивали анализом с помощью количественной ПЦР (количественная ПЦР) следующим способом. РНК получали из популяции нейронов крыс, и мРНК выделяли, используя набор Absolutely RNA Miniprep (Stratagene), следуя инструкциям производителя. Одноцепочечную кДНК получали из РНК и подвергали Тацман ПЦР в реальном времени (проводимой, по существу, как описано в Mi et al., *Nature Neuroscience* 7:221-228 (2004)) для количественного определения концентрации LINGO-2 мРНК, используя праймеры SEQ ID NO: 23-26, как описано в примере 1. Тацман систему генной экспрессии (Mx3000P) применяли для количественного определения концентрации мРНК.

Относительные степени экспрессии LINGO-2 определяли сначала нормализацией концентрации мРНК LINGO-2 в популяциях нейронов к концентрации мРНК актина в тех же популяциях нейронов. Затем относительные концентрации мРНК LINGO-2 определяли сравнением нормализованных концентраций мРНК LINGO-2 в каждой ткани с нормализованной степенью экспрессии в клетках, являющихся предшественниками олигодендроглиоцитов (OPC), которой приписывали величину 1. Относительные степени экспрессии LINGO-2 показаны на фиг. 3. LINGO-2 экспрессируется в наибольшей степени в нейронах коры головного мозга и ганглия заднего корешка (DRG). Обнаруживали экспрессию в астроци-

так, но она была меньше по сравнению с нейронами коры головного мозга и DRG. Степень была наименьшей в микроглиальных клетках.

Пример 3. Конструирование и очистка слитого белка LINGO-2-Fc.

Конструкт получали слиянием внеклеточной части LINGO-2 человека (остатки 1-500) с шарнирной и Fc областью IgG₁ человека. Последовательность растворимого LINGO-2:Fc белка показана ниже:

```
MLHTAISCWQ PFLGLAVVLI FMGSTIGCPA RCECSAQNKVSCHRRRLIA IPEGIPRIETK
ILDL SKNRLK SVNPEEFISY PLLEEIDLSD NIIANVEPGA FNNLFNLRSRL RLKG NRLKLV
PLGVFTGLSN LTKLDISENK IVILLDYMFMQ DLHNLKSLEV GDNDLVYISH RAFSGLLSLE
QLTLEKCNLT AVPTEALSHL RSLISLHLKH LNINNMPVYA FKRLFHLKHL EIDYWPLLDM
MPANSLYGLN LTSLSVTNTN LSTVPLFLAFK HLVYLTHLNL SYNPISTIEA GMFSDLIRLQ
ELHIVGAQLR TIEPHSFQGL RFLRVLNVSQ NLLETLEENV FSSPRALEVL SINNNPLACD
CRLLWILQRQ PTLQFGQQQP MCAGPDTIRE RSFKDFHSTA LSFYFTCKKP KIREKQLQHL
LVDEGQTVQL ECSADGDPQP VISWVTPRRR FITTKSNGRA TVLGDTLEI RFAQDQDSGM
YVCIASNAAG NDTFTASLT VDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV
TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY
KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
EWESNGQPEN NYKTPPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK
SLSLSPGK (SEQ ID NO:27)
```

Пример 4. Получение LINGO-2-специфических моноклональных антител.

Анти-LINGO-2 антитела, которые специфически связываются с LINGO-2, получали скринингом фагмидной библиотеки Fab фрагментов "наивных" антител человека, содержащей $3,5 \times 10^{10}$ уникальных клонов (Nat. Biotechnol. 2005 Mar; 23(3):344-8). Селекцию проводили, как описано ранее, и обнаруживали антитело C09. Последовательности C09 представлены в табл. 3-6. Эксперименты на связывание показывают, что C09 антитело связывается с LINGO-2, но не связывается с LINGO-1. Кроме того, C09 антитело связывается с LINGO конструктором, содержащим LRR7-LRR12 LINGO-2, но не содержащим LRR1-LRR6 LINGO-2.

Пример 5. Блокирование LINGO-2 растворимым LINGO-2 или анти-LINGO-2 антителом способствует выживаемости двигательных нейронов человека.

Двигательные нейроны человека, полученные из эмбриональных стволовых клеток человека (hESc) (Lonza) в 96-луночных планшетах подвергали трипсинолизу в 0,025% трипсин/EDTA и повторно наносили на предметное стекло с 4 лунками при плотности 5×10^4 /лунка в MotorBlast Media (Lonza). Клетки инкубировали в течение ночи при 37°C в увлажненном воздухе с 5% CO₂.

Клетки обрабатывали 0,5 мМ арсенитом натрия в течение 30 мин.

Арсенит натрия обеспечивает окислительное повреждение, которое вызывает гибель клеток. Клетки промывали три раза, и затем добавляли к клеткам свежую MotorBlast среду, содержащую или 50 мкг/мл растворимого LINGO-2:Fc, 10 мкг/мл анти-LINGO-2 C09 Fab, или контрольный hIgG. Культуры выдерживали при 37°C в увлажненном воздухе с 5% CO₂ в течение 24 ч, затем фиксировали 4% параформальдегидом.

Иммуноцитохимию осуществляли на клетках, прокрашивая двигательные нейроны, с применением анти-βIII тубулина (Covance) и анти-нейрофиламента (Millipore) (фиг. 4).

Как показано на фиг. 4, обработка арсенитом натрия снижает количество двигательных нейронов. Однако как растворимый LINGO-2:Fc, так и анти-LINGO-2 C09 Fab снижал гибель двигательных нейронов, вызванную арсенитом натрия.

Пример 6. Блокирование LINGO-2 растворимым LINGO-2 способствует росту аксонов двигательных нейронов.

Двигательные нейроны выделяли из спинного мозга 16 дневных эмбрионов крыс (E16), используя Nycodenz градиентное центрифугирование. Спинной мозг из эмбрионов крыс E16 вырезали и выдерживали с 0,025% трипсином при 37°C в течение 40 мин. Трипсиновый раствор заменяли средой, содержащей три объема среды Игла, модифицированной по способу Дульбекко, к одному объему питательной среды F-12 Ham (DMEM/F12) и 0,004% ДНКазы. Клетки спинного мозга выдерживали в течение 5 мин и затем разделяли осторожным растиранием до того, как клеточная супензия становилась гомогенной. Полученную в результате супензию спинного мозга разделяли на слои в градиенте 4% бычьего сывороточного альбумина (BSA), и клеточную массу собирали центрифугированием раствора при 100×g при 4°C. Клеточную массу повторно суспендировали в DMEM/F12 среде, содержащей 0,004% ДНКазу и разделяли на слои в Nycodenz градиентах 8,01, 7,66 и 7,05%. Градиенты центрифугировали при 500×g. Двигательные нейроны детектировали в виде белой непрозрачной массы на поверхности среды, и собирали 7,05% раствор.

Собранные двигательные нейроны помещали на предметное стекло с 4 лунками, покрытое 10 мкг/мл поли-D лизином и 10 мкг/мл ламинином при плотности 5×10^4 клеток/лунка в среде для роста

двигательных нейронов (1:1 соотношение нейробазальной среды, дополненной 2% B27 и 0,5 мМ глютамином, и DMEM/F12 среды (3:1), дополненной 0,4 мкг/мл гидрокортизоном, 5 мкг/мл инсулином и 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS)). Полученную в результате среду дополняли 10 нг/мл нейротропином-3, 10 нг/мл нейротрофическим фактором из тканей мозга, 10 нг/мл нейротрофическим фактором линии глиальных клеток, 10 нг/мл цилиарным нейротрофическим фактором и антибиотиками. Клетки выдерживали в течение ночи при 37°C в увлажненном воздухе с 5% CO₂, и затем обрабатывали 0,5 мМ арсенитом натрия в течение 30 мин. Клетки промывали три раза, и затем добавляли свежую среду для роста двигательных нейронов, содержащую или 50 мкг/мл растворимого LINGO-2-Fc или контрольный hIgG. Культуры выдерживали при 37°C в увлажненном воздухе с 5% CO₂ в течение 24 ч, затем фиксировали 4% параформальдегидом.

Иммуноцитохимию проводили на клетках, окрашивая двигательные нейроны, используя антineйрофиламент (Millipore) (фиг. 5). Самый длинный нейрит для каждого нейрона считали аксоном, и измеряли длину аксона, применяя Openlab программное обеспечение. Как видно на фиг. 5, после обработки клеток арсенитом натрия, растворимый LINGO-2 повышал рост аксонов нейронов приблизительно на 20% по сравнению с контрольными клетками, обработанными hIgG.

Пример 7. Степень экспрессии LINGO-2 увеличивается у мышей SODG93A.

У трансгенных животных с ДНК с мутацией гена медь-цинк супероксиддисмутазы (SOD1) (например, SODG39A) развивалась паралитическая болезнь двигательных нейронов, напоминающая амиотрофический боковой склероз (ALS) у людей, и их обычно используют в качестве моделей для ALS. Nara et al., *Neurol. Int.* 1:e16 (2009).

65 дневных SODG93A или подходящих по возрасту контрольных мышей дикого типа опрыскивали забуференным фосфатом солевым раствором (PBS), и вырезали спинной мозг. Спинной мозг фиксировали в 4% параформальдегиде, и грудную область спинного мозга погружали в реагент с оптимальной температурой нарезания (O.C.T.) для получения криостатных срезов. Замороженные срезы зондировали меченым диоксигенином LINGO-2 антисмысловым РНК зондом 5'-TAATACGACTCACTATAGGGACAGAACGCCCTTCCATCT-3' (SEQ ID NO: 28) и меченым диоксигенином смысловым РНК зондом 5'-TAATACGACTCACTATAGGGACAGAACGCCCTTCCATCT-3' (SEQ ID NO: 29).

Затем срезы окрашивали, применяя тирамидное усиление сигнала (TSA) плюс набор флуоресцентных анти-диоксигениновых антител (Perkin Elmer), следуя инструкции производителя.

Проводили количественный анализ, в котором считали количество LINGO-2 положительных клеток в областях центрального рога в каждом срезе при 20× Openlab программным обеспечением. Трех животных анализировали как из SODG39A мышей, так и из мышей дикого типа. Как видно на фиг. 6, степень экспрессии LINGO-2 увеличивалась в центральном роге спинного мозга из 65-дневных SODG39A мышей при сравнении гибридизацией *in situ*. Имелось 2-кратное увеличение количества LINGO-2 положительных клеток и большая интенсивность окрашивания у SODG39A мышей по сравнению с контрольными мышами дикого типа.

Пример 8. Антагонисты LINGO-2 способствуют росту и выживаемости двигательных нейронов при ALS.

Трансгенных мышей, экспрессирующих SODG93A человека, и подходящих по возрасту контрольных мышей обрабатывали PBS (контроль растворителем), контрольным антителом или анти-LINGO-2 антителом, например, C09. Обработку осуществляли интраперитонеальным введением еженедельно. Мышей умерщвляли в возрасте от 84 до 90 дней и оценивали на мышечную массу и гистологию (например, оценивая выживаемость двигательных нейронов). Других мышей отслеживали в течение дополнительного времени, например, приблизительно 134 дней, на развитие заболевания (например, способность выпрямляться после опрокидывания на левый и правый бок и силу захвата).

Пример 9. Антагонисты LINGO-2 усиливают фосфорилирование АКТ.

Двигательные нейроны выдерживали в присутствии равных концентраций анти-LINGO-2 антитела, C09 или контрольного антитела. Лизаты клеток собирали и анализировали на концентрацию фосфорилированного АКТ белка вестерн анализом. Концентрацию β-актина также измеряли в качестве контроля. Как показано на фиг. 7, анти-LINGO-2 антитело усиливает фосфорилирование АКТ.

Пример 10. Антагонисты LINGO-2 способствуют дифференциации олигодендроцитов.

Роль анти-LINGO-2 антител исследовали *in vitro* обработкой клеток, являющихся предшественниками олигодендроцитов, повышающимися количествами C09 антитела и испытанием на миелин-ассоциированный гликопротеин (MAG) и основной миelinовый белок (MBP) вестерн-блоттингом. Как показано на фиг. 8, обработка C09 антителом повышала концентрации MAG и MBP зависящим от дозы образом. MBP представляет собой маркер зрелых олигодендроцитов. Таким образом, данные показывают, что антагонисты LINGO-2 способствуют дифференциации олигодендроцитов.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> MI, Sha
 <120> Антагонисты LINGO-2 для лечения заболеваний, в которых участвуют двигательные нейроны
 <130> 2159.361PC02/EJH/CLD
 <140> To be assigned
 <141> Herewith
 <150> 61/798,398
 <151> 2013-03-15
 <150> 61/646,611
 <151> 2012-05-14
 <160> 31
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 2792
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

aatttagaga agatgttaggg agtgttcaac atgttcgttg tggaagagaa agagctaaga	60
gagaggagct taaagacaca aacgggtaga atcaaggagt gtgctctcaa atgagaggaa	120
caggagtgac attaaccttg aatgctcgg agactctact cttcatgac agtaggagga	180
taattaacaa tagataacaaa tgcaggaatt gatgagtgcc atcagaaagc tgtatcatga	240
gctgcctgca cttctaaagt gtccagtggta ttttaatca catgagcctg gaaatagggt	300
tatgaaaaga agctcagagc agagcaccga aagtggccac taccagcatg aagagccaa	360
caattcaaac tggtaagtg agaaaaacag aatgcagctt tcaaggttcg tttcaagcag	420
ttggcttgcg ggactctgag agatgctgct gcccattgaca tgcggaaatt atcatgatca	480
actacccagc ttggatttca tccagtggcc aagagcttg tggggagac ggcaagggtt	540
ggattttca aaagagtaaa ccaggataaa tcatgaggaa cctataaccc tttggccac	600
atgcaaaaaaa gcaagacccg tgaccaaggt gtagactaag aagtggagtc atgcttcaca	660
cggccatatac atgctggcag ccattcctgg gtctggctgt ggtgttaatc ttcatggat	720
ccaccattgg ctgccccgt cgctgtgagt gctctgcccga aacaaatct gttagctgtc	780
acagaaggcg attgatcgcc atcccagagg gcattcccat cgaaacccaa atcttggacc	840
tcagtaaaaaa caggctaaaaa agcgtcaacc ctgaagaatt catatcatat cctctgctgg	900
aagagataga cttgagtgac aacatcatgt ccaatgtgga accaggagca ttcaacaatc	960
tcttaacct gcgttccctc cgcctaaaag gcaatcgtct aaagctggtc ccttggag	1020

tattcacggg gctgtccaat ctcactaagc ttgacattag tgagaataag attgtcattt	1080
tactagacta catgttccaa gatctacata acctgaagtc tctagaagtg ggggacaatg	1140
atttggttta tatacacac agggcattca gtgggcttct tagcttggag cagctcaccc	1200
tggagaaaatg caacttaaca gcagtaccaa cagaagccct ctcccacctc cgcaagcctca	1260
tcagcctgca tctgaagcat ctcaatatca acaatatgcc tgtgtatgcc tttaaaagat	1320
tgttccaccc gaaacaccta gagattgact attggcctt actggatatg atgcctgcca	1380
atagcctcta cggctcaac ctcacatccc tttcagtcac caacaccaat ctgtctactg	1440
tacccttcct tgcctttaaa cacctggat acctgactca ccttaacctc tcctacaatc	1500
ccatcagcac tattgaagca ggcattttct ctgacctgat ccgccttcag gagttcata	1560
tagtgggggc ccagcttcgc accattgagc ctcactcctt ccaagggctc cgcttcctac	1620
gcgtgctcaa tgtgtctcag aacctgctgg aaactttgga agagaatgtc ttctccccc	1680
ctagggctct ggaggtcttg agcattaaca acaaccctct ggcctgtgac tgccgccttc	1740
tctggatctt gcagcgacag cccaccctgc agtttggat ccagcaacct atgtgtgctg	1800
gcccagacac catccgtgag aggtcttca aggatttcca tagcactgcc ctttctttt	1860
actttacctg caaaaaaccc aaaatccgtg aaaagaagtt gcagcatctg ctagtagatg	1920
aagggcagac agtccagcta gaatgcagtg cagatggaga cccgcagcct gtgatttc	1980
gggtgacacc ccgaaggcgt ttcatcacca ccaagtccaa tggaagagcc accgtgttgg	2040
gtgatggcac cttggaaatc cgcttgcctt aggatcaaga cagcggatg tatgtttgca	2100
tcgctagcaa tgctgctgg aatgatacct tcacagcctc cttaactgtg aaaggattcg	2160
cttcagatcg ttttctttat gcaacagga cccctatgta catgaccgac tccaatgaca	2220
ccatttccaa tggcaccaat gccaatactt tttccctgga cttaaaaca atactgggt	2280
ctacagctat gggctgcttc acattccctgg gagttttt atttgttt cttctccccc	2340
ttgtgtggag ccgagggaaa ggcaagcaca aaaacagcat tgaccttgag tatgtgccc	2400
aaaaaaacaa tggtgctgtt gtggaggag aggtagctgg acccaggagg ttcaacatga	2460
aaatgatttg aaggcccacc cctcacattna ctgtctttt gtcaatgtgg gtaatcagta	2520
agacagtatg gcacagtaaa ttactagatt aagaggcagc catgtgcagc tgccctgtta	2580
tcaaaaagcag ggtctatgga agcaggagga cttccaatgg agactctcca tcgaaaggca	2640
ggcaggcagg catgtgtcag agcccttcac acagtggat actaagtgtt tgcttgcaa	2700
atattggcgt tctggggatc tcagtaatga acctgaatat ttggctcaca ctcacggaca	2760
attattcagc attttctacc actgcaaaaa ac	2792

<210> 2
<211> 606

030716

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Leu His Thr Ala Ile Ser Cys Trp Gln Pro Phe Leu Gly Leu Ala
1 5 10 15

Val Val Leu Ile Phe Met Gly Ser Thr Ile Gly Cys Pro Ala Arg Cys
20 25 30

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

Ile Ala Ile Pro Glu Gly Ile Pro Ile Glu Thr Lys Ile Leu Asp Leu
50 55 60

Ser Lys Asn Arg Leu Lys Ser Val Asn Pro Glu Glu Phe Ile Ser Tyr
65 70 75 80

Pro Leu Leu Glu Glu Ile Asp Leu Ser Asp Asn Ile Ile Ala Asn Val
85 90 95

Glu Pro Gly Ala Phe Asn Asn Leu Phe Asn Leu Arg Ser Leu Arg Leu
100 105 110

Lys Gly Asn Arg Leu Lys Leu Val Pro Leu Gly Val Phe Thr Gly Leu
115 120 125

Ser Asn Leu Thr Lys Leu Asp Ile Ser Glu Asn Lys Ile Val Ile Leu
130 135 140

Leu Asp Tyr Met Phe Gln Asp Leu His Asn Leu Lys Ser Leu Glu Val
145 150 155 160

Gly Asp Asn Asp Leu Val Tyr Ile Ser His Arg Ala Phe Ser Gly Leu
165 170 175

Leu Ser Leu Glu Gln Leu Thr Leu Glu Lys Cys Asn Leu Thr Ala Val
180 185 190

Pro Thr Glu Ala Leu Ser His Leu Arg Ser Leu Ile Ser Leu His Leu
195 200 205

Lys His Leu Asn Ile Asn Asn Met Pro Val Tyr Ala Phe Lys Arg Leu
210 215 220

Phe His Leu Lys His Leu Glu Ile Asp Tyr Trp Pro Leu Leu Asp Met
225 230 235 240

030716

Met Pro Ala Asn Ser Leu Tyr Gly Leu Asn Leu Thr Ser Leu Ser Val
245 250 255

Thr Asn Thr Asn Leu Ser Thr Val Pro Phe Leu Ala Phe Lys His Leu
260 265 270

Val Tyr Leu Thr His Leu Asn Leu Ser Tyr Asn Pro Ile Ser Thr Ile
275 280 285

Glu Ala Gly Met Phe Ser Asp Leu Ile Arg Leu Gln Glu Leu His Ile
290 295 300

Val Gly Ala Gln Leu Arg Thr Ile Glu Pro His Ser Phe Gln Gly Leu
305 310 315 320

Arg Phe Leu Arg Val Leu Asn Val Ser Gln Asn Leu Leu Glu Thr Leu
325 330 335

Glu Glu Asn Val Phe Ser Ser Pro Arg Ala Leu Glu Val Leu Ser Ile
340 345 350

Asn Asn Asn Pro Leu Ala Cys Asp Cys Arg Leu Leu Trp Ile Leu Gln
355 360 365

Arg Gln Pro Thr Leu Gln Phe Gly Gly Gln Gln Pro Met Cys Ala Gly
370 375 380

Pro Asp Thr Ile Arg Glu Arg Ser Phe Lys Asp Phe His Ser Thr Ala
385 390 395 400

Leu Ser Phe Tyr Phe Thr Cys Lys Lys Pro Lys Ile Arg Glu Lys Lys
405 410 415

Leu Gln His Leu Leu Val Asp Glu Gly Gln Thr Val Gln Leu Glu Cys
420 425 430

Ser Ala Asp Gly Asp Pro Gln Pro Val Ile Ser Trp Val Thr Pro Arg
435 440 445

Arg Arg Phe Ile Thr Thr Lys Ser Asn Gly Arg Ala Thr Val Leu Gly
450 455 460

Asp Gly Thr Leu Glu Ile Arg Phe Ala Gln Asp Gln Asp Ser Gly Met
465 470 475 480

Tyr Val Cys Ile Ala Ser Asn Ala Ala Gly Asn Asp Thr Phe Thr Ala

030716

485

490

495

Ser Leu Thr Val Lys Gly Phe Ala Ser Asp Arg Phe Leu Tyr Ala Asn
500 505 510

Arg Thr Pro Met Tyr Met Thr Asp Ser Asn Asp Thr Ile Ser Asn Gly
515 520 525

Thr Asn Ala Asn Thr Phe Ser Leu Asp Leu Lys Thr Ile Leu Val Ser
530 535 540

Thr Ala Met Gly Cys Phe Thr Phe Leu Gly Val Val Leu Phe Cys Phe
545 550 555 560

Leu Leu Leu Phe Val Trp Ser Arg Gly Lys Gly Lys His Lys Asn Ser
565 570 575

Ile Asp Leu Glu Tyr Val Pro Arg Lys Asn Asn Gly Ala Val Val Glu
580 585 590

Gly Glu Val Ala Gly Pro Arg Arg Phe Asn Met Lys Met Ile
595 600 605

<210> 3
<211> 3669
<212> ДНК
<213> Mus musculus

<400> 3
gccagtgcac tctagaaacc cagcctgcat gtagaaagcc ctgtctactg cagaagatga 60
ttcctgcccc gggtaaatg tgcacaactc gcggaaatgc cagtaccctc cacctgaagg 120
cacttagtgg ctagaaaacc agcaatctac cccgaaacac actgtactaa acacagcaag 180
agaccacaat gattggacat atacctatga agatccactt tgagaaaatg gccagttgtt 240
ccacaggatg cacttgaga atgaattcat tctagctggt acagcaaaag gagtgcatta 300
aggcccgtaa ccaaggtgta gacaaagaag tggagtcatg cttcacacgg ctataccatg 360
ctggcagcca ttcctgggtc tggctgtggt gttactctta atggatcca ccattggctg 420
tcctgctcgc tgtgagtgct ccgcccagaa caaatctgtt agctgccaca gaagacgatt 480
gctcgcgatc ccagaaggca ttcccattga gacaaaatc ttggacctga gcaaaaatcg 540
actaaagagc ataaaccctg aagagttcat ctcataatcct ctgttggagg agatagactt 600
gagcgacaac attattgcca atgtggagcc tggggcattt aacaatctct ttaacctgcg 660
ttccctccgc ctaaaaggca atcgccctaa gttggccct ttaggagtat tcacaggact 720
gtccaaacctc accaagcttg acattagtga gaataagatt gtcattttgc tggactacat 780

030716

gttccaggat ctgcataacc tgaagtctct agaagtgggg gacaatgatt tagtgttat 840
ctcacacagg gccttcagcg gactacttag cttggagcag ctcaccctgg agaagtgc当地
cttgacagca gtaccaacag aagcccttc ccatctccgc agcctcatcg ccctgc当地
gaagcatctc aatatcaaca atatgcctgt gtatgcctt aaaagattgt tccacctgaa 1020
aaacctagag atcgactatt ggccttggg ggatttgatg ccagccaaca gcctctatgg 1080
tctcaacctc acgtccctt caatcacca caccaacctg tccactgtcc cttccctc当地
ctttaaacac ctgttatacc tgaccacact taacctctcc tacaatccca tcagcactat 1200
tgaagctggc atgttctctg acctgatccg cctacaggag cttcatatag tgggggcca 1260
gctccgcact attgagcctc actccttcca agggctccgc ttccctccgtg tgctcaatgt 1320
atctcagaac ctgctggaaa cattggaaga gaacgtctc tcctccctta gggctttgga 1380
ggtcctgagc attaacaaca acccactagc ctgtgactgc cgactcctct ggctcctgca 1440
gchgacaaccc aacctgcagt ttgggggcca gcagccccatg tgtgctggc cagacaccat 1500
ccgtgagaga tcatttaagg atttccatag cactgcttt tccttttatt ttacctgcaa 1560
aaaacccaaa atccgtgaaa agaagttaca gcatctcctc gtggatgaag ggcaaacgg 1620
ccagctggag tgcaacgctg atggagaccc gcagccccgtg atttccctggg tgacacctcg 1680
aaggcgaaaa atcaccacca agtccaaacgg aagggccact gtgttgggtg atggcacctt 1740
ggaaatccgt ttgcccagg atcaagacag tggatgtat gttgcatcg cgagcaacgc 1800
tgctggaaac gataccttca cagcatctct cactgtgaag ggattcacgt cagaccgctt 1860
cctttacgca aacaggaccc ctatgtacat gactgactcc aacgacaccg tttccaaacgg 1920
cactaatgcc aataactttct ccctggaccc taaaacaata ctggtatcta cagccatggg 1980
ctgtttcaca ttccctggag tggtttatt ttgtttctc cttcttttgc tggatggccg 2040
agggaaaggc aagcacaaaa acagcattga ctttgatgtat gtgccccgaa aaaacaatgg 2100
tgctgtgtg gaaggggagg tggctggccc caggagggtc aacatgaaaa tggatctaagg 2160
gcccaccaca cactactgtc tctctgttac tggatgtatc gagtaagacg tctgatagag 2220
tgactcgatc acaaggatctt cgggcagctt tgccgcagctg cccctgtgtc aaaggcagggt 2280
ccatggaaac aggaagactt ctcatggaga ctggctgatt agaggcaggc aggcatgtgt 2340
cagagccctt cacacagtgg gatactaatt gttgcatgg caaatattgg cattctgggg 2400
atctcagcaa tgaacctgaa ctttggctc atgctgatgg acaataattc aacattttct 2460
accactgcaa aactaaaagg aaaaaaaatt aaaaagaaca acctacagt taggattac 2520
atattaaaaa gacacatttg tctaaaacat actctacagt caaatttgta tttattatca 2580
tttggtaaaa ctttgcatacataactg ttgggttgc accaaaaaga gatcaatata 2640
ttctttttt tgaacatata atgctgtata tggatggccg caaatatgtt gatcaatata 2700

gcttttagtt	actcaccagt	atagatccaa	gtgtggttc	acccctcctt	tacctgcaga	2760
taaacctgag	aatagatccc	tggaatacta	ggcagagatg	tgttgagatg	tgtatgtctg	2820
atgttaggatg	ccaagaaaca	agacccaagt	caaaaactgct	caactctgtt	aacttctgtt	2880
actataaata	aaggcatgtg	cctagtttg	atacagaatg	gaatattttt	tatacataca	2940
ctaccaacct	ggaccagttt	actgtAACAG	aagcccttgg	tttctccaga	aggcggtaca	3000
tcgctagggg	tacctataga	atacaaggta	ggtgtcactc	ttaaaaagtaa	tccatgttagc	3060
tactgcttag	ttttactttc	gccagtcact	gctaattgggt	taatgaccaa	tggaaaagag	3120
aatattgatt	atatagaatt	atttggcaat	attcaccaat	agctaatac	aataattctg	3180
ttgtccgaaa	gccctctgaa	taaggagggtt	tcagaagtca	ataggaagca	gggagagaca	3240
agagcatcac	agcagcgtt	cagccaatga	tcttttcaa	atgtggcagc	tgcctgcgg	3300
atggctacaa	atcaaaggga	atacgctgca	catgccagcc	caacttctat	ccaagtacta	3360
tacacagagt	aggaccacag	ttaggcaact	tcaggatatt	cctctgtttc	ctgatcaaga	3420
tcttagttt	catattgaaa	accatattac	acagctacga	ggaatatgtt	ttgtgtgaaa	3480
gaagtaaaag	tagtcaaaga	aaaaccaata	tagatctaaa	aaacaatgtt	ttgtcccttc	3540
actggggaaag	agctaagctt	atagttctac	aaatatgtaa	tgctgtgcc	attctttac	3600
cttcttgacc	tgagcatatt	tgcccaatta	agttgatatt	aatgttacta	atgcaaacat	3660
aaccagaaaa						3669

<210> 4
 <211> 606
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 4

Met Leu His Thr Ala Ile Pro Cys Trp Gln Pro Phe Leu Gly Leu Ala
 1 5 10 15

Val Val Leu Leu Met Gly Ser Thr Ile Gly Cys Pro Ala Arg Cys
 20 25 30

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

Leu Ala Ile Pro Glu Gly Ile Pro Ile Glu Thr Lys Ile Leu Asp Leu
 50 55 60

Ser Lys Asn Arg Leu Lys Ser Ile Asn Pro Glu Glu Phe Ile Ser Tyr
 65 70 75 80

030716

Pro Leu Leu Glu Glu Ile Asp Leu Ser Asp Asn Ile Ile Ala Asn Val
85 90 95

Glu Pro Gly Ala Phe Asn Asn Leu Phe Asn Leu Arg Ser Leu Arg Leu
100 105 110

Lys Gly Asn Arg Leu Lys Leu Val Pro Leu Gly Val Phe Thr Gly Leu
115 120 125

Ser Asn Leu Thr Lys Leu Asp Ile Ser Glu Asn Lys Ile Val Ile Leu
130 135 140

Leu Asp Tyr Met Phe Gln Asp Leu His Asn Leu Lys Ser Leu Glu Val
145 150 155 160

Gly Asp Asn Asp Leu Val Tyr Ile Ser His Arg Ala Phe Ser Gly Leu
165 170 175

Leu Ser Leu Glu Gln Leu Thr Leu Glu Lys Cys Asn Leu Thr Ala Val
180 185 190

Pro Thr Glu Ala Leu Ser His Leu Arg Ser Leu Ile Ala Leu His Leu
195 200 205

Lys His Leu Asn Ile Asn Asn Met Pro Val Tyr Ala Phe Lys Arg Leu
210 215 220

Phe His Leu Lys Asn Leu Glu Ile Asp Tyr Trp Pro Leu Leu Asp Leu
225 230 235 240

Met Pro Ala Asn Ser Leu Tyr Gly Leu Asn Leu Thr Ser Leu Ser Ile
245 250 255

Thr Asn Thr Asn Leu Ser Thr Val Pro Phe Leu Ala Phe Lys His Leu
260 265 270

Val Tyr Leu Thr His Leu Asn Leu Ser Tyr Asn Pro Ile Ser Thr Ile
275 280 285

Glu Ala Gly Met Phe Ser Asp Leu Ile Arg Leu Gln Glu Leu His Ile
290 295 300

Val Gly Ala Gln Leu Arg Thr Ile Glu Pro His Ser Phe Gln Gly Leu
305 310 315 320

Arg Phe Leu Arg Val Leu Asn Val Ser Gln Asn Leu Leu Glu Thr Leu
325 330 335

Glu Glu Asn Val Phe Ser Ser Pro Arg Ala Leu Glu Val Leu Ser Ile
340 345 350

Asn Asn Asn Pro Leu Ala Cys Asp Cys Arg Leu Leu Trp Leu Leu Gln
355 360 365

Arg Gln Pro Asn Leu Gln Phe Gly Gly Gln Gln Pro Met Cys Ala Gly
370 375 380

Pro Asp Thr Ile Arg Glu Arg Ser Phe Lys Asp Phe His Ser Thr Ala
385 390 395 400

Leu Ser Phe Tyr Phe Thr Cys Lys Lys Pro Lys Ile Arg Glu Lys Lys
405 410 415

Leu Gln His Leu Leu Val Asp Glu Gly Gln Thr Val Gln Leu Glu Cys
420 425 430

Asn Ala Asp Gly Asp Pro Gln Pro Val Ile Ser Trp Val Thr Pro Arg
435 440 445

Arg Arg Phe Ile Thr Thr Lys Ser Asn Gly Arg Ala Thr Val Leu Gly
450 455 460

Asp Gly Thr Leu Glu Ile Arg Phe Ala Gln Asp Gln Asp Ser Gly Met
465 470 475 480

Tyr Val Cys Ile Ala Ser Asn Ala Ala Gly Asn Asp Thr Phe Thr Ala
485 490 495

Ser Leu Thr Val Lys Gly Phe Thr Ser Asp Arg Phe Leu Tyr Ala Asn
500 505 510

Arg Thr Pro Met Tyr Met Thr Asp Ser Asn Asp Thr Val Ser Asn Gly
515 520 525

Thr Asn Ala Asn Thr Phe Ser Leu Asp Leu Lys Thr Ile Leu Val Ser
530 535 540

Thr Ala Met Gly Cys Phe Thr Phe Leu Gly Val Val Leu Phe Cys Phe
545 550 555 560

Leu Leu Leu Phe Val Trp Ser Arg Gly Lys Gly Lys His Lys Asn Ser
565 570 575

Ile Asp Leu Glu Tyr Val Pro Arg Lys Asn Asn Gly Ala Val Val Glu
580 585 590

Gly Glu Val Ala Gly Pro Arg Arg Phe Asn Met Lys Met Ile
 595 600 605

<210> 5
 <211> 2941
 <212> ДНК
 <213> Rattus norvegicus

<400> 5
 gtgccaggc actctagaaa cccagcctgc atgttagacag ccctgcctac tgcagaagat 60
 gattcctgcc ccgggttaaa cgtgtacaac tcgtggaaat gccagtacct tccacctgaa 120
 ggcacttagt ggctagaaaa ccagcaatct accccgaaac acactgtact aaacacagca 180
 agagaccaca atgattggac atagacctat aaggatacac tttgagaaag atgccagttg 240
 ttcctcagga tgcactttga aatgcagtc attctagctg gtaccgcaaa atgagtgcac 300
 taaggccat aaccaaggtg tagaataaac agtggagtca tgcttcacac ggctatacc 360
 tgctggcagc cattcctggg tctggctatg gtgttactct tcatggatc caccattggc 420
 tgtcctgctc gctgtgagtg ctctgcccag aacaaatctg ttagctgcc aagaagacgc 480
 ttgatcgcga tccccgaagg cattcccatt gagaccaaaa tcttggacct gagcaaaaat 540
 cgactaaaga gcataaaaccc cgaagaattc atctcatatc ctctgttggg ggagatagac 600
 ttgagcgaca acatcatcgc caatgtagaa cctggggcat ttaacaatct ctttaacctg 660
 cgttccctcc gcctaaaagg caatgcctt aagtgggtcc ctttgggagt attcacggg 720
 ctgtccaacc tcaccaagct tgacattagt gagaataaga ttgtcatttt gctggactac 780
 atgttccagg atctgcataa cctgaagtct ctagaagtgg gggacaatga tttggtttat 840
 atatcacaca gggccttcag tggactattt agcttggagc agctcacccct ggagaagtgc 900
 aacttgacag cggtagccaaac agaagccctt tcccatctcc gcagcctcat caccctgcat 960
 ctgaaggcatc tcaatatcaa caatatgcct gtgtatgcct ttaaaaagatt attccacctg 1020
 aaacaactag agatcgacta ttggccattg ctggatatga tgccagccaa tagcctctat 1080
 ggtctcaacc tcacatccct ctcgatcact aacaccaacc tgtccactgt cccttcctc 1140
 gcctttaaac accttgtata cctgaccac cttAACCTCT cctacaatcc catcagcact 1200
 attgaagcag gcatgttctc tgacctgatc cgcctacagg agcttcatgt agtcggggcc 1260
 cagctccgca ccattgaacc tcactccttc caagggctcc gcttcctccg cgtgctcaat 1320
 gtatctcaga acctgctgga aacattggaa gagaatgtct tctcttcccc tagggctttg 1380
 gaggtcctga gcattaacaa taacccacta gcgtgcgact gccgacttct ctggctcctg 1440
 cagcgacagg ccaccctgca gtttggaggc cagcagccca tgtgtgccgg gccagacacc 1500
 atacgtgaga ggtcatttaa ggattccat agcactgctc tttctttta ttttacctgc 1560

aaaaaaaccca	aaatccgtga	aaagaagtta	cagcacctcc	tagtggacga	aggacagacg	1620
gtccagctgg	agtcaacgc	ggatggagac	ccccagcccg	tgatttcctg	ggtgacacct	1680
cgaaggcggtt	ttatcaccac	caagtccaaac	ggaagggcca	ctgtgttggg	tgtggcacc	1740
ttagaaatcc	gtttcgccca	gatcaagac	agtggatgt	atgtttgcat	agctagcaat	1800
gctgctggga	atgacacacctt	cacggcatct	ctcactgtga	agggattcac	ttcagaccgc	1860
ttccttacg	caaacaggac	ccctatgtac	atgactgact	ccaatgacac	cgttccaac	1920
ggcactaatg	ccaatacttt	ttccctggac	cttaaaacaa	tactggtatac	tacagccatg	1980
ggctgtttca	cattcctggg	agtggttta	tttggtttc	tccttcttt	tgtgtggagc	2040
cgaggaaagg	gcaaacacaa	aaacagcatt	gacccttgagt	atgtgccccg	aaaaaacaat	2100
ggtgctgttg	cagaagggga	ggtggctgga	cccaggaggt	tcaacatgaa	aatgatataa	2160
gggcccacca	cacacacact	actactgtct	ctgtgttact	gttggtaatg	agtaagacgt	2220
ctgatatacg	gagtcatca	caaggtgatc	aggcagcttc	acacagctgc	ccctgtgtca	2280
aagcagggtc	catggaagct	ggaagacttc	tcatggacac	tggctgatta	gaggcaggca	2340
ggcatgtgtc	agagcccttc	acacagtggg	atactaattg	tttgcattgc	aaatattggc	2400
attctgggga	tctcagtaat	gaccctgaac	cttggctca	tgctgacgga	caaaaattca	2460
acattttcta	ccactgcaaa	actaaaagaa	aaaaaattta	aaaggaacaa	cctacagtgt	2520
aggatttaca	tattaaaaaa	agacacattt	gtctaaaaca	tactctacgg	taaaatttgt	2580
atttattatc	atttgttaaa	accttgcatc	atacaatact	gttggttcag	caccaaaaaa	2640
aaaaaaaaaa	aaaaaaaaagag	agatcaatat	attcttttt	gaaacatata	tgctgtatata	2700
gttttaaagc	aatatgaatg	agaggttgc	cttttagtta	ctcaccagta	tagatccaag	2760
tgtggtctca	ctttcctttt	atccgcagag	aaacctgaga	atagatccct	ggaataatag	2820
gctgagatgt	gttgagatgt	gtatgtctga	tgttaggatgc	caagatacaa	gagcccagtc	2880
aaaactgctc	aactctgtta	acttctgtta	ctataaataa	aggcatgtgc	ctagtttga	2940
t						2941

<210> 6
 <211> 606
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 6

Met Leu His Thr Ala Ile Pro Cys Trp Gln Pro Phe Leu Gly Leu Ala
 1 5 10 15

Met Val Leu Leu Phe Met Gly Ser Thr Ile Gly Cys Pro Ala Arg Cys
 20 25 30

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

Ile Ala Ile Pro Glu Gly Ile Pro Ile Glu Thr Lys Ile Leu Asp Leu
50 55 60

Ser Lys Asn Arg Leu Lys Ser Ile Asn Pro Glu Glu Phe Ile Ser Tyr
65 70 75 80

Pro Leu Leu Glu Glu Ile Asp Leu Ser Asp Asn Ile Ile Ala Asn Val
85 90 95

Glu Pro Gly Ala Phe Asn Asn Leu Phe Asn Leu Arg Ser Leu Arg Leu
100 105 110

Lys Gly Asn Arg Leu Lys Leu Val Pro Leu Gly Val Phe Thr Gly Leu
115 120 125

Ser Asn Leu Thr Lys Leu Asp Ile Ser Glu Asn Lys Ile Val Ile Leu
130 135 140

Leu Asp Tyr Met Phe Gln Asp Leu His Asn Leu Lys Ser Leu Glu Val
145 150 155 160

Gly Asp Asn Asp Leu Val Tyr Ile Ser His Arg Ala Phe Ser Gly Leu
165 170 175

Phe Ser Leu Glu Gln Leu Thr Leu Glu Lys Cys Asn Leu Thr Ala Val
180 185 190

Pro Thr Glu Ala Leu Ser His Leu Arg Ser Leu Ile Thr Leu His Leu
195 200 205

Lys His Leu Asn Ile Asn Asn Met Pro Val Tyr Ala Phe Lys Arg Leu
210 215 220

Phe His Leu Lys Gln Leu Glu Ile Asp Tyr Trp Pro Leu Leu Asp Met
225 230 235 240

Met Pro Ala Asn Ser Leu Tyr Gly Leu Asn Leu Thr Ser Leu Ser Ile
245 250 255

Thr Asn Thr Asn Leu Ser Thr Val Pro Phe Leu Ala Phe Lys His Leu
260 265 270

Val Tyr Leu Thr His Leu Asn Leu Ser Tyr Asn Pro Ile Ser Thr Ile

030716

275	280	285
Glu Ala Gly Met Phe Ser Asp Leu Ile Arg Leu Gln Glu Leu His Val		
290	295	300
Val Gly Ala Gln Leu Arg Thr Ile Glu Pro His Ser Phe Gln Gly Leu		
305	310	315
320		
Arg Phe Leu Arg Val Leu Asn Val Ser Gln Asn Leu Leu Glu Thr Leu		
325	330	335
340	345	350
Glu Glu Asn Val Phe Ser Ser Pro Arg Ala Leu Glu Val Leu Ser Ile		
Asn Asn Asn Pro Leu Ala Cys Asp Cys Arg Leu Leu Trp Leu Leu Gln		
355	360	365
Arg Gln Ala Thr Leu Gln Phe Gly Gly Gln Gln Pro Met Cys Ala Gly		
370	375	380
390	395	400
Pro Asp Thr Ile Arg Glu Arg Ser Phe Lys Asp Phe His Ser Thr Ala		
Leu Ser Phe Tyr Phe Thr Cys Lys Lys Pro Lys Ile Arg Glu Lys Lys		
405	410	415
420	425	430
Leu Gln His Leu Leu Val Asp Glu Gly Gln Thr Val Gln Leu Glu Cys		
Asn Ala Asp Gly Asp Pro Gln Pro Val Ile Ser Trp Val Thr Pro Arg		
435	440	445
Arg Arg Phe Ile Thr Thr Lys Ser Asn Gly Arg Ala Thr Val Leu Gly		
450	455	460
Asp Gly Thr Leu Glu Ile Arg Phe Ala Gln Asp Gln Asp Ser Gly Met		
465	470	475
480		
Tyr Val Cys Ile Ala Ser Asn Ala Ala Gly Asn Asp Thr Phe Thr Ala		
485	490	495
500	505	510
Ser Leu Thr Val Lys Gly Phe Thr Ser Asp Arg Phe Leu Tyr Ala Asn		
Arg Thr Pro Met Tyr Met Thr Asp Ser Asn Asp Thr Val Ser Asn Gly		
515	520	525

030716

Thr Asn Ala Asn Thr Phe Ser Leu Asp Leu Lys Thr Ile Leu Val Ser
530 535 540

Thr Ala Met Gly Cys Phe Thr Phe Leu Gly Val Val Leu Phe Cys Phe
545 550 555 560

Leu Leu Leu Phe Val Trp Ser Arg Gly Lys Gly Lys His Lys Asn Ser
565 570 575

Ile Asp Leu Glu Tyr Val Pro Arg Lys Asn Asn Gly Ala Val Ala Glu
580 585 590

Gly Glu Val Ala Gly Pro Arg Arg Phe Asn Met Lys Met Ile
595 600 605

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Антитело C09 VH-CDR1

<400> 7

Leu Tyr Trp Met Asn
1 5

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Антитело C09 VH-CDR2

<400> 8

Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Trp Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Антитело C09 VH-CDR3

<400> 9

Asp His Trp Gly Ser Gly Ser Pro Asp Tyr

030716

1

5

10

<210> 10
<211> 119
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Антитело C09 VH

<400> 10

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Leu Tyr
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Pro Ser Gly Gly Trp Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp His Trp Gly Ser Gly Ser Pro Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 11
<211> 14
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Антитело C09 VL-CDR1

<400> 11

Thr Gly Ser Ser Arg Asp Val Gly Gly Tyr Asp Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Антитело C09 VL-CDR2

<400> 12

Glu Val Thr Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Антитело C09 VL-CDR3

<400> 13

Cys Ser Tyr Ala Gly Ala Asn Thr Tyr Val
1 5 10

<210> 14
<211> 110
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Антитело C09 VL

<400> 14

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Leu Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Arg Asp Val Gly Gly Tyr
20 25 30

Asp Tyr Val Ser Trp Phe Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Val Ile Ser Glu Val Thr Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Cys Ser Tyr Ala Gly Ala
85 90 95

Asn Thr Tyr Val Phe Gly Ser Gly Thr Arg Val Thr Val Leu
100 105 110

<210> 15

<211> 15		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Антитело С09 VH-CDR1		
<400> 15		
ctttactgga tgaat		15
<210> 16		
<211> 51		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Антитело С09 VH-CDR2		
<400> 16		
tctatctctc cttctggtgg ctggactaag tatgctgact ccgttaaagg t		51
<210> 17		
<211> 30		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Антитело С09 VH-CDR3		
<400> 17		
gatcattggg gttcagggag ccccgactac		30
<210> 18		
<211> 357		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> Антитело С09 VH		
<400> 18		
gaagttcaat tgtagagtc tggggcggt ctgttcagc ctgggggtc ttacgtctt		60
tcttcgcgtg cttccggatt cactttctct cttaactgga tgaattgggt tcgccaagct		120
cctggtaaag gtttggagtg gtttcttct atctctcctt ctggggctg gactaagtat		180
gctgactccg ttaaaggctcg cttaactatc tctagagaca actctaagaa tactctctac		240
ttgcagatga acagcttaag ggctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagagatcat		300
tggggttcag ggagccccga ctactggggc cagggAACCC tggtcaccgt ctcaagc		357
<210> 19		
<211> 42		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		

<223> Антитело C09-VL CDR1

<400> 19
actggatcca gccgtgacgt tggtggttat gattatgtct cc 42

<210> 20
<211> 21
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Антитело C09 VL-CDR2

<400> 20
gaggtcacta agcggccctc a 21

<210> 21
<211> 30
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Антитело C09 VL-CDR3

<400> 21
tgctcatatg caggcgccaa cacttatgtc 30

<210> 22
<211> 330
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Антитело C09 VL

<400> 22
cagagcgtct tgactcagcc tccctccgcg tccgggtctc ctggacagtc actcaccatc 60
tcctgcactg gatccagccg tgacgttgggt ggttatgatt atgtctcctg gttccaacaa 120
cacccaggca aagcccccaa actcgtgatt tctgaggtca ctaagcggcc ctcaggggtc 180
cctgatcggt tctctggctc caagtctggc aacacggcct ccctgaccgt ctgtggactc 240
caacctgagg atgaggctga ttattattgc tgctcatatg caggcgccaa cacttatgtc 300
ttcggaaagtg ggaccagagt caccgtcctg 330

<210> 23
<211> 25
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 23
acttgtata cctgacccac cttaa 25

<210> 24
<211> 25

<212> ДНК
 <213> Rattus norvegicus

<400> 24
 agagaacatg cctgcttcaa tagtg

25

<210> 25
 <211> 25
 <212> ДНК
 <213> Mus musculus

<400> 25
 agagaacatg ccagcttcaa tagtg

25

<210> 26
 <211> 16
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> MGB зонд

<400> 26
 cctctcctac aatccc

16

<210> 27
 <211> 728
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27

Met Leu His Thr Ala Ile Ser Cys Trp Gln Pro Phe Leu Gly Leu Ala
 1 5 10 15

Val Val Leu Ile Phe Met Gly Ser Thr Ile Gly Cys Pro Ala Arg Cys
 20 25 30

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

Ile Ala Ile Pro Glu Gly Ile Pro Ile Glu Thr Lys Ile Leu Asp Leu
 50 55 60

Ser Lys Asn Arg Leu Lys Ser Val Asn Pro Glu Glu Phe Ile Ser Tyr
 65 70 75 80

Pro Leu Leu Glu Glu Ile Asp Leu Ser Asp Asn Ile Ile Ala Asn Val
 85 90 95

Glu Pro Gly Ala Phe Asn Asn Leu Phe Asn Leu Arg Ser Leu Arg Leu
 100 105 110

030716

Lys Gly Asn Arg Leu Lys Leu Val Pro Leu Gly Val Phe Thr Gly Leu
115 120 125

Ser Asn Leu Thr Lys Leu Asp Ile Ser Glu Asn Lys Ile Val Ile Leu
130 135 140

Leu Asp Tyr Met Phe Gln Asp Leu His Asn Leu Lys Ser Leu Glu Val
145 150 155 160

Gly Asp Asn Asp Leu Val Tyr Ile Ser His Arg Ala Phe Ser Gly Leu
165 170 175

Leu Ser Leu Glu Gln Leu Thr Leu Glu Lys Cys Asn Leu Thr Ala Val
180 185 190

Pro Thr Glu Ala Leu Ser His Leu Arg Ser Leu Ile Ser Leu His Leu
195 200 205

Lys His Leu Asn Ile Asn Asn Met Pro Val Tyr Ala Phe Lys Arg Leu
210 215 220

Phe His Leu Lys His Leu Glu Ile Asp Tyr Trp Pro Leu Leu Asp Met
225 230 235 240

Met Pro Ala Asn Ser Leu Tyr Gly Leu Asn Leu Thr Ser Leu Ser Val
245 250 255

Thr Asn Thr Asn Leu Ser Thr Val Pro Phe Leu Ala Phe Lys His Leu
260 265 270

Val Tyr Leu Thr His Leu Asn Leu Ser Tyr Asn Pro Ile Ser Thr Ile
275 280 285

Glu Ala Gly Met Phe Ser Asp Leu Ile Arg Leu Gln Glu Leu His Ile
290 295 300

Val Gly Ala Gln Leu Arg Thr Ile Glu Pro His Ser Phe Gln Gly Leu
305 310 315 320

Arg Phe Leu Arg Val Leu Asn Val Ser Gln Asn Leu Leu Glu Thr Leu
325 330 335

Glu Glu Asn Val Phe Ser Ser Pro Arg Ala Leu Glu Val Leu Ser Ile
340 345 350

Asn Asn Asn Pro Leu Ala Cys Asp Cys Arg Leu Leu Trp Ile Leu Gln
355 360 365

Arg Gln Pro Thr Leu Gln Phe Gly Gly Gln Gln Pro Met Cys Ala Gly
370 375 380

Pro Asp Thr Ile Arg Glu Arg Ser Phe Lys Asp Phe His Ser Thr Ala
385 390 395 400

Leu Ser Phe Tyr Phe Thr Cys Lys Lys Pro Lys Ile Arg Glu Lys Lys
405 410 415

Leu Gln His Leu Leu Val Asp Glu Gly Gln Thr Val Gln Leu Glu Cys
420 425 430

Ser Ala Asp Gly Asp Pro Gln Pro Val Ile Ser Trp Val Thr Pro Arg
435 440 445

Arg Arg Phe Ile Thr Thr Lys Ser Asn Gly Arg Ala Thr Val Leu Gly
450 455 460

Asp Gly Thr Leu Glu Ile Arg Phe Ala Gln Asp Gln Asp Ser Gly Met
465 470 475 480

Tyr Val Cys Ile Ala Ser Asn Ala Ala Gly Asn Asp Thr Phe Thr Ala
485 490 495

Ser Leu Thr Val Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
500 505 510

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
515 520 525

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
530 535 540

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
545 550 555 560

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
565 570 575

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
580 585 590

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
595 600 605

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
610 615 620

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
625 630 635 640

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
645 650 655

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
660 665 670

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
675 680 685

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
690 695 700

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
705 710 715 720

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
725

<210> 28

<211> 40

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Меченный дигоксигенином антисмысловой РНК зонд LINGO-2

<400> 28

taatacgaact cactataggg acagaagccc tttcccatct

40

<210> 29

<211> 40

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Меченный дигоксигенином смысловой РНК зонд

<400> 29

taatacgaact cactataggg acagaagccc tttcccatct

40

<210> 30

<211> 200

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Общая структура олигонуклеотида, применяемого в получении миРНК молекулы

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(200)
<223> н означает а, с, г, т или и

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(200)
<223> Нуклеотид может быть пропущен

<400> 30
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 120
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 180
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 200

<210> 31
<211> 200
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Общая структура олигонуклеотида, применяемого в получении миРНК молекулы

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(200)
<223> н означает а, с, г, т или и

<220>
<221> misc_feature
<222> (2)..(200)
<223> Нуклеотид может быть пропущен

<400> 31
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 120
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 180
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 200

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения заболевания, связанного с двигательными нейронами, у человека, нуждающегося в этом, включающий введение человеку терапевтически эффективного количества композиции, содержащей антагонист LINGO-2, где антагонист LINGO-2 представляет собой антитело к LINGO-2 или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически и преимущественно связывается с LINGO-2.

2. Способ по п.1, где указанное заболевание выбрано из группы, состоящей из амиотрофического бокового склероза (ALS), первичного латерального склероза (PLS), прогрессирующей мышечной атрофии (PMA), наследственного спастического парапареза (HSP), спинобульбарной мышечной атрофии, связанной с X хромосомой (SBMA; болезнь Кеннеди), прогрессирующего бульварного паралича, псевдобульбарного паралича, спинальной мышечной атрофии (SMA), постполиомиелитного синдрома (PPS), болезни Хантингтона, эссенциального тремора (ET), болезни двигательных нейронов, паралича и болезни Паркинсона.

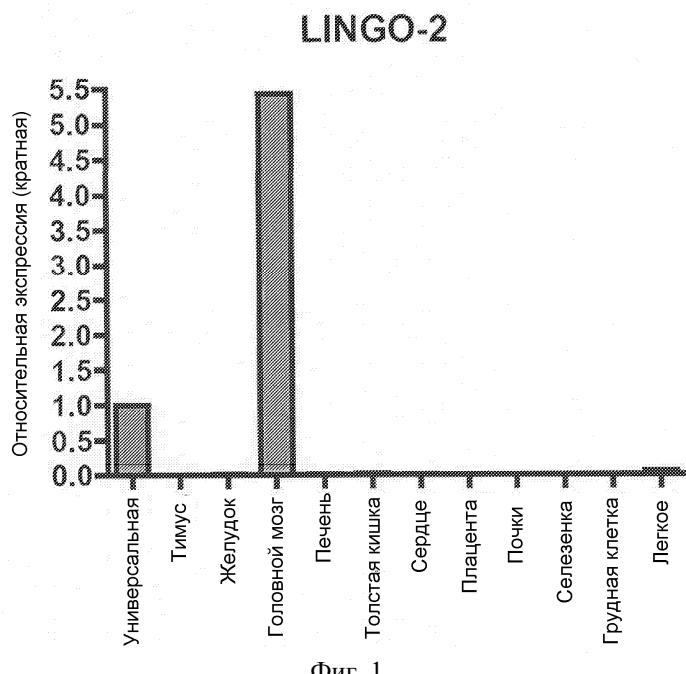
3. Способ по п.1, где указанное заболевание представляет собой амиотрофический боковой склероз (ALS).

4. Способ по любому из пп.1-3, где указанный антагонист LINGO-2 вводят болюсной инъекцией или непрерывным вливанием.

5. Способ по любому из пп.1-3, где указанный антагонист LINGO-2 вводят непосредственно в центральную нервную систему.

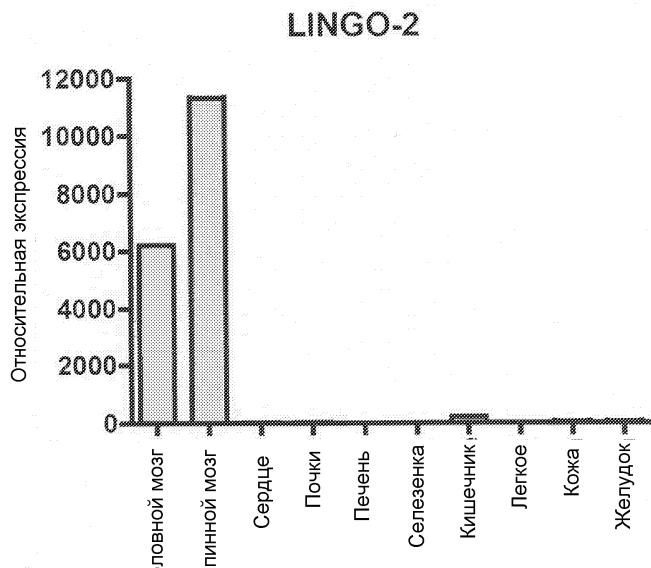
6. Способ по любому из пп.1-3, где указанный антагонист LINGO-2 вводят системно.

LINGO-2 специфически экспрессируется в ЦНС



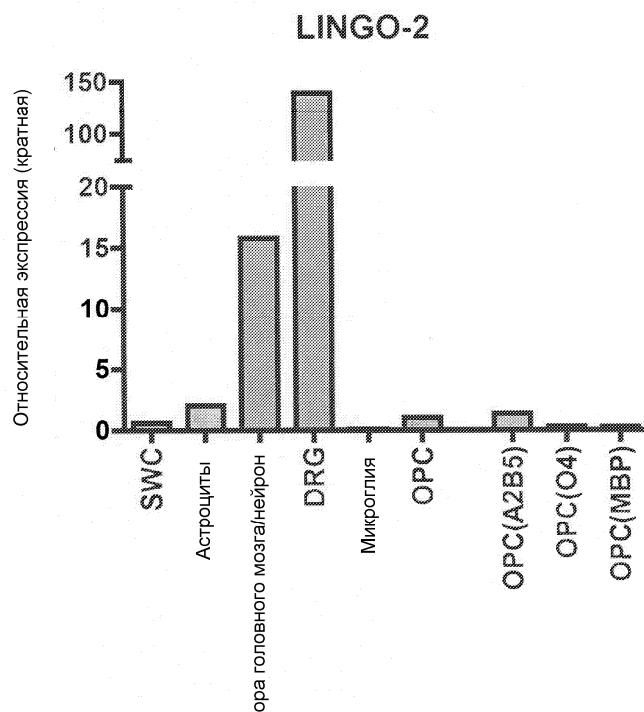
Фиг. 1

LINGO-2 специфически экспрессируется в ЦНС



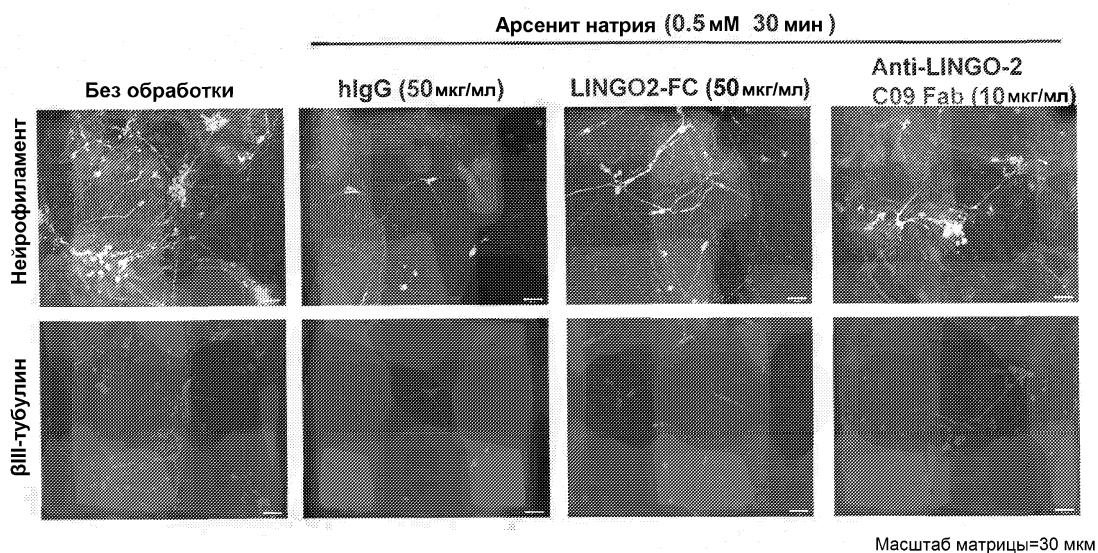
Фиг. 2

LINGO-2 в высокой степени экспрессируется в нейронах коры головного мозга и DRG нейронах



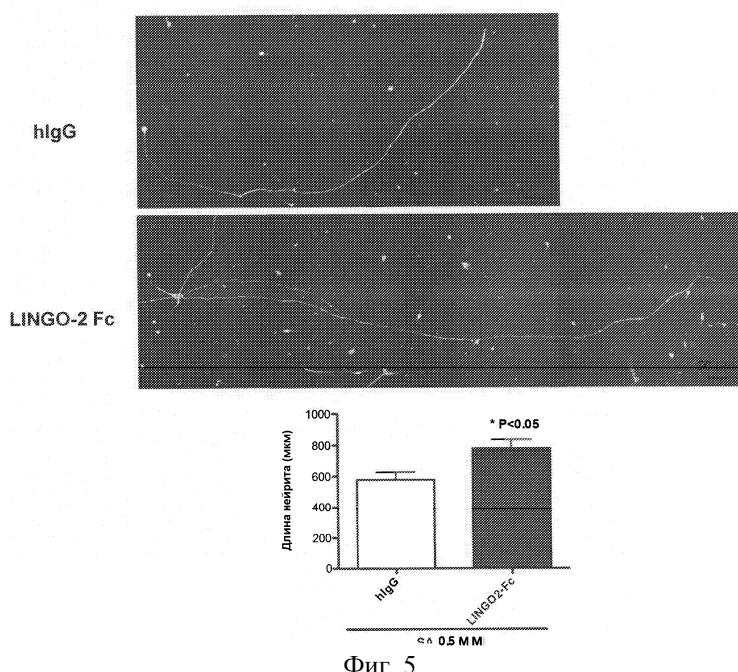
Фиг. 3

Блокирование LINGO-2 растворимым LINGO-2 или анти-LINGO-2 антителом способствует выживаемости двигательных нейронов человека



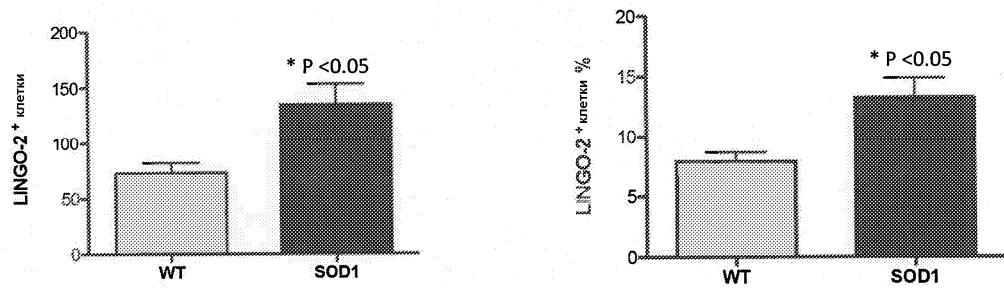
ФИГ. 4

Блокирование LINGO-2 растворимым LINGO-2 способствует росту аксонов двигательных нейронов



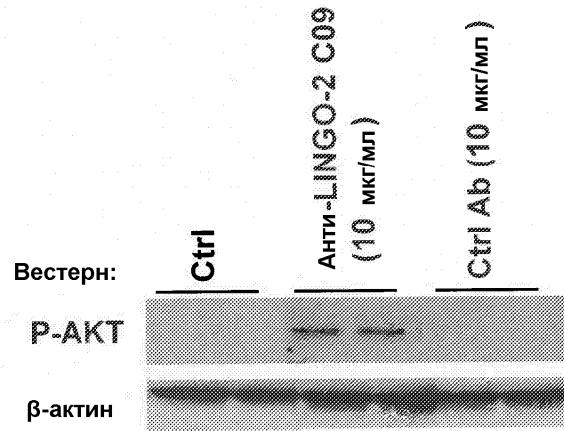
ФИГ. 5

Степень экспрессии LINGO-2 увеличивается у мышей,
определенная гибридизацией *in situ*



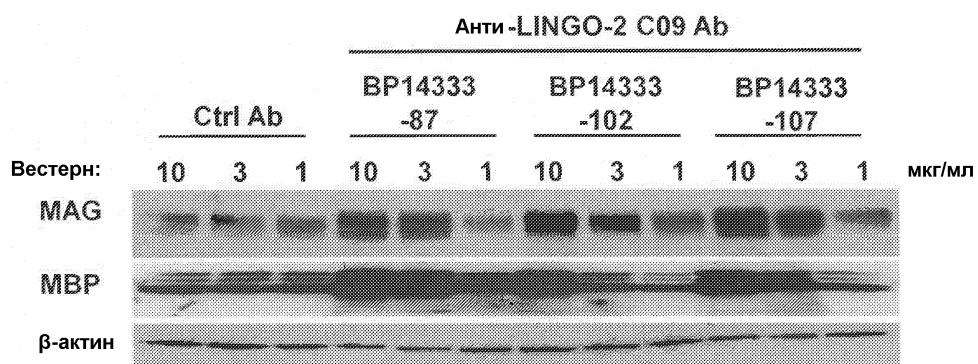
Фиг. 6

Блокирование LINGO-2 способствует выживаемости нейронов
положительной регуляцией фосфорилирования АКТ



Фиг. 7

Блокирование LINGO-2 стимулирует дифференциацию олигодендроцитов



Фиг. 8

