

PATENTOVÝ SPIS

(21) Číslo dokumentu

304224

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2001-1608**
(22) Přihlášeno: **05.11.1999**
(30) Právo přednosti:
06.11.1998 US 60/107446
(40) Zveřejněno: **17.10.2001**
(Věstník č. 10/2001)
(47) Oznámení o udělení ve věstníku: **15.01.2014**
(Věstník č. 3/2014)
(86) PCT číslo: **PCT/US1999/026160**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2000/031235**

(56) Relevantní dokumenty:
Spillmann A.A. et al: Identification and Characterization of a Bovine Neurite Growth Inhibitor (bNI-220), červenec 1998, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 273, 19283-19293; Cadelli D. S. et al: Oligodendrocyte- and myelin-associated inhibitors of neurite outgrowth: Their involvement in the lack of CNS regeneration 1992 EXPERIMENTAL NEUROLOGY 115, 189-192; SPILLMANN ADRIAN A. ET AL. 1997 EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSCIENCE, 9, 549-555, abstrakt, obr. 1.
WO 98/17687; 62448.

(73) Majitel patentu:
SCHWAB Martin E., Zurich, CH
CHEN Maio S., Zurich, CH

(72) Původce:
Schwab Martin E., Zurich, CH
Chen Maio S., Zurich, CH

(74) Zástupce:
JUDr. Zdeňka Korejzová, Spálená 29, Praha 1,
11000

(54) Název vynálezu:
Monoklonální protilátka

(57) Anotace:
Monoklonální protilátka, kde tato monoklonální protilátka se imunospecificky váže na čištěný protein, který je tvořený sekvencí aminokyselin s více než 90% identitou po celé délce se SEQ ID NO: 29 a je prostý jakéhokoliv myelinového materiálu centrálního nervového systému, s nímž je přirozeně spojen, pro použití jako léčivo.

CZ 304224 B6

Monoklonální protilátka

Oblast techniky

5

Vynález se týká monoklonální protilátky, která se imunospécificky váže na čišťený protein, který má více než 90% identitu sekvence se SEQ ID NO: 29. Tato monoklonální protilátka je určena pro použití jako léčivo.

10

Dosavadní stav techniky

V centrálním nervovém systému (CNS) vyšších obratlovců skoro nedochází po poranění k regeneraci axonů a strukturální plasticita je omezena. Je pravděpodobné, že inhibitory růstu spojené s myelinem CNS mají důležitou úlohu. Tato skutečnost se dokazuje monoklonálními protilátkami (mAb) IN-1, které neutralizují protein myelin, jenž silně inhibuje růst neuritů, čímž podněcuje po lézích mozku a míchy regeneraci axonů a zesiluje kompenzační plasticitu.

Řada pozorování *in vitro* a *in vivo* ukazuje nový aspekt regulace růstu neuritů, kterým je přítomnost repulzivních a inhibičních signálů a faktorů (popisuje se v publikaci Keunes and Cook, 1995, Curr. Opin. Neurosci. 5: 75–82). Zdá se, že většina těchto signálů jsou proteiny nebo glykoproteiny. Prvním důležitým úspěchem při identifikaci faktorů je izolace a klonování cDNA molekuly vyvolávající kolaps růstu neuronových konusů získaných z mozku kuřete, kterou je kolapsin-1 nazývaný také semaforin 3A.

25

Druhá skupina repulzivních řídicích molekul, které se nedávno izolovaly a klonovaly, jsou efriny. Jsou to ligandy pro rodinu Eph receptorových tyrozinových kináz. Efrin-A5 a efrin A2 se exprimují jako gradienty ve zrakovém tekutku kuřecího embrya a jejich ektopická exprese a delece způsobuje chyby růstu retinálních axonů. Podobně jako semaforiny také rodina efrinů má 15 až 20 členů, přičemž každý vykazuje komplexní a dynamickou expresi uvnitř a vně nervového systému. Funkce většiny z těchto molekul se musí ještě zkoumat.

30

Třetí skupinou řídicích faktorů, které mohou zabránit růstu axonů a exprimují se ve vyvíjejícím se nervovém systému jsou netriny. Netrin se izoloval jako chemoatraktant komisurálních axonů v časně fázi vývoje míchy podobně jako ortholog unc-6 mikroorganismu *C. elegans*. Netrin-1 naopak vykazuje repulzivní účinky v případě jistých typů neuronů v závislosti na typu receptoru přítomném na cílových neuronálních růstových konusech (Tessier-Lavigne et al., 1996, Science 274: 1123–33).

35

Dříve se silná inhibiční aktivita růstu neuritů spojená s oligodendrocyty a myelinem CNS dospělých jedinců popisuje v publikaci Canoni and Schwab, 1988, J. Cell Biol. 106: 1281–1288). Hlavní konstituent je membránový protein s vysokou molekulovou hmotností (NI-250, s menším komponentem NI-35, vyskytuje se u krys), který se nedávno izoloval a který je předmětnou věcí vynálezu a váže se na neutralizační monoklonální protilátky IN-1 (popisuje se v publikaci Canoni and Schwab, 1988, J. Cell Biol. 106: 1281–1288, patent US 5 684 133, US 5 250 414, přihláška PCT WO 93/00427).

45

Inhibitory růstu neuritů spojené s myelinem mají důležitou úlohu při prevenci tvorby porušených axonů CNS. Jestliže se u krys a kuřat blokuje vývoj oligodendrocytů a tvorba myelinu, pak se prodlouží regenerační permissivní doba následující po lézích CNS. Tvorba myelinu se shoduje s koncem období vývoje, kdy CNS vykazuje vysokou strukturální plasticitu a vysoký potenciál regenerace.

50

Je pravděpodobné, že molekuly NI-250 a NI-35 jsou hlavními komponenty inhibice růstu spojené s myelinem, což se může dokázat aplikací *in vivo* IN-1 při lézích míchy u dospělých krys, což

55

vyvolává regeneraci kortikospinálních axonů na velkou vzdálenost a umožňuje obnovení motorických funkcí a funkcí chování zvláště s ohledem na pohyb. Podobné experimenty se zrakovým nervem a cholinergní dráhou septo-hippocamu také demonstrují význam *in vivo* antigenu rozeznávaného protilátkou IN-1, což je NI-35/250 (popisuje se v publikaci Schnell and Schwab, 1990, Nature 343: 269–272, Bregman et al., 1995, Nature 378: 498–501).

Vláknité systémy, které nevykazují léze také odpovídají za neutralizaci inhibitorů růstu neuritů pomocí protilátek IN-1. Nedávné experimenty ukázaly, že po selektivní lézi kortikospinální dráhy (pyramidotomy) se v přítomnosti IN-1 neporušená vlákna tlačí skrz střední část míchy a mozkového kmene a tvoří bilaterální inervační patern doprovázený skoro plným navrácením funkcí chování a přesného pohybu (popisuje se v publikaci Z'Graggen et al., 1998, J. Neuroscience 18(12): 4744–4757).

Izolace genu, který kóduje protein inhibující růst neuritů poskytuje řadu možností pro vývoj produktů použitelných při regeneraci neuronů a při léčbě různých neurologických poruch, mezi něž patří také nádory.

Podstata vynálezu

Podstatu vynálezu tvoří monoklonální protilátka, kde tato monoklonální protilátka se imunospécificky váže na čištěný protein, který je tvořený sekvencí aminokyselin s více než 90% identitou po celé délce se SEQ ID NO: 29 a je prostý jakéhokoliv myelinového materiálu centrálního nervového systému, s nímž je přirozeně spojen, pro použití jako léčivo.

Vynález také popisuje způsob identifikace genů, které interagují s genem *Nogo*.

Gen *Nogo* je gen podle vynálezu identifikovaný způsobem podle vynálezu, který kóduje a interaguje s proteiny regulujícími růst neuronů.

Vynález také popisuje deriváty a analogy genu *Nogo* podle vynálezu, které jsou funkčně aktivní. To znamená, že jsou schopny vykazovat jednu nebo více funkčních aktivit spojených s přirozeně se vyskytujícím proteinem *Nogo*. Mezi aminokyselinami 542 až 722 se identifikovala hlavní inhibiční oblast. Takové funkční aktivity zahrnují, ale nejsou omezeny na neuritovou růstovou inhibici neurálních buněk, rozptýlení a migraci fibroblastů nebo libovolné buňky vykazující neoplastický růst, schopnost interagovat s proteiny regulujícími neurální růst nebo soutěžit o interakci s těmito proteiny, antigenicitu, což je schopnost vázat se (nebo soutěžit s proteinem *Nogo* o navázání) na protilátku vytvořenou proti proteinu *Nogo*, imunogenicitu, což je schopnost generovat protilátku, která se váže na protein *Nogo*. Tyto protilátky vykazují potenciál indukovat růst neuritů nebo předcházet poklesu růstu ganglií dorzálních kořenů čípku inhibiční funkce proteinu *Nogo* a jeho funkčních fragmentů nebo derivátů, které mají schopnost inhibovat růst neuritů.

Vynález dále popisuje fragmenty (a jeho deriváty a analogy) proteinu *Nogo*, které obsahují jednu nebo více oblastí proteinu *Nogo*, jako je kyselý a na prolin bohatý N-konec (například aminokyseliny 31 až 58 sekvence SEQ ID NO: 2), vysoce konzervativní C-konec a dva hydrofóbní pruhy tvořené 35 a 36 aminokyselinami krysího proteinu *Nogo*, které se vyskytují také na C-konci (například aminokyseliny 988 až 1 023 a 1 090 až 1 125 sekvence SEQ ID NO: 2).

Dále se popisují protilátky vytvořené proti různým proteinům *Nogo* a jejich derivátům a analogům. Získaly se dvě protilátky. První protilátka se nazývá AS 472 a získala se v případě, kdy se jako imunogen použil syntetický peptid odpovídající aminokyselinám 623 až 640 sekvence SEQ ID NO: 2 a sekundární protilátka, která se nazývá AS Bruna, se vytvořila proti C-konci, který obsahuje aminokyseliny 762 až 1 163 sekvence SEQ ID NO: 2 proteinu *Nogo*.

Popisují se také způsoby produkce proteinů Nogo, jeho derivátů a analogů, například rekombinantními způsoby.

5 Vynález také popisuje terapeutické a diagnostické způsoby a prostředky založené na proteinech Nogo a na jeho nukleových kyselinách. Terapeutické prostředky podle vynálezu zahrnují, ale nejsou omezeny na proteiny Nogo, jeho analogy a deriváty (zahrnují fragmenty), protilátky, nukleové kyseliny kódující proteiny Nogo, analogy nebo derivát a ribozymy Nogo nebo „antisense“ nukleové kyseliny.

10 Vynález také popisuje terapeutické a diagnostické metody a prostředky založené na proteinech Nogo a nukleových kyselinách a anti-Nogo protilátkách. Vynález popisuje léčbu nádorů CNS a neurálních nádorů aplikací sloučenin, které podporují aktivitu Nogo (například proteiny Nogo a jejich funkčně aktivní analogy a deriváty zahrnující jejich fragmenty, nukleové kyseliny kódující proteiny Nogo, jejich analogy nebo deriváty, agonisty proteinů Nogo).

15 Vynález dále popisuje léčbu onemocnění, poruch nebo poškození, které hlavně vedou k poškození nervového systému. Taková onemocnění, poruchy nebo poškození zahrnují, ale nejsou omezeny na traumata centrálního nervového systému (CNS) (například poranění míchy nebo mozku), infarkt, infekce, maligní nádory, působení toxických činidel, nedostatečnou výživu, paraneoplastické syndromy a degenerativní nervové onemocnění (zahrnující, ale není omezeno na Alzheimerovu nemoc, Parkinsonovu nemoc, Huntingtonovu choreu, roztroušenou sklerózu, amyotrofní laterální sklerózu a progresivní supranukleární paralýzu) aplikací sloučenin, které interferují s aktivitou Nogo (například dominantní negativní derivát proteinu Nogo, protilátky proti proteinu Nogo, „antisense“ nukleové kyseliny genu *Nogo*, ribozymy *Nogo* a chemické skupiny, které se
20
25 vážou na aktivní místo proteinu Nogo).

Vynález dále popisuje zvířecí modely, diagnostické metody a testovací metody vhodné pro zjišťování dispozic pro vhodné poruchy a způsoby identifikace a hodnocení agonistů a antagonistů proteinu Nogo.

30 Definice

Podtržený nebo italikou napsaný název genu indikuje gen, naopak jím kódovaný proteinový produkt je označen jménem napsaným normálním písmem. Termín „*Nogo*“ znamená gen *Nogo*,
35 zatímco termín „Nogo“ označuje proteinový produkt genu *Nogo*.

Vynález popisuje nukleotidové sekvence genů *Nogo* a aminokyselinové sekvence jimi kódovaných proteinů. Vynález dále popisuje fragmenty, jejich deriváty a analogy proteinů Nogo. Vynález dále popisuje nukleové kyseliny kódující takové fragmenty nebo deriváty. Vynález popisuje
40 geny *Nogo* a jejich kódované proteiny řady různých druhů. Geny *Nogo* podle vynálezu zahrnují lidský, krysí a bovinní gen *Nogo* a příbuzné geny (homology) v jiných druzích. Vynález také popisuje bovinní subsekvence doložené v publikaci Spillman et al., 1998, J. Biol. Chem. 273: 19 283 – 19293. Ve specifických provedeních geny *Nogo* a proteiny pocházejí z obratlovců nebo zvláště ze savců. V preferovaném provedení vynálezu geny *Nogo* a jejich proteiny jsou lidského
45 původu. Vynález dále popisuje produkci následujících proteinů a derivátů, například metodami rekombinace.

Vynález popisuje gen *Nogo*, molekuly nukleových kyselin kódující tři izofomy proteinu Nogo jmenovitě pak protein Nogo A, Nogo B a Nogo C. Gen *Nogo* zahrnuje molekuly nukleové kyseliny kódující všechny tři izofomy, pokud není uvedeno jinak. Protein Nogo zahrnuje všechny tři izofomy proteinu Nogo, není-li uvedeno jinak. Proteiny Nogo podle vynálezu mohou předcházet regeneraci neuronů v míše nebo mozku (to je nepermissivní vlastnosti substrátu), inhibovat růst neuritů ganglií dorzálních kořenů, indukovat zpomalení růstu konusu ganglií dozálních kořenů, blokovat rozšíření buněk NIH 3T3, blokovat růst neuritů PC12 atd.

55

Proteiny Nogo, jejich fragmenty a deriváty neobsahují žádný myelinový materiál centrálního nervového systému. Zvláště pak neobsahují žádný myelinový materiál centrálního nervového systému, se kterým je protein Nogo přirozeně spojen. Takový materiál může zahrnovat jiné myelinové proteiny CNS, lipidy a uhlovodíky. Upřednostňuje se, aby proteiny Nogo, jejich fragmenty a deriváty podle vynálezu také neobsahovaly žádná činidla používaná při izolaci z biologického materiálu, jako jsou například detergenty.

Ve specifickém provedení podle vynálezu se popisují rekombinantní proteiny, jejich fragmenty a deriváty připravené metodami podle vynálezu, jako je exprese genu *Nogo* v geneticky upravené buňce.

Vynález také zahrnuje deriváty Nogo a analog podle vynálezu, které jsou funkčně aktivní. To znamená, že jsou schopny vykazovat jednu nebo více známých funkčních aktivit spojených s plnou délkou proteinu Nogo (divoký typ). Takové funkční aktivity zahrnují, ale nejsou omezeny na schopnost interagovat (nebo soutěžit s navázáním) s regulačními proteiny neurálního růstu, antigenicitou (schopnost vázat se /nebo soutěžit s Nogo o navázání) na anti-Nogo protilátky/, imunogenicitou (schopnost vytvořit protilátky, které se váží na Nogo), předcházet regeneraci neuronů v míše nebo v mozku, propůjčit substrátu vlastnost omezení růstu, rozšíření a migrace neurálních buněk a neoplastických buněk, inhibici růstu neuritů ganglií dorzálních kořenů, vyvolání zpomalení růstu konusu ganglií dorzálních kořenů, blokování rozšíření *in vitro* buněk NIH 3T3, blokování růstu neuritů PC12, restrikci neurální plasticity atd.

Vynález dále popisuje fragmenty (jejich deriváty a analogy) proteinu Nogo, které obsahují jednu nebo více oblastí proteinu Nogo.

Popisují se protilátky proti proteinu Nogo, jeho deriváty a analogy.

Vynález dále popisuje terapeutické a diagnostické metody a prostředky založené na proteinech Nogo a nukleových kyselinách a anti-Nogo protilátkách. Vynález popisuje léčbu poruch růstu regulovaných buněk nebo orgánů aplikací sloučenin, které podporují aktivitu Nogo (například proteiny Nogo a funkčně aktivní analogy a jejich deriváty (zahrnující fragmenty), nukleové kyseliny kódující proteiny Nogo, analogy nebo deriváty, nebo agonisty proteinu Nogo).

Vynález také popisuje metody léčby poškození nebo poruchy nervového systému aplikací sloučenin, které antagonizují nebo inhibují funkci proteinu Nogo (například protilátky, antisense nukleové kyseliny Nogo, antagonistické deriváty proteinu Nogo).

Vynález také popisuje zvířecí modely, diagnostické metody a testovací metody vhodné pro stanovení predispozice k poruchám.

Izolace genů *Nogo*

Vynález popisuje nukleotidové sekvence genů *Nogo* nebo nukleové kyseliny. V jednom provedení vynálezu nukleové kyseliny *Nogo* obsahují sekvence krysí cDNA uvedené na obrázku č. 2a (SEQ ID NO: 1) označené jako Nogo A, jak je zobrazeno na obrázku č. 1b nebo jejich kódující oblasti nebo nukleotidové sekvence kódující protein Nogo obsahující 1 163 aminokyselin nebo jeho libovolný funkční fragment nebo derivát (například protein vykazující sekvenci SEQ ID NO: 2, jak je zobrazeno na obrázku č. 2a).

V jiném provedení vynálezu nukleové kyseliny *Nogo* obsahují nukleovou sekvenci kódující protein Nogo B, zatímco protein Nogo B je ekvivalentní s 172 aminokyselinami N-konce fúzovanými s 188 aminokyselinami C-konce proteinu Nogo A, přičemž vzniká zkrácený protein obsahující 360 aminokyselin. Transkripty proteinu Nogo B vznikly jako výsledek alternativního sestřihu, který odstraní intervenující nukleotidovou kódující sekvenci.

V dalším provedení vynálezu nukleové kyseliny *Nogo* obsahují nukleotidové sekvence kódující protein Nogo C, zatímco protein Nogo C obsahuje na svém N-konci 11 aminokyselin, které nejsou přítomny v proteinu Nogo a 188 aminokyselin C-konce proteinu Nogo A a B. Protein Nogo C obsahuje 199 aminokyselin. Transkript kódující Nogo C je výsledkem transkripce z alternativního promotoru Nogo.

V jiném specifickém provedení vynálezu se popisují sekvence nukleových kyselin bovinního Nogo (SEQ ID NO: 28).

V jiném provedení vynálezu se popisují nukleotidové sekvence kódující lidský protein Nogo a fragmenty lidských proteinů Nogo zahrnující lidské ekvivalenty s krysím proteinem Nogo A, Nogo B a Nogo C. Sekvence nukleové kyseliny Nogo se objasnila za použití transkriptu kryšeho Nogo A jako templátu a sestřihávají dohromady lidskou exprimovanou sekvenci tags (EST), aby vznikla kontinuální nukleotidová sekvence. Krysí a bovinní aminokyselinové sekvence Nogo také poskytují informace o správném translačním čtecím rámci tak, že se dedukovala aminokyselinová sekvence lidského Nogo. Vynález také popisuje aminokyselinové sekvence fragmentů lidského genu *Nogo*.

Vynález také popisuje izolované nukleové kyseliny alespoň 8 nukleotidů (to je hybridizovatelná část) sekvence *Nogo*. V jiném provedení nukleové kyseliny obsahují alespoň 25 (kontinuálních) nukleotidů, 50 nukleotidů, 100 nukleotidů, 150 nukleotidů, 200 nukleotidů, 500 nukleotidů, 700 nukleotidů nebo 800 nukleotidů sekvence genu *Nogo* nebo kódující sekvence *Nogo* plné délky. V jiném provedení vynálezu nukleové kyseliny jsou menší než 35 000 nebo 500 nukleotidů. Nukleová kyselina může být jedno- nebo dvouřetězcová. Vynález dále popisuje nukleové kyseliny hybridizovatelné nebo komplementární s dále v textu uvedenými sekvencemi. Vynález popisuje nukleové kyseliny, které obsahují sekvenci komplementární s alespoň 10, 25, 50, 100 nebo 200 nukleotidy nebo kódující oblast genu *Nogo*.

Specifické provedení vynálezu popisuje nukleovou kyselinu, která hybridizuje s nukleovou kyselinou *Nogo* (má například sekvenci SEQ ID NO: 2, obrázek č. 2a) nebo s nukleovou kyselinou kódující derivát Nogo za málo přísných podmínek. Postupy při kterých se používá takových málo přísných podmínek se popisují v publikaci Shilo and Weinberg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 6 789–6 792 a jsou následující: Filtry obsahující DNA se předem ošetřily po dobu 6 hodin při teplotě 40 °C v roztoku, který obsahuje 35 % formamid, 5x SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM EDTA, 0,1 % PVP, 0,1 % fikol 1 % BSA a 500 µg/ml denaturované DNA spermatu lososa. Hybridizace probíhá ve stejném roztoku s následující modifikací: 0,02 % PVP, 0,02 % fikolu, 0,2 % BSA, 100 µg/ml DNA spermatu lososa, 10 % (hmotnost/objem) sulfátu dextranu a použije se 5 až 20 x 10⁶ cpm sondy značené ³²P. Filtry se inkubovaly v hybridizační směsi po dobu 1,5 hodiny při teplotě 60 °C. Filtry se přenášely suchým způsobem a podrobily se autoradiografii. Jestliže je to nezbytné, filtry se promyly třikrát při teplotě 65 až 68 °C a znovu se exponoval film. Další podmínky při nízké přísnosti jsou dobře známé v oboru (například jak se používá při hybridizaci mezi specie, jak se popisuje shora v textu).

V jiném specifickém provedení vynálezu se popisuje nukleová kyselina, která je hybridizovatelná s nukleovou kyselinou *Nogo* za podmínek s vysokou přísností. Postupy, při kterých se používají takové přísné podmínky jsou následující: Prehybridizace filtrů obsahující DNA probíhá po dobu 8 hodin přes noc při teplotě 65 °C v pufru, který se skládá z 6x koncentrovaného roztoku SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 0,2 % PVP, 0,02 % fikol, 0,02 % BSA a 500 µg/ml DNA spermatu lososa. Filtry se hybridizovaly po dobu 48 hodin při teplotě 65 °C v prehybridizační směsi, která obsahuje 100 µg/ml denaturované DNA spermatu lososa a 5 až 20x10⁶ cpm sondy značené ³²P. Promývání filtrů se provedlo při teplotě 37 °C po dobu jedné hodiny v roztoku, který obsahuje 2x koncentrovaný SSC, 0,01 % PVP, 0,01 % fikol a 0,01% BSA. Pak následuje promytí v pufru 0,1x koncentrovaném SSC při teplotě 50 °C po dobu 45 minut a pak následuje autoradiografie. Dále se mohou použít jiné podmínky s vysokou přísností, které jsou dobře známy v oboru.

V jiném specifickém provedení vynálezu se popisuje nukleová kyselina, která může hybridizovat s nukleovou kyselinou *Nogo* za podmínek upravené přísnosti. Postupy za použití takových podmínek upravené přísnosti jsou následující. Filtry obsahující DNA se předem ošetřovaly po dobu 6 hodin při teplotě 55 °C v roztoku, který obsahuje 6x koncentrovaný SSC, 5x koncentrovaný Denhartův roztok, 0,5 % SDS a 100 µg/ml denaturované DNA spermatu lososa. Hybridizace se provedly ve stejném roztoku a použila se sonda 5 až 20 x 10⁶ cpm značená ³²P. Filtry se inkubovaly v hybridizační směsi po dobu 18 až 20 hodin při teplotě 55 °C a pak se promyly dvakrát po dobu 30 minut při teplotě 60 °C v roztoku obsahujícím 1x koncentrovaný SSC a 0,1 % SDS. Filtry se pak přenesly suchým způsobem a vystavily se autoradiografii. Jiné podmínky upravené přísnosti, které se mohou použít jsou dobře známy v oboru. Promývání filtrů se provedlo při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny v roztoku, který obsahuje 2x koncentrovaný roztok SSC, 0,1 % SDS. Takové přísné podmínky jsou vhodné pro izolaci molekul nukleové kyseliny obsahující sekvence genu *Nogo* u jiného druhu, například za použití krysích nebo bovinních klonů cDNA *Nogo*, jako sondu pro izolaci lidské cDNA *Nogo*.

Řada lidských exprimovaných značících sekvencí (EST) popisovaných v publikované databázi sekvence nukleové kyseliny vykazuje vysoký stupeň shody sekvence ve srovnání se segmenty sekvencí genu *Nogo* podle vynálezu. Identifikoval se předběžný seznam lidského ETS a jsou uvedeny přístupová čísla v Genbank: AA158636 (SEQ ID NO: 35), AA333267 (SEQ ID NO: 36), AA081783 (SEQ ID NO: 37), AA167765 (SEQ ID NO: 38), AA322918 (SEQ ID NO: 39), AA092565 (SEQ ID NO: 40), AA081525 (SEQ ID NO: 41) a AA081840 (SEQ ID NO: 42) za použití ENTREZ Nucleotide Query. Před tímto vynálezem nikdo necharakterizoval shora v textu uvedené EST s ohledem na aminokyselinové sekvence, které uvedené EST mohou kódovat *in vivo*. Nic není známo o funkci proteinů, které obsahují předpovězené aminokyselinové sekvence lidským EST. Dále EST, jako je AA158636, které souhlasí s 5'koncem cDNA *Nogo* a jiným EST nebo AA081840, který souhlasí s 3 koncem krysí cDNA nepřesahuje a není chápána jako součást stejné sekvence lidské cDNA.

Založeno na sekvencích genu *Nogo* podle vynálezu se věří, že tyto lidské EST reprezentují části lidského genu *Nogo*, které se exprimují v tkáni, ze které se získal EST. Vynález dále popisuje molekuly nukleové kyseliny obsahující dvě nebo více shora identifikovaných lidských EST. EST se mohou exprimovat ve stejné lidské tkáni nebo v jiných lidských tkáních. Upřednostňuje se, aby molekuly nukleové kyseliny podle vynálezu obsahovaly nukleotidové sekvence alespoň dvou lidských EST, které se vzájemně nepřekrývají nebo se nepřekrývají s třetím ani dalším lidským EST.

Protože shora v textu identifikované lidské EST se nyní identifikovaly jako fragmenty lidského genu *Nogo*, což se provedlo klonováním nukleových kyselin. Uvažuje se, že lidské EST má podobné funkce ve srovnání s jinými molekulami nukleových kyselin *Nogo* při různých metodách podle vynálezu, jako je například exprese lidských polypeptidů *Nogo*, hybridizační testy a inhibice exprese *Nogo* jako molekul antisense nukleové kyseliny atd.

Vynález však poskytuje a zahrnuje předpokládanou aminokyselinovou sekvenci lidského proteinu *Nogo* a jeho fragmenty. Jak je zobrazeno na obrázku č. 13, aminokyselinová sekvence krysího proteinu *Nogo* (obrázek č. 2a, SEQ ID NO: 2) se uspořádává s předpokládanou aminokyselinovou sekvencí lidského proteinu *Nogo* (obrázek č. 13, SEQ ID NO: 29). Vynález popisuje lidské proteiny *Nogo* obsahující předpokládanou aminokyselinovou sekvenci lidského proteinu *Nogo*, obrázek č. 13 a SEQ ID NO: 29 nebo subsekvence předpokládané aminokyselinové sekvence lidského *Nogo*, který obsahuje alespoň aminokyselinové zbytky nebo jeden nebo více následujících předpokládaných aminokyselinových sekvencí lidských fragmentů *Nogo*. Jsou to MEDLDQSPLVSSS (lidský protein *Nogo*, odpovídající aminokyselinám 1 až 13 se sekvencí SEQ ID NO: 43), KIMDLKEQPGNTISAG (lidský protein *Nogo* odpovídající aminokyselinám 187 až 203 se sekvencí SEQ ID NO: 44), KEDEVVSSEKAKDSFNEKR (lidský protein *Nogo* odpovídající aminokyselinám 340 až 358 se sekvencí SEQ ID NO: 45), QESLYPAAQLCPS-

FESEATPSPVLPDIVMEAPLNSAVPSAGASVIQPS (lidský protein Nogo odpovídající aminokyselinám 570 až 619) se sekvenci SEQ ID NO: 46). Přirozeně se vyskytující lidský protein Nogo a rekombinantní lidský protein Nogo a jeho fragmenty mají aminokyselinovou sekvenci v podstatě podobnou aminokyselinovým sekvencím, jak se popisují shora v textu a jsou schopny se vázat na protilátky řízené proti proteinu Nogo podle vynálezu.

Vynález dále popisuje molekuly nukleové kyseliny, které kódují lidský protein Nogo, který má aminokyselinovou sekvenci v podstatě podobnou aminokyselinové sekvenci zobrazené na obrázku č. 13 (obrázek č. 13, SEQ ID NO: 29). Ve specifickém provedení vynálezu molekuly nukleové kyseliny kódující fragmenty lidského proteinu Nogo mají aminokyselinovou sekvenci v podstatě podobnou aminokyselinové sekvenci, jak je zobrazeno na obrázku č. 13 (SEQ ID NO: 29) s tou výjimkou, že takové molekuly nukleové kyseliny neobsahují nukleotidovou sekvenci shora identifikovaných lidských EST.

Aminokyselinová sekvence se zdá být v podstatě podobná předpokládané aminokyselinové sekvenci lidského proteinu Nogo, když více než 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % nebo 97 % aminokyselinových zbytků ve dvou molekulách je shodných, když se použije počítačový algoritmus, kde uspořádání se provede počítačovým programem, který je dobře znám v oboru například když se použije vyhledávací program BLAST (popisuje se v publikaci Altschul et al., 1994, Nature Genet. 6: 119–129).

Použitelné počítačové homologické programy zahrnují: program „Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (www.ncbi.nlm.nih.gov) (popisuje se v publikaci Altschul et al., 1990, J. of Molec. Biol., 215: 403–410, „The BLAST Algorithm“, Altschul et al., 1997, Nuc. Acids. Res. 25: 3 389–3 402) heuristický vyhledávací algoritmus určený pro vyhledávání podobnosti sekvencí. V publikaci Karlin and Altschul 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 2 264–68, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5 873 – 77 se popisuje důležitost statistických metod. Pět specifických programů plní následující úkoly:

- 1) Program BLASTP porovnává aminokyselinovou sekvenci s databází proteinových sekvencí.
- 2) Program BLASTN porovnání šesti rámcové pojmové translační produkty nukleotidové zkoumané sekvence (oba řetězce) s databází nukleotidových sekvencí.
- 3) Program BLASTX porovnává šesti rámcové pojmové translační produkty nukleotidové zkoumané sekvence (oba řetězce) s databází proteinových sekvencí.
- 4) Program BLASTN porovnává proteinovou zkoumanou sekvenci s databází nukleotidových sekvencí přeložených do všech šesti čtecích rámců (oba řetězce).
- 5) Program BLASTX porovnává šestirámcové translace nukleotidové zkoumané sekvence se šesti rámcovými translacemi nukleotidové sekvenci databáze.

Program BLASTN se používá pro identifikaci nukleových kyselin s požadovaným procentem shody a program BLASTP se může zvláště použít k identifikaci aminokyselinových sekvencí s požadovaným procentem shody.

Smith–Waterman (databáze: European Bioinformatics Institute www.ebi.ac.uk/bic-sw/) (popisuje se v publikaci Smith–Waterman, 1981, J. of Molec. Biol., 147: 195–197) je matematicky rigorózní algoritmus vhodný pro uspořádání sekvencí.

FASTA (popisuje se v publikaci Pearson et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 2 444–2 448) je heuristické přiblížení Smith–Watermanovu algoritmu. V případě obecné diskuse postupu a výhod algoritmů BLAST, Smith–Waterman a FASTA (popisuje se v publikaci Nicholas et al., 1998, „A Tutorial on Searching Sequence Databases and Sequence Scoring Methods“ (www.psc.edu)).

Použití předpokládaných aminokyselinových sekvencí lidského proteinu Nogo nebo nukleotidových sekvencí lidského EST zahrnující vytvoření sekvence kódující předpokládanou aminokyselinovou sekvenci lidského Nogo použitelnou pro izolaci a identifikaci lidského genu *Nogo*, fragmentů přirozeně se vyskytujících mutantů a jejich variant. Takové použití, které je známé v oboru, zahrnuje, ale není omezeno na použití informace pro přípravu sond nukleové kyseliny pro testování knihovny DNA, amplifikaci DNA, genetickému testování lidské populace a pro přípravu syntetických peptidů pro vytvoření protilátek. Dále v textu se popisují taková použití.

Popisují se nukleové kyseliny kódující deriváty a analogy proteinů Nogo a antisense nukleových kyselin *Nogo*. Je zřejmé, že termín „nukleová kyselina kódující fragment nebo část proteinu Nogo“ je nukleová kyselina kódující pouze tento uvedený fragment nebo část proteinu Nogo a nikoli jiné kontinuální části proteinu Nogo jako kontinuální sekvenci. V tomto kontextu část znamená jednu nebo více aminokyselin.

Vynález také popisuje fragmenty nukleových kyselin *Nogo* obsahující oblasti konzervativní mezi (vykazující homologii s) jinými nukleovými kyselinami *Nogo* stejného nebo odlišného druhu. Nukleové kyseliny kódující jeden nebo více oblastí *Nogo* jsou zobrazeny na obrázku č. 2a. Je to například konzervativní oblast C–konce krysího proteinu Nogo, která obsahuje přibližně 180 aminokyselin a je kódována přibližně 540 nukleotidy kódující sekvence před stop kodonem. Také se popisují nukleotidové a aminokyselinové sekvence dvou hydrofóbních oblastí v konzervativní oblasti C–konce, to znamená od aminokyselin 988 do 1 023 a od aminokyseliny 1 090 do 1 125 v krysím proteinu Nogo A. Dále se popisují nukleotidové a aminokyselinové sekvence kyselých oblastí N–konce krysího proteinu Nogo A od zbytku 31 do zbytku 58.

Aby se uskutečnila funkční analýza různých oblastí proteinu Nogo, provedla se série delecí v genu *Nogo* a ten se klonoval do expresivního vektoru metodou rekombinace DNA a exprimoval se jako fúzní protein. Popisují se nukleové kyseliny, které kódují fragment proteinu Nogo. Jsou to například nukleové kyseliny, které kódují aminokyselinové zbytky 1 až 171, 172 až 974, 259 až 542 až 722, 172 až 259, 722 až 974 nebo 975 až 1 1562 SEQ ID NO: 2 nebo jejich kombinace a nukleové kyseliny, které kódují aminokyselinové zbytky 1 až 131, 132 až 939, 206 až 501, 501 až 680, 132 až 206, 680 až 939 a 940 až 1 127 SEQ ID NO: 30 nebo jejich kombinace. Některé deleční konstrukce obsahují zkrácené části proteinu Nogo a další nukleotidové sekvence kódující hexahistidinovou značku a/nebo T7–tag. Vynález popisuje nukleové kyseliny kódující zkrácené proteiny Nogo, kterým chybí aminokyselinové zbytky 172 až 259, aminokyselinové zbytky 974 až 1 162 nebo aminokyselinové zbytky 172 až 259 a 974 až 1 162 sekvence SEQ ID NO: 2, ale v jiném případě obsahuje zbytek sekvence SEQ ID NO: 2 nebo aminokyselinové zbytky 132 až 206, aminokyselinové zbytky 939 až 1 127 nebo aminokyselinové zbytky 132 až 206 a 939 až 1 127 sekvence SEQ ID NO: 30, ale v jiném případě obsahuje zbytek sekvence SEQ ID NO: 30. Struktura příkladu delečních konstrukcí je zobrazena na obrázku č. 18. Deleční konstrukce, když se zavedou do buňky produkují fragmenty nebo zkrácené části proteinu Nogo. Biologické aktivity těchto mutantů se testovaly v různých funkčních testech, jak se popisuje v tabulce č. 2.

Specifická provedení klonování genu *Nogo* jsou následující:

V případě exprese klonů (metoda běžně známá v oboru) se zkonstruovala expresní knihovna metodami, které jsou dobře známy v oboru. Izolovala se například mRNA (lidská), vytvořila se cDNA a ligovala do expresivního vektoru (například odvozeného z bakteriofága) tak, že je možné ji exprimovat v hostitelské buňce, do které se pak vektor zavede. Aby se vybral exprimovaný produkt Nogo je možné použít různé testy. V jednom provedení vynálezu se při selekci mohou použít protilátky proti proteinu Nogo.

V jiném provedení vynálezu se před selekcí při amplifikaci požadované sekvence v genomové knihovně nebo v knihovně cDNA použije polymerázová řetězcová reakce (PCR). Oligonukleotidové primery reprezentující známé sekvence *Nogo* se mohou použít jako primery při reakci PCR. V preferovaném provedení oligonukleotidové primery reprezentují alespoň část konzervativních segmentů Nogo se silnou homologií mezi geny *Nogo* různých druhů. Syntetické oligonukleotidy

se mohou využívat jako primery při amplifikaci PCR sekvencí ze zdroje (RNA nebo DNA), přičemž se upřednostňuje knihovna cDNA. PCR se provedla například za použití teplotního cyklovače Perkin–Elmer Cetus a Taq polymerázy (Gene Amp™). DNA, která se může amplifikovat, zahrnuje mRNA nebo cDNA nebo genomovou DNA z libovolných eukaryontů. Je možné syntetizovat několik různých degenerativních primerů, které jsou vhodné pro použití v reakcích PCR. Je také možné měnit přísnost podmínek hybridizace při navázání v reakcích PCR, což umožňuje dosažení vyššího nebo nižšího stupně podobnosti mezi známou nukleotidovou sekvencí *Nogo* a homologem nukleové kyseliny, která se má izolovat. Při hybridizaci, která se provádí mezi jednotlivými druhy, se preferují mírně přísné podmínky.

Po úspěšné amplifikaci segmentu homologue *Nogo*, segment se může molekulárně klonovat a sekvenovat a využívat jako sonda při izolaci celkové cDNA nebo genomového klonu. To naopak umožní stanovení celé nukleotidové sekvence genu, analýzu její exprese a produkci jejího proteinového produktu při funkční analýze, jak se popisuje dále v textu. Tímto způsobem se mohou identifikovat další geny kódující proteiny *Nogo* a jejich analogy.

Shora v textu popsané metody neomezují následující obecný popis metod, které umožňují získání klonů *Nogo*.

Libovolná eukaryontní buňka může sloužit jako zdroj nukleové kyseliny pro molekulární klonování genu *Nogo*. Sekvence nukleové kyseliny kódující protein *Nogo* se mohou izolovat z obratlovce, savce, člověka, prasete, myši, skotu, kočky, ptáka, koně, psa stejně jako z primáta nebo hmyzu atd. DNA se může získat standardním postupem, který je dobře znám v oboru, z klonované DNA (například z knihovny DNA), chemickou syntézou, klonováním cDNA nebo klonováním genomické DNA nebo jejích fragmentů, které se získaly izolací z požadované buňky (popisuje se na příklad v publikaci Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, Glover, D. M. (ed.), 1985, DNA Cloning: A Particular Approach, MRL Press, Ltd., Oxford, U.K. Vol. I, II). Klony odvozené z genomové DNA mohou vedle kódujících oblastí obsahovat regulační a intronové oblasti DNA. Klony získané z cDNA budou obsahovat pouze exonové sekvence. Nehledě na zdroj se gen může molekulárně klonovat do vhodného vektoru za účelem propagace genu.

Při molekulárním klonování genu z genomové DNA se vytvořily genomové fragmenty, kdy některý z nich bude kódovat požadovaný gen. DNA se může štěpit ve specifických místech za použití různých restričních enzymů. V jiném případě se může použít DNáza v přítomnosti manganu, přičemž dojde k fragmentaci DNA nebo DNA se může fyzikálně nastříhat, například sonikací. Lineární fragmenty DNA se pak mohou separovat podle velikosti standardní metodou, která zahrnuje elektroforézu na agarózovém a polyakrylamidovém gelu a kolonovou chromatografii.

Po té, co se vytvořily fragmenty DNA, může se provést identifikace specifického DNA fragmentu, který obsahuje požadovaný gen, řadou způsobů. Jestliže například množství části genu *Nogo* (libovolného druhu) nebo jeho specifické RNA nebo jeho fragment jsou dostupné a mohou se čistit a značit, vytvořené fragmenty DNA se mohou testovat hybridizací nukleové kyseliny značenou sondou (popisuje se v publikaci Benton, W. and Davis, R., 1977, Science 196: 180, Grunstein, M. and Hogness, D., 1975, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 3961). Tyto fragmenty DNA budou hybridizovat se sondou s podstatnou homologií. Je také možné identifikovat vhodný fragment štěpením restričním enzymem a porovnat velikost fragmentů s těmi, které se očekávaly podle známé restriční mapy, v případě, že je taková mapa dostupná. Další selekce se může provést na základě vlastností genu.

V jiném případě se přítomnost genu může detekovat testy založenými na fyzikálních, chemických nebo imunologických vlastnostech svého exprimovaného produktu. Mohou se vybrat klony cDNA nebo DNA, které produkují protein, který například vykazuje podobnou nebo identickou elektroforetickou migraci, izoelektrickou fokusující reakci, mapy proteolytického štěpení, post–

translační úpravy, kyselá a bazická vlastnosti nebo antigenní vlastnosti, které jsou známy v případě proteinu Nogo. Protilátky proti proteinu Nogo jsou dostupné a jsou to IN-1 a IN-2 (patent US 5 684 133), AS Bruna a AS 472. Příprava protilátek AS Bruna a AS 472 se popisují dále v textu. Protein Nogo se může identifikovat navázáním značené protilátky na putativně syntetizující klony Nogo v testu ELISA nebo western přenosem čistěných nebo celobuněčných extraktů.

Může se také identifikovat gen *Nogo* selekcí mRNA hybridizací nukleové kyseliny, která následuje po translaci *in vitro*. Při tomto postupu se používají fragmenty pro izolaci komplementární mRNA pomocí hybridizace. Takové fragmenty DNA mohou reprezentovat dostupnou izolovanou DNA *Nogo* jiných druhů (například myši, lidská). Imunoprecipitační analýza nebo funkční testy (například schopnost tvorby agregátů *in vitro*, navázání na receptor) translačních produktů *in vitro* izolovaných produktů izolované mRNA identifikuje mRNA a komplementární fragmenty DNA, které obsahují požadované sekvence. Navíc specifická mRNA se může vybrat na základě adsorpce polyzomů izolovaných z buněk, aby se imobilizovaly protilátky specificky řízené proti proteinu Nogo. Radioaktivně značená cDNA *Nogo* se může syntetizovat za použití vybrané mRNA (z adsorbovaných polyzomů) jako templát. Radioaktivně značená mRNA nebo cDNA se může pak použít jako sonda při identifikaci fragmentů DNA *Nogo* mezi jinými fragmenty genomové DNA.

Alternativy pro izolaci genomové DNA *Nogo* zahrnují, ale nejsou omezeny na chemickou syntézu samotné genomové sekvence ze známé sekvence nebo vytvořením cDNA z mRNA, která kóduje protein Nogo. RNA vhodná pro klonování cDNA genu *Nogo* se může izolovat z buněk, které exprimují *Nogo*. Je možné použít i jiné metody podle vynálezu.

Identifikovaný a izolovaný gen se pak může začlenit do vhodného klonovacího vektoru. Může se použít velký počet systémů vektor–hostitel, které jsou známy v oboru. Možné vektory zahrnují, ale nejsou omezeny na plazmidy nebo upravené viry, ale vektorový systém musí být kompatibilní s použitou hostitelskou buňkou. Takové vektory zahrnují, ale nejsou omezeny na bakteriofágy, jako jsou deriváty lambda nebo plazmidy, jako jsou deriváty plazmidu pBR322 nebo pUC nebo vektor Bluescript (Stratagene). Ve specifickém příkladu vynálezu se gen *Nogo* klonuje do pcDNA3 s epitopem tag, čímž se zjednoduší analýza exprese proteinu.

Začlenění do klonovacího vektoru se může například uskutečnit ligací fragmentu DNA do klonovacího vektoru, který má komplementární kohezivní konec. Jestliže však komplementární restrikční místa používaná ve fragmentu DNA nejsou přítomny v klonovacím vektoru, pak konce molekul DNA se mohou enzymaticky upravit. V jiném případě libovolné požadované místo se může produkovat ligací nukleotidových sekvencí (linkerů) na konec DNA. Tyto ligované linkery mohou obsahovat specificky chemicky syntetizované oligonukleotidy kódující sekvence, které rozeznávají restrikční endonukleázy. Při alternativní metodě se štěpený vektor a gen *Nogo* může modifikovat homopolymérním zakončením. Rekombinantní molekuly se mohou zavést do hostitelských buněk prostřednictvím transformace, transfekce, infekce, elektroporace atd., tak, že se vytvoří řada kopií genomových sekvencí.

Při jiné metodě se požadovaný gen může identifikovat a izolovat po začlenění do vhodného klonovacího vektoru pomocí „děla“. Obohacení požadovaným genem například frakcionací podle velikosti se může provést před začleněním do klonovacího vektoru.

Ve specifickém provedení vynálezu transformace hostitelských buněk rekombinantních molekul DNA, které začleňují izolovaný gen *Nogo*, cDNA nebo syntetizovanou sekvenci DNA umožňuje vytvoření velké množství kopií genu. Gen se tak může získat ve velkém množství pomocí rostoucích transformantů, izolací molekul rekombinantní DNA z transformantů a jestliže to je nutné, izolací začleněného genu z izolované rekombinantní DNA.

Sekvence Nogo podle vynálezu zahrnují tyto nukleotidové sekvence kódující v podstatě stejné aminokyselinové sekvence, jak se vyskytují v přirozených proteinech Nogo a ty kódované ami-

nokyselinovými sekvencemi s funkčně ekvivalentními aminokyselinami stejně jako sekvencemi, které kódují deriváty nebo analogy Nogo, jak se popisuje dále v textu v případě derivátů a analogů Nogo.

5 Exprese genů *Nogo*

Nukleotidová sekvence kódující protein Nogo nebo funkčně aktivní analog nebo fragment nebo jiný jeho derivát (zobrazeno na obrázcích č. 1b a 2a, popisuje se dále v textu) se může začlenit do vhodného expresního vektoru, to znamená do vektoru, který obsahuje nezbytné elementy vhodné pro transkripci a translaci začleněné sekvence kódující protein. Nezbytné transkripční a translační signály se mohou také poskytnout přirozeným genem *Nogo a*/nebo její lemuující sekvencí. Kódující sekvence se může také značit sekvencí, která kóduje dobře popsany antigen nebo biologickou molekulu, která má známé vazebné vlastnosti s vazebným partnerem (například epitop myc, histidinovou značku, epitop T7 atd., zobrazeno na obrázku č. 11a až 11c dále v textu). Tato další sekvence se může využít při izolaci proteinu Nogo, proteinového fragmentu nebo derivátu za použití interakce vazebné skupiny s odpovídajícím partnerem, který je přichycen na pevný podklad.

Různé systémy hostitel–vektor se mohou využít k expresi sekvence kódující protein. Tyto systémy zahrnují, ale nejsou omezeny na savčí buněčné systémy infikované virem (například virus vakcínie, adenovirus atd.), systémy hmyzích buněk infikované virem (například bakulovirus), mikroorganismy, takové jako jsou kvasinky obsahující kvasinkové vektory nebo bakterie transformované bakteriofágem, DNA, plazmidová DNA nebo kosmidová DNA. Expresivní elementy vektorů se liší v jejich intenzitě a specifitě. V závislosti na využívaném systému vektor–hostitel se může použít libovolný z počtu vhodných transkripčních a translačních elementů. Ve specifických provedeních vynálezu se exprimuje lidský gen *Nogo*, buď jako Nogo A, Nogo B nebo Nogo C (zobrazeno na obrázku č. 1b). V jiném provedení vynálezu se exprimuje fragment Nogo obsahující oblast proteinu Nogo.

Termín „buňka se transformovala nukleovou kyselinou“ znamená, že taková buňka obsahuje po zavedení nukleové kyseliny do buňky nebo do její rodičovské buňky například transfekcí, elektroporací, transdukcí atd., nukleovou kyselinu, která není přirozeně přítomna v buňce.

Vynález popisuje nukleotidové sekvence kódující fragmenty lidského Nogo A obsahující aminokyselinovou sekvenci vybranou ze skupiny obsahující aminokyselinové zbytky 1 až 131, 132 až 939, 206 až 501, 501 až 680, 132 až 206, 680 až 939 a 940 až 1 127 sekvence SEQ ID NO: 30. Také se popisují nukleotidové sekvence, které kódují zkrácené oblasti lidského proteinu Nogo A, zkráceným proteinům chybí aminokyselinové zbytky 132 až 206, aminokyselinové zbytky 939 až 1 127 nebo aminokyselinové zbytky 132 až 206 a 939 až 1 127 sekvence SEQ ID NO: 30, ale jinak obsahují zbytek sekvence SEQ ID NO: 30.

Libovolné dříve popsané metody vhodné pro začlenění fragmentů DNA do vektoru se mohou použít ke konstrukci expresivních vektorů, které obsahují chimérický gen obsahující vhodný transkripční/translační kontrolní signály a proteinové kódující sekvence. Tyto metody mohou zahrnovat rekombinantní DNA *in vitro* a syntetické metody a *in vivo* rekombinanty (genetická rekombinace). Exprese sekvence nukleové kyseliny kódující protein Nogo nebo peptidový fragment se může regulovat druhou sekvencí nukleové kyseliny tak, že protein nebo peptid Nogo se exprimuje v hostiteli transformován s molekulou rekombinantní DNA. Exprese proteinu Nogo se může řídit libovolným elementem promotoru/zesilovače, který je znám v oboru. V příkladném provedení vynálezu je vhodné použít jeden z přirozených promotorů Nogo, buď P1 nebo P2, který se popisuje dále v textu. Může se také použít nepřirozený promotor. Promotory, které se mohou použít, řídí expresi genu *Nogo* a zahrnují, ale nejsou omezeny na oblast časného promotoru SV40 (popisuje se v publikaci Bernoist and Chambon, 1981, Nature 290: 304–310), promotor obsažený v dlouhé terminální repetici 3'konce viru Rousova sarkomu (popisuje se v publikaci Yamamoto, et al., 1980, Cell 22: 787–797), promotor thymidinové kinázy viru herpes (popisuje

se v publikaci Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 1 441–1 445), regulační sekvence genu metalothioneinu (popisují se v publikaci Brinster et al., 1982, Nature 296: 39–42), prokaryontní expresní vektory, jako jsou promotor β -laktamázy (popisuje se v publikaci Villa-Kamaroff, et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75: 3 727–3 731) nebo promotor *tac* (popisuje se v publikaci DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 21–25, „Useful proteins from recombinant bacteria“ Scientific American, 1980, 242: 74–94), rostlinné expresní vektory obsahující oblast promotoru neopalinové syntetázy (Herrera–Estrella et al., Nature 303: 209–213) nebo 35S RNA promotor květákového mozaikového viru (popisuje se v publikaci Gerdner, et al., 1981, Nucl. Acids Res. 9: 2871) a promotor fotosyntetické enzymové ribulózové bifosfátové karboxylázy (popisuje se v publikaci Herrera–Estrella et al., 1984, Nature 310: 115–120), promotorové elementy z kvasinek nebo jiných hub, takové jako je promotor Gal 4, promotor ADC (dehydrogenáza alkoholu), promotor PGK (fosfoglycerolová kináza), promotor alkalické fosfatázy a následující zvířecí transkripční řídicí oblasti, které vykazují tkáňovou specifitu a využívají se u transgenních zvířat: řídicí oblast genu elastázy I, která je aktivní v pankreatických acinárních buňkách (popisuje se v publikaci Swift et al., 1984, Cell 38: 639–646, Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50: 399–409, MacDonald, 1987, Hepatology, 7: 425–515), oblast řídicí gen inzulínu, která je aktivní v pankreatických buňkách beta (Hanahan, 1985, Nature 315: 115–122), řídicí oblast genu imunoglobulinu, která je aktivní v lymfoidních buňkách (popisuje se v publikaci Grosscheld et al., 1984, Cell 38: 647–658, Adames et al., 1985, Nature 318: 533–538, Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7: 1 436–1 444), řídicí oblast viru nádoru prsní žlázy u myši, která je aktivní v testikulárních, prsních, lymfoidních a žírných buňkách (popisuje se v publikaci Leder et al., 1986, Cell 45: 485–495), oblast řídicí gen albuminu, která je aktivní v játrech (popisuje se v publikaci Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1: 268–276), oblast řídicí gen alfa-fetoproteinu, která je aktivní v játrech (popisuje se v publikaci Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5: 1 639–1 648, Hammer et al., 1987, Science 235: 53–58) oblast řídicí gen alfa 1-antitrypsin, který je aktivní v játrech (popisuje se v publikaci Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1: 161–171), oblast kontrolující gen beta-globinu, která je aktivní v myeloidních buňkách (Mogram et al., 1985, Nature 315: 338–340, Kollias et al., 1986, Cell 46: 89–94, oblast řídicí gen myelinového základního proteinu, který je aktivní v oligodendrocytech v mozku (popisuje se v publikaci Readhead et al., 1987, Cell 48: 703–712), oblast řídicí gen myosinového lehkého řetězce 2, která je aktivní v kosterním svalu (popisuje se v publikaci Sani, 1985, Nature 314: 283–286) a oblast řídicí gen uvolňování gonadotropického hormonu, který je aktivní v hypotalamu (popisuje se v publikaci Mason et al., 1986, science 234: 1372–1378).

35 Ve specifickém provedení vynálezu používaný vektor obsahuje promotor operativně spojený s nukleovou kyselinou kódující Nogo, jeden nebo více počátků replikace a jeden nebo více selekčních markerů (například gen rezistence na antibiotika).

40 Ve specifickém provedení vynálezu se expresní konstrukce připravila subklonováním sekvence kódující *Nogo* do restrikčního místa enzymu *EcoRI* každého ze tří vektorů pGEX (expresní vektory glutathionové S transferázy, popisuje se v publikaci Smith and Johnson, 1988, Gene 7: 31–40). To umožňuje exprimovat protein Nogo ze subklonu ve správném čtecím rámcí.

45 Expresní vektory obsahující inzerty genu *Nogo* se mohou identifikovat třemi obecnými přístupy a) hybridizací nukleové kyseliny, b) přítomností nebo absencí funkcí „markerového“ genu a c) expresí začleněných sekvencí. V prvním přístupu přítomnost genu *Nogo* začleněného do expresního vektoru se může detekovat hybridizací nukleové kyseliny za použití sond, které obsahují sekvence homologní se začleněným genem *Nogo*. Ve druhém přístupu se může identifikovat a vybrat rekombinantní vektor/hostitelský systém na základě přítomnosti nebo absence jistých markerových genových funkcí (například aktivity thymidin kinázy, rezistence na antibiotika, transformační fenotyp, vytvoření okluze v bakuloviru atd.), což je způsobeno inzercí genu *Nogo* do vektoru. Jestliže se gen *Nogo* začlenil do sekvence markerového genu vektoru, mohou se rekombinanty obsahující inzert *Nogo* identifikovat nepřítomností funkce markerového genu. Rekombinantní expresní vektory se mohou identifikovat testováním produktu *Nogo* exprimova-

ného rekombinantem. Takové testy mohou být založeny na fyzikálních a funkčních vlastnostech proteinu Nogo v testovacích systémech *in vitro* například navázáním na protilátky proti Nogo.

Po té, co se identifikovala a izolovala rekombinantní molekula DNA, může se pro její propagaci použít několik metod, které jsou dobře známy v oboru. Po té, co je zaveden vhodný hostitelský systém a růstové podmínky, rekombinantní expresní vektory se mohou propagovat a připravovat ve velkém množství. Jak už se vysvětlilo dříve v textu, expresní vektory, které se mohou využít, zahrnují, ale nejsou omezeny na následující vektory nebo jejich deriváty: lidské a zvířecí viry, jako je virus vakcínie a adenovirus, hmyzí viry, jako je bakulovirus, kvasinkové vektory, bakteri-
ofágové vektory (například lambda)) a plazmidové nebo kozmidové DNA vektory.

Navíc se může vybrat kmen hostitelské buňky, který upravuje exprese začleněných sekvencí nebo upravuje a zpracovává genový produkt požadovaným specifickým způsobem. Exprese z jistých promotorů může zesílit v přítomnosti jistých indukčních činidel, čímž je možné řídit expresi geneticky manipulovaného proteinu Nogo. Různé hostitelské buňky dále vykazují charakteristické a specifické mechanismy pro translační a post-translační postup a úpravu (například glykosylaci, fosforylaci proteinů). Vhodné buněčné linie nebo hostitelské systémy se mohou vybrat k zajištění požadované modifikace a zpracování exprimovaného cizorodého proteinu. Například exprese bakteriálního systému se může použít k produkci neglykosylovaného jaderného proteinového produktu. Exprese v kvasinkách bude produkovat glykosylační produkt. Exprese v savčích buňkách se může použít k zajištění přirozené glykosylace heterologního proteinu. Různé vektorové/expresní systémy mohou ovlivňovat reakce zpracování v různém rozsahu.

V jiných provedeních vynálezu protein Nogo, fragment, analog nebo derivát se může exprimovat jako fúze nebo produkt chimérického proteinu (obsahující protein, fragment, analog nebo derivát spojený prostřednictvím peptidové vazby na heterologní proteinovou sekvenci (odlišného proteinu)). Takový chimérický produkt se může připravit ligací vhodných sekvencí nukleové kyseliny, které kódují sekvence požadované aminokyseliny, metodami, které jsou dobře známy v oboru. To probíhá ve vhodném kódujícím rámci a exprimuje se chimérický produkt vyrobený syntézou proteinu, například použitím syntetizátoru peptidu.

Sekvence cDNA a genomové sekvence se mohou klonovat a exprimovat.

Identifikace a izolace produktů genu *Nogo*

Vynález poskytuje aminokyselinové sekvence Nogo, přednostně lidské Nogo a jeho fragmenty a deriváty, které obsahují antigenní determinantu (to znamená, že mohou být rozeznány protilátkou) nebo které jsou jinak funkčně aktivní, stejně jako jejich sekvence nukleových kyselin. Termín „funkčně aktivní“ materiál Nogo znamená, že materiál vykazuje jednu nebo více známých funkčních aktivit spojených s plnou délkou (divoký typ) proteinu Nogo A, například vlastností nepermissivního substrátu, kolaps růstu ganglií dorzálních kořenů, inhibice rozšíření buněk NIH 3T3, inhibice nadměrného růstu neuritů, navázání na substrát Nogo nebo vazebného partnera Nogo, antigenicita (navázání na protilátku proti Nogo), imunogenicita atd.

Ve specifických provedeních podle vynálezu fragmenty proteinu Nogo obsahují alespoň 6 aminokyselin, 10 aminokyselin, 17 aminokyselin, 50 aminokyselin, 100 aminokyselin nebo alespoň 220 aminokyselin. V jiném provedení podle vynálezu proteiny obsahují podstatně vysoce konzervativní oblast C–konce proteinu Nogo (188 aminokyselin C–konce proteinu Nogo A). Vynález dále popisuje fragmenty nebo proteiny obsahující fragmenty, kterým chybí konzervativní oblast C–konce nebo hydrofobní části C–konce nebo aminoterminální kyselé oblasti nebo aminoterminální polyprolinovou oblast nebo její libovolnou kombinaci nebo protein Nogo. Vynález také popisuje nukleové kyseliny kódující uvedené oblasti, fragmenty a proteiny.

Po té, co se identifikoval rekombinant, který exprimuje sekvenci genu *Nogo*, analyzoval se genový produkt. Toho se dosáhlo testy založenými na fyzikálních a funkčních vlastnostech produktu,

kteře zahrnujı radioaktivnı značení produktu následované analýzou gelovou elektroforézou, imunitním testem atd.

Po té, co se identifikoval protein Nogo, může se izolovat a čistit standardními metodami, které zahrnujı chromatografii (napřıkklad chromatografii s výměnou iontů, afinitní chromatografii a kolonovou chromatografii dělicí podle velikosti), centrifugaci, dělení na základě rozdílné rozpustnosti nebo jinými standardními metodami čištění proteinů. Funkční vlastnosti se mohou hodnotit za použití libovolného vhodného testu zahrnující snížení růstu ganglií dorzálních kořenů, inhibici rozšíření buněk NIH 3T3, inhibici regenerace neuritů ve zřakovém nervu (popisuje se dále v textu).

V jiném případě vynálezu po identifikaci proteinu Nogo produkovaného rekombinantem se může odvodit aminokyselinová sekvence proteinu z nukleotidové sekvence chimérického genu obsaženého v rekombinantu. Protein se může syntetizovat pomocí standardních chemických metod, které jsou dobře známy v oboru (popisuje se napřıkklad v publikaci Hunkapiller, M., et al., 1984, Nature 310: 105–111).

V jiném alternativním provedení vynálezu se může přirozený Nogo C izolovat z přirozených zdrojů standardními metodami, které se popisujı shora v textu (napřıkklad imunoafinitním čištěním).

Ve specifickém provedení vynálezu takové proteiny Nogo, ať už jsou produkovány metodou rekombinace DNA nebo metodami chemické syntézy nebo čištěním přirozených proteinů zahrnujı primární aminokyselinovou sekvenci, všechny nebo část aminokyselinové sekvence, jak je znázorněna na obrázku č. 2a (SEQ ID NO: 2),

nebo lidskou sekvenci znázorněnou na obrázku č. 13 (SEQ ID NO: 29, stejně jako fragmenty nebo jiné deriváty (které jsou napřıkklad znázorněny na obrázku č. 18) a jejich analogy, které zahrnujı jejich homologní proteiny. Upřednostňuje se, aby proteiny Nogo neobsahovaly žádný volný CNS myelinový materiál, se kterým je v normálním případě spojen.

Struktura genu a proteinu *Nogo*

Struktura genu a proteinu *Nogo* se může analyzovat různými metodami, které jsou dobře známy v oboru a několika dalšími metodami, které se popisujı v následujícím textu.

Genetická analýza

Klonovaná DNA nebo cDNA odpovídající genu *Nogo* se může analyzovat metodami zahrnujícími Southernovou hybridizaci (Southern, E. M., 1975, J. Mol. Biol. 98: 503–517), northern hybridizaci (napřıkklad Freeman et al., 1983, proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 4094–4098), mapování pomocí restričních endonukleáz (popisuje se v publikaci Maniatis, T., 1982, Molecular Cloning, A Laboratory, Cold Spring Harbor, New York) a analýza sekvence DNA. Polymerázová řetězová reakce (PCR, popisuje se v dokumentech US 4 683 202, US 4 683 195 a US 4 889 818, Gyllenstein et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 7652–7656, Ochman et al., 1988, Genetics 120: 621–623, Loh et al., 1989, Science 243: 217–220) následovaná Southernovou hybridizací se sondou specifickou pro *Nogo* umožňuje detekci genu *Nogo* v DNA pocházející z různých buněčných typů. Mohou se také použít metody amplifikace, které jsou jiné než PCR. V jednom provedení vynálezu se může použít Southernovy hybridizace, aby se stanovilo genetické spojení genu *Nogo*. Analýza northernu hybridizací se může použít ke stanovení exprese genu *Nogo*. V různých buněčných typech v různém stádiu vývoje nebo aktivity se může testovat, zda dochází k expresi genu *Nogo*. Přísnost hybridizačních podmınek při Southernově a northern hybridizací se může ovlivňovat, aby se zajistila detekce nukleových kyselin s požadovaným stupněm vztahu k používané specifické sondě *Nogo*. Může se použít modifikace těchto metod a jiných metod, které jsou dobře známy v oboru.

Mapování restričními endonukleázami se může použít při hrubém stanovení genetické struktury genu *Nogo*. Restriční mapy získané štěpením restričními endonukleázami se mohou potvrdit analýzou sekvence DNA.

- 5 Analýza sekvence DNA se může uskutečnit libovolnou metodou známou v oboru, která zahrnuje, ale neomezuje se na metodu podle Maxama a Gilberta (popisuje se v publikaci Maxam and Gilbert et al., 1980, Meth. Enzymol. 65: 499–560), Sangerovu dideoxy metodu (popisuje se v publikaci Sanger, F., et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74: 5463), použití DNA polymerázy T7 (popisuje se v publikaci Tabor and Richardson, dokument US 4 795 699) nebo použití automatizovaného sekvenátoru DNA (například Applied Biosystems, Foster City, CA).

Analýza proteinů

- 15 Aminokyselinová sekvence proteinu *Nogo* se může odvodit dedukcí ze sekvence DNA nebo v jiném případě přímou sekvenací proteinu například automatickým sekvenátorem aminokyselin.

20 Sekvence proteinu *Nogo* se může dále charakterizovat analýzou hydrofilicity (popisuje se v publikaci Hopp, T. and Woods, K., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 3824). Profil hydrofilicity se může použít k identifikaci hydrofobních a hydrofilních oblastí proteinu *Nogo* a odpovídajícím oblastem genové sekvence, která kóduje takové oblasti.

25 Může se také provést analýza struktury (popisuje se v publikaci Chou, P. and Fasman, G., 1974, Biochemistry 13: 222), aby se identifikovaly oblasti *Nogo*, které předpokládají specifickou sekundární strukturu.

Manipulace, translace a předpoklad sekundární struktury, předpoklad a vynesení otevřeného čtecího rámce, stejně jako stanovení sekvenční homologie se může také uskutečnit použitím počítačových programů, které jsou dostupné v oboru.

30 Mohou se použít také jiné metody strukturální analýzy. Ty zahrnují krystalografii pomocí paprsků X (popisuje se v publikaci Engstrom, A., 1974, Biochem. Exp. Biol. 11: 7–13) a počítačové modelování (popisuje se v publikaci Fletterick, R. and Zoller, M. (eds.), 1986, Computer Graphics and Molecular Modeling, Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York).

35 Vytvoření protilátek proti proteinům *Nogo* a jejich derivátů

40 Protein *Nogo*, jeho fragment nebo jiné deriváty nebo analogy se mohou použít jako imunogen při vzniku protilátek, které se imunospécificky váží na takový imunogen. Takové protilátky zahrnují, ale nejsou omezeny na polyklonální, monoklonální, chimerické protilátky, jednotlivé řetězce, fragmenty Fab a expresní knihovnu Fab. Produkují se protilátky řízené proti rekombinantnímu fragmentu kryšního nebo bovinního proteinu *Nogo* (popisuje se dále v textu), přičemž tyto protilátky také zkříženě reagují s epitopy jiných druhů. V jiném provedení vynálezu, fragmenty proteinu *Nogo* identifikované jako hydrofilní se také používají jako imunogeny při produkci protilátek.

50 Při produkci polyklonálních protilátek proti proteinu *Nogo* nebo derivátu nebo analogu se mohou použít různé postupy, které jsou dobře známy v oboru. V určitém provedení vynálezu se mohou získat králíčí polyklonální protilátky vůči epitopu proteinu *Nogo* kódované sekvencí SEQ ID NO:2 na obrázku č. 2a, SEQ ID NO: 29 na obrázku č. 12, SEQ ID NO: 32 na obrázku č. 14 nebo SEQ ID NO: 30 na obrázku č. 13 (kryší protein *Nogo* A, bovinní protein *Nogo*, kryší protein *Nogo* C nebo lidský protein *Nogo*) nebo jeho subsekvence. Při produkci protilátky se různí zvířecí hostitelé mohou imunizovat injekcí s přirozeným proteinem *Nogo* nebo s jeho syntetickou verzí nebo derivátem (například fragment), který zahrnuje králíky, myši, krysy atd. Ke zvýšení imunologické odezvy se mohou použít různá adjuvans v závislosti na druzích hostitele. Tato

adjuvans zahrnují Freundovo adjuvans (úplné nebo neúplné), minerální gely, jako jsou například hydroxid hlinitý, povrchově aktivní činidla, jako je lyzolecitin, pluronní polyoly, polyanionty, peptidy, olejové emulze, hemocyaniny přílipkovitých plžů, dinitrofenol a potencionálně používané lidské adjuvans, jako je BCG (bacil Calmette–Guerin) a *corynebacterium parvum*.

5 Při přípravě monoklonálních protilátek určených proti sekvenci proteinu Nogo nebo jeho analogu se může použít libovolný způsob, při kterém dochází k produkci molekul protilátek kontinuálními buněčnými liniemi. Může se například použít metoda hybridomů podle Kohlera a Milsteina (popisuje se v publikaci Kohler and Milstein, 1975, Nature 256: 495–497) stejně jako metoda
10 triomů, metoda hybridomů lidské B–buňky (popisuje se v publikaci Koznor et al., 1983, Immunology Today 4: 72) a metoda EBV–hybridomu, přičemž vznikají lidské monoklonální protilátky (popisuje se v publikaci Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77–96). Monoklonální protilátky se mohou produkovat u zvířat, která neobsahují parazity za použití jisté technologie popsané v dokumentu PCT/US90/02545. Podle vynálezu se
15 mohou lidské protilátky použít a získat za použití lidských hybridomů (popisuje se v publikaci Cote et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 2 026–2 030) nebo transformací lidských B buněk virem EBV *in vitro* (popisuje se v publikaci Cole et al., 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, pp. 77–96). Ve skutečnosti podle vynálezu metoda vyvinutá pro produkci „chimérických protilátek“ (popisuje se v publikaci Morrison et al., 1984, Proc. Natl.
20 Acad. Sci. U.S.A. 81: 6851–6855, Neuberger et al., Nature 312: 604–608, Takeda et al., 1985, Nature 314: 452–454) sestřihává geny z myší molekuly protilátek, která je specifická pro protein Nogo spolu s geny z lidské protilátkové molekuly vhodné biologické aktivity. Takové protilátky jsou také předmětnou věcí vynálezu.

25 Postup vhodný pro produkci jednořetězcových protilátek (popisuje se v publikaci – patent US 4 946 778) se může upravit tak, aby se produkovaly jednořetězcové protilátky specifické pro protein Nogo. Mohou se také použít metody popsané pro konstrukci expresní knihovny Fab (popisuje se v publikaci Huse et al., 1989, Science 246: 1 275–1 281), což umožňuje rychlou a jednoduchou identifikaci mononukleárních fragmentů Fab s požadovanou specifitou v případě
30 proteinů Nogo nebo jeho analogů nebo derivátů.

Fragmenty protilátek, které obsahují idiotyp molekuly, se mohou vytvořit známou metodou. Takové fragmenty například zahrnují, ale nejsou omezeny na fragment $F(ab')_2$, který se může
35 produkovat štěpením pepsinem molekuly protilátky, fragmenty $F(ab')_2$, které se mohou vytvořit redukcí disulfidových můstků fragmentu $F(ab')_2$, fragmenty Fab, které se mohou vytvořit ošetřením molekulou protilátky s papainem a redukčním činidlem a fragmenty Fv.

Při produkci protilátek se může uskutečnit testování žádaných protilátek metodou, která je dobře
40 známa v oboru. Touto metodou je například test ELISA. Aby se vybraly protilátky, které rozeznávají specifickou oblast proteinu Nogo, je možné testovat vytvořené hybridomy za účelem zjištění přítomnosti produktu, který se váže na fragment Nogo obsahující uvedenou oblast. Při selekci protilátky, která se specificky váže na první homolog proteinu Nogo, ale která se neváže specificky na odlišný homolog Nogo, je možné zvolit na základě pozitivního navázání prvního
45 homologu Nogo a chybějícímu navázání druhého homologu Nogo.

Vynález také popisuje protilátky specifické pro oblast proteinu Nogo.

Cizorodé protilátky se mohou použít při metodě, která je známa v oboru a vztahuje se
50 k lokalizaci a aktivitě sekvencí proteinu Nogo podle vynálezu. Je to například zviditelnění těchto proteinů, měření jejich množství ve vhodných fyzikálních vzorcích a to například při diagnostické metodě atd.

Protilátky proti Nogo a jeho fragmentům, které obsahují vazebnou oblast, se mohou použít jako
55 terapeutika.

Proteiny Nogo, jeho deriváty a analogy

Vynález dále popisuje proteiny Nogo a deriváty (zahrnující fragmenty) a analogy proteinů Nogo. Popisují se nukleové kyseliny kódující protein Nogo, deriváty a proteinové analogy. V jednom provedení vynálezu se proteiny Nogo kódují nukleovými kyselinami Nogo popsanými shora v textu. Proteiny Nogo A, Nogo B nebo Nogo C a deriváty a analogy jsou zvířecí proteiny a jsou popisovány vynálezem. Mezi uvedená zvířata patří myš, krysa, prase, kráva, pes, opice, člověk, moucha nebo žába.

Vynález také popisuje produkci a použití derivátů a analogů příbuzných proteinu Nogo. Ve specifickém provedení vynálezu je derivát i analog funkčně aktivní, to znamená, že je schopný vykazovat jednu nebo více funkčních aktivit spojených s proteinem Nogo divokého typu v plné délce. Mohou se použít deriváty a analogy, které vykazují požadovanou imunogenicitu nebo antigenicitu v imunologických testech, při imunizaci, při inhibici aktivity Nogo atd. Deriváty nebo analogy, které si ponechávají nebo v jiném případě jim chybí nebo inhibují požadované vlastnosti proteinu Nogo (například navázání na vazebného partnera proteinu Nogo) se mohou použít jako indukční činidla nebo inhibitory takových vlastností. Specifické provedení vynálezu popisuje fragment proteinu Nogo, který se váže na protilátky proti Nogo. U derivátů a analogů proteinu Nogo se může testovat požadovaná aktivita postupem, který je znám v oboru, který zahrnuje testy popsané shora v textu.

Za účelem mapovat aktivní oblasti proteinu Nogo se připravila série delečních mutantů Nogo pomocí metody rekombinace DNA, jak se popisuje dále v textu. Oblasti Nogo, které jsou přítomny v delečních mutantech jsou zobrazeny na obrázku č. 18. Ve specifickém provedení vynálezu se popisují fragmenty proteinu Nogo, například fragmenty obsahující aminokyseliny proteinu Nogo A (SEQ ID NO: 2) čísla 1 až 171, 172 až 974, 259 až 542, 542 až 722, 722 až 974, 172 až 259 nebo 975 až 1 162 nebo jejich kombinací. Vynález dále popisuje zkrácené mutanty proteinu Nogo neobsahující aminokyseliny čísla 172 až 259 a/nebo 975 až 1 162 sekvence SEQ ID NO: 2, přičemž uvedené oblasti se jeví být nepodstatné a mohou se odstranit, aniž se ovlivní biologická aktivita. Popisují se také odpovídající fragmenty lidského proteinu Nogo A obsahující aminokyseliny číslo 1 až 131, 132 až 939, 206 až 501, 501 až 680, 132 až 206, 680 až 939 nebo 940 až 1 127 sekvence SEQ ID NO: 30. Vynález dále popisuje zkrácené mutanty lidského proteinu Nogo A, kterým chybí aminokyseliny číslo 132 až 206, aminokyselinové zbytky 939 až 1 127 nebo aminokyselinové zbytky 132 až 206 a 939 až 1 127 sekvence SEQ ID NO: 30.

Ve specifickém provedení vynálezu fragmenty neobsahují žádný volný CNS myelinový materiál a/nebo vykazují inhibiční aktivitu proteinu Nogo. Vynález dále popisuje fúzní proteiny obsahující jeden nebo více shora popsaných fragmentů fúzovaných se sekvencí, který není sekvencí proteinu Nogo.

Deriváty genu Nogo se mohou připravit změnou sekvence genu *Nogo* substitucemi, adicemi nebo delecemi, které poskytují funkčně ekvivalentní molekuly. Vzhledem k degeneraci nukleotidových kódujících sekvencí jiné sekvence DNA, které kódují v podstatě stejnou aminokyselinovou sekvenci jako je gen *Nogo*, se mohou použít při praktickém použití vynálezu. Tyto sekvence zahrnují, ale nejsou omezeny na nukleotidové sekvence obsahující celou nebo části genů *Nogo*, které se změnily substitucí různých kodonů, které kódují funkčně ekvivalentní aminokyselinový zbytek v sekvenci, čímž dochází k tiché změně. Deriváty Nogo podle vynálezu zahrnují, ale nejsou omezeny na primární aminokyselinovou sekvenci, celou nebo část aminokyselinové sekvence proteinu Nogo, která zahrnuje změněné sekvence, ve které funkčně ekvivalentní aminokyselinové zbytky se substituovaly za zbytky v sekvenci, což vede k tichým změnám. Jeden nebo více aminokyselinových zbytků v sekvenci se může konzervativně substituovat jinou aminokyselinou s podobnou polaritou, která působí jako funkční ekvivalent, což vede k tiché změně. Substituenty aminokyseliny v sekvenci se mohou vybrat z jiných členů třídy, do které aminokyselina patří. Monopolární (hydroföbní) aminokyseliny zahrnují alanin, leucin, izoleucin, valin, prolin, fenylalanin, tryptofan a methionin. Polární neutrální aminokyseliny zahrnují glycin, serin, treo-

nin, cystein, tyrozin, asparagin a glutamin. Pozitivně nabité (bazické) aminokyseliny zahrnují arginin, lyzin a histidin. Negativně nabité (kyselé) aminokyseliny zahrnují kyselinu asparagovou a glutamovou.

5 Ve specifickém provedení vynálezu proteiny obsahují fragment proteinu Nogo, který zahrnuje alespoň 10 kontinuálních aminokyselin proteinu Nogo. V jiných provedeních vynálezu takové
 10 fragmenty nejsou větší než 35, 100 nebo 200 aminokyselin. Deriváty nebo analogy proteinu Nogo zahrnují, ale nejsou omezeny na molekuly obsahující oblasti, které jsou v podstatě homologní s proteinem Nogo nebo s jeho fragmenty (například v různých provedeních vynálezu se
 15 pomocí počítačového programu zjistilo alespoň 60 % nebo 70 % nebo 80 % nebo 90 % nebo 95 % shody v aminokyselinové sekvenci shodné velikosti nebo když se porovnává s uspořádanou sekvencí, ve které se uspořádání provede počítačovým programem, který je dobře znám v oboru; je to například počítačový program BLAST (popisuje se v publikaci Altschul et al., 1994, Nature Genet. 6: 119–129)), nebo jejichž kódující nukleová kyselina je schopná hybridizovat s kódující sekvencí Nogo za přísných, mírně přísných a mírných podmínek.

Dále se popisují molekuly obsahující fragmenty Nogo, které například obsahují uhlovodíkové vazby s jinými částmi, které zahrnují značky nebo bioaktivní části.

20 Deriváty a analogy Nogo podle vynálezu se mohou produkovat různými metodami, které jsou známy v oboru. Manipulace, které vedou k produkci derivátů a nebo analogů Nogo se mohou vyskytovat na úrovni genu nebo proteinu. Klonovaná sekvence genu *Nogo* se může upravit libovolným počtem strategií, které jsou známy v oboru (popisuje se v publikaci Maniatis, T., 1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d ed., Cold Spring Harbor, New York). Sekvence se
 25 může štěpit ve vhodných místech restrikcími endonukleázami a pak následují, jestliže je to nutné, další enzymatické úpravy, izolace a ligace *in vitro*. Při produkci genu, který kóduje derivát nebo analog proteinu Nogo, by se mělo zajistit, aby upravený gen zůstal ve stejném translačním čtecím rámci jako Nogo, nepřerušily se stop signály translace v genové oblasti, kde se kóduje požadovaná aktivita proteinu Nogo.

30 Navíc sekvence nukleové kyseliny kódující protein Nogo se může mutovat *in vitro* nebo *in vivo*, přičemž vzniká a/nebo zaniká translační, iniciační a/nebo terminační sekvence nebo vznikají variace v kódujících oblastech a/nebo se tvoří nová místa rozeznávaná restrikcími endonukleázami nebo se odstraňují dříve existující místa, přičemž to umožňuje další modifikace *in vitro*.
 35 Může se použít libovolná metoda mutagenese, která je známa v oboru, přičemž jsou zahrnuty chemická mutagenese, *in vitro* místně řízená mutagenese (popisuje se v publikaci Hutchinson, C., et al., 1978, J. Biol. Chem 253: 6 551), použití linkerů TAB[®] (Pharmacia) atd.

40 Manipulace sekvence Nogo se může také vytvořit na úrovni proteinu. Vynález popisuje fragmenty proteinu Nogo nebo jeho deriváty nebo analogy, které se během nebo po translaci odlišně upravují, například glykosylací, acetylací, fosforylací, amidací, derivatizací známými ochrannými nebo blokačními skupinami, proteolytickým štěpením, navázáním na molekulu protilátka nebo jiného buněčného ligandu atd. Libovolný počet chemických modifikací se může provést pomocí metod dobře známých v oboru, které zahrnují specifické chemické štěpení cyanogenbromidem, trypsinem, chymotrypsinem, papainem, proteázou V8, NaBH₄, acetylací, formylací,
 45 oxidací, redukcí, metabolickou syntézou v přítomnosti tunikamycinu atd.

Navíc analogy a deriváty Nogo se mohou syntetizovat chemicky. Peptid odpovídající části proteinu Nogo, který obsahuje požadovanou oblast nebo který zprostředkovává požadovanou aktivitu *in vitro* se může syntetizovat použitím peptidového syntetizátoru. Dále, je-li to nutné, do sekvence Nogo se mohou zavést jako substituce nebo adice neklasické aminokyseliny nebo chemické analogy aminokyselin. Neklasické aminokyseliny zahrnují, ale nejsou limitovány na D-izoméry běžných aminokyselin, α -aminobutyrová kyselina, Abu, 2-aminobutyrová kyselina, γ -Abu, ϵ -Ahx, 6-aminohexanová kyselina, Aib, 2-aminoizobutyrová kyselina, 3-aminopropionová kyselina, ornitin, norleucin, norvalin, hydroxyprolin, sarkosin, citrulin, kyselina cysteová, t-
 55

butylglycin, t-butylalanin, fenylglycin, cyklohexylalanin, β -alanin, fluoro-aminokyselina, navržené aminokyseliny, jako je β -methylaminokyseliny, C α -methylaminokyseliny, N α -methylaminokyseliny a aminokyselinové analogy obecně. Aminokyselina může být D (pravotočivá) nebo L (levotočivá).

5

Ve specifickém provedení vynálezu derivát Nogo je chimérický nebo fúzní protein obsahující protein Nogo nebo jeho fragment (upřednostňuje se, aby obsahoval alespoň oblast nebo motiv proteinu Nogo nebo alespoň 10 aminokyselin proteinu Nogo) spojených svým amino- nebo karboxylovým koncem prostřednictvím peptidové vazby k aminokyselinové sekvenci odlišného proteinu. V jednom provedení vynálezu takový chimérický protein vzniká rekombinantní expresí nukleové kyseliny kódující protein (obsahující sekvenci kódující Nogo spojenou v rámci s kódující sekvencí různého proteinu). Takový chimérický produkt se může připravit vzájemnou ligací vhodných sekvencí nukleové kyseliny, která kóduje požadované aminokyselinové sekvence, metodami, které jsou dobře známy v oboru, ve vhodném čtecím rámci a expresí chimérického produktu metodami, které jsou dobře známy v oboru. V jiném případě takový chimérický produkt se může připravit metodou syntézy proteinu, například použitím peptidového syntetizéru. Mohou se zkonstruovat chimérické geny obsahující části *Nogo* fúzované s libovolnými heterologními sekvencemi kódujícími protein. Takové heterologní sekvence kódující protein zahrnují například hexahistidinovou značku a značku T7. Specifické provedení vynálezu se vztahuje na chimérický protein obsahující fragment Nogo, který zahrnuje alespoň šest aminokyselin.

10

15

20

V jiném specifickém provedení vynálezu derivát Nogo je molekula obsahující oblast homologie s proteinem Nogo.

25

V preferovaném provedení vynálezu jsou deriváty Nogo (například fragmenty) proteiny, které se neobjevují přirozeně.

V jiném specifickém provedení vynálezu deriváty a analogy se popisují dále v textu v sekci příkladů.

30

Deriváty Nogo obsahující jednu nebo více oblastí proteinu

35

Ve specifickém provedení vynálezu se popisují deriváty a analogy Nogo, zvláště pak fragmenty a deriváty Nogo jako jsou fragmenty, které obsahují nebo v jiném případě se skládají z jedné nebo více oblastí proteinu Nogo, které zahrnují konzervativní hydrofóbní oblasti C-konce nebo kyselé oblasti N-konce bohaté na polyprolin nebo jejich funkční fragmenty (například vazebné) nebo jejich libovolnou kombinaci.

40

Specifické provedení podle vynálezu zahrnuje specifické fragmenty proteinu Nogo, což jsou ty fragmenty proteinu Nogo, které jsou nejvíce homologní ke specifickým fragmentům krysího nebo bovinního proteinu Nogo. Fragment obsahující oblast homologu Nogo se může identifikovat metodami analýzy proteinu, jak se popisuje dále v textu.

45

V jiném specifickém provedení vynálezu se popisuje molekula, která obsahuje jeden nebo více oblastí (nebo jejich funkčních částí) proteinu Nogo, ale které také chybí jedna nebo více oblastí (nebo jejich funkčních částí) proteinu Nogo. V jiném provedení vynálezu se popisuje molekula, která obsahuje jednu nebo více oblastí (nebo jejich funkčních částí) proteinu Nogo a která vykazuje jeden nebo více mutantních (mutace je například způsobena delecí nebo bodovou mutací) oblastí proteinu Nogo (například tak, že u mutantní oblasti se zesílila funkce).

50

Testy proteinů Nogo, jejich derivátů a analogů

55

Funkční aktivita proteinů Nogo, derivátů a analogů se může testovat různými metodami. Popis funkčních testů v následujících sekcích neznamená jejich omezení, ale mohou se použít jiné testy, které jsou dobře známy v oboru.

Testy Nogo *in vitro* inhibice růstu neuritů

5 Ve specifickém provedení vynálezu se mohou proteiny Nogo, deriváty a analogy testovat, zda inhibují rozšíření buněk NIH 3T3 nebo nadměrný růst neuritů PC12 za použití tkáňových kultur *in vitro*.

10 V alternativním provedení vynálezu proteiny Nogo, deriváty a analogy se mohou použít při testování kolapsu růstu konusu explantovaných ganglií dorzálních kořenů u kuřete, což se indukuje přítomností proteinu Nogo. Podobně u proteinu Nogo se může testovat inhibice nadměrného růstu explantovaných ganglií dorzálních kořenů u kuřete (popisuje se v publikaci Spillman et al., 1998 J. Biol. Chem. 273: 19 283 – 19 293).

Testy funkčních vlastností Nogo *in vivo*

15 V jednom příkladu vynálezu antagonisté proteinů Nogo, deriváty a analogy se mohou použít při testech funkce *in vivo* za použití zvířecího modelu regenerace kortikospinální dráhy (CST) na dlouhou vzdálenost a navrácení chování.

20 V jednom provedení vynálezu je kortikospinální dráha poškozena chirurgickou resekci nebo kontuzí míchy a zvířeti se aplikuje antagonistu proteinu Nogo. Neurální plasticita, regenerace a návrat funkce se porovnává se kontrolními zvířaty, která nebyla ošetřena uvedeným způsobem, nebo se kontrolními zvířaty, která se ošetřila aplikací protilátky. Anatomickými metodami se sleduje strukturální plasticita nebo regenerace a to hlavně značením definovaných neurálních drah. Navrácení funkce se měří testy pohyblivosti a elektrofyziologické dovednosti, které se provádějí na hlodavcích (například test lepivého papíru, test dosažení potravy atd.) (popisuje se v publikaci Thallmair et al., 1998, Nat. Neuroscience 1(2): 124–131).

Inhibice navázání ligandu Nogo a její testování

30 V jednom provedení vynálezu se testuje schopnost vázat se nebo soutěžit proteinem Nogo divokého typu o navázání na protilátku proti Nogo. V tomto případě se mohou použít různé imunitní testy, které jsou dobře známy v oboru a zahrnují kompetitivní a nekompetitivní testovací systémy za použití metod, jako jsou radioimunotesty, ELISA, sendvičové imunotesty, imunoradiometrické testy, gelové difúzní precipitativní reakce, imunodifúzní testy, *in situ* imunotesty (za použití koloidního zlata, enzymatických nebo radioizotopových značek), western bloty, precipitační reakce, aglutinační testy (například gelové aglutinační testy, hemaglutinační testy), testy fixace komplementu, imunofluorescenční testy, testy s proteinem A a imunoelektroforetické testy atd. V jednom provedení podle vynálezu se navázání protilátek detekovalo detekcí značky na primárních protilátkách. V jiném provedení vynálezu se primární protilátky detekovaly detekcí navázání sekundární protilátky nebo činidla na primární protilátku. V jednom provedení vynálezu jsou značeny sekundární protilátky. V oboru je známo řada metod detekce navázání v imunotestu a tyto metody jsou předmětnou věcí vynálezu.

45 V jiném provedení vynálezu, kde se identifikoval protein vázající Nogo, se může navázání například testovat například způsobem dobře známým v oboru. V jiném provedení vynálezu se mohou testovat fyziologické koreláty navázání Nogo na jeho substrát.

Vynález dále popisuje jiné metody, které jsou dobře známy v oboru.

50

Terapeutické použití

55 Vynález popisuje léčbu a prevenci různých onemocnění a poruch aplikací terapeutické sloučeniny (terapeutické činidlo). Takové terapeutická činidla zahrnují, ale nejsou omezeny na proteiny Nogo a jejich analogy a deriváty (zahrnující fragmenty) (například jak se popisuje shora v textu),

jejich protilátky (jak se popisuje shora v textu), nukleové kyseliny kódující proteiny Nogo, analogy a deriváty (jak se popisuje shora v textu), antisense nukleové kyseliny *Nogo* a agonisty a antagonisty proteinu Nogo. Poruchy zahrnující deregulovaný buněčný růst, například nádory CNS, se ošetřují nebo se jim předchází aplikací terapeutických činidel, které podporují funkci Nogo. Poruchy, při kterých je růst, regenerace a udržování neuritů deficitní nebo se požaduje, se léčí aplikací terapeutického činidla, které antagonizuje (inhibuje) funkci Nogo. Tato skutečnost se popisuje dále v textu.

V obecném případě se preferuje aplikace produktů druhového původu nebo druhého reaktivity (v případě protilátky) stejného druhu, do kterého patří pacient. V preferovaném provedení vynálezu se tak lidský protein Nogo, derivát nebo analog nebo nukleová kyselina nebo protilátka proti lidskému proteinu Nogo aplikuje pacientovi.

Léčba a prevence poruch zahrnující deregulovaný buněčný růst

Onemocnění a poruchy zahrnující deregulaci buněčného růstu se ošetřily nebo se jim předchází aplikací terapeutických činidel, které podporují (to znamená zvyšují nebo propůjčují) funkci Nogo. Příklady takových terapeutických činidel zahrnují, ale nejsou omezeny na proteiny Nogo, deriváty nebo fragmenty, které jsou funkčně aktivní, zvláště které jsou aktivní při inhibici extenze neuritů nebo inhibice buněčného růstu (například jak se demonstruje v testech *in vitro* nebo ve zvířecích modelech) a nukleové kyseliny kódující protein Nogo nebo jeho funkčně aktivní derivát nebo fragment (například při použití genové terapie). Upřednostňuje se, aby proteiny, deriváty nebo fragmenty Nogo neobsahovaly žádný volný CNS myelinový materiál, který je přirozeně asociován. Mohou se také použít jiná terapeutická činidla. Jsou to například agonisty Nogo, které se mohou identifikovat za použití testů *in vitro* nebo zvířecích modelů, příklady se popisují dále v textu.

Ve specifických provedeních vynálezu se terapeutická činidla, která podporují funkci Nogo, aplikují terapeuticky (což zahrnuje také profylaxi): (1) u onemocnění a poruch, která zahrnují absenci nebo snížení (vztaženo na normální nebo požadované množství) množství proteinu Nogo nebo zeslabení funkce například u pacientů, kterým chybí protein Nogo nebo je geneticky defektní nebo není biologicky aktivní nebo vykazuje nízkou aktivitu nebo je jeho exprese zeslabena, nebo (2) u onemocnění nebo poruch kde testy *in vitro* (nebo *in vivo*) (popisuje se dále v textu) indikují využití aplikace agonisty Nogo. Nepřítomnost nebo snížení množství proteinu Nogo nebo jeho funkce je možné snadno detekovat, například získáním vzorku pacientovy tkáně (například tkáně z biopsie) a testováním *in vitro* množství RNA nebo proteinu, struktury a/nebo aktivity exprimované RNA Nogo nebo proteinu. Tak je možné použít řady metod, které se v oboru považují za standardní a které zahrnují, ale neomezuji se na kinázové testy, imunotesty vhodné pro detekci a/nebo vizualizaci proteinu Nogo (například western blot, imunoprecipitace následovaná elektroforézou na polyakrylamidovém gelu SDS, imunocytochemickým testem atd.) a/nebo hybridizační testy, které jsou vhodné pro detekci exprese pomocí detekce a/nebo vizualizace mRNA Nogo (například northern testy, testy dot blot, hybridizací *in situ*) atd.

Onemocnění a poruchy, které zahrnují deregulovaný buněčný růst a které se dají léčit nebo se jim dá předcházet, zahrnují, ale nejsou omezeny na proliferativní poruchy, maligní nádory, nádory nervového systému atd. Příklady jsou uvedeny dále v textu.

Neoplastický růst

Neoplastický růst a příbuzné poruchy, které se mohou léčit nebo se jim může předcházet aplikací terapeutického činidla, které podporuje funkci Nogo, zahrnují, ale nejsou omezeny na onemocnění uvedené v tabulce č. 1 (takové poruchy se také popisují v publikaci Fishman et al., 1985, *Medicine*, 2d Ed., J. B. Lippincott Co., Philadelphia):

Tabulka č. 1: Neoplastický růst a příbuzné poruchy

	pevné nádory
	sarkomy a karcinomy
5	gliom, glioblastom
	astrocytom
	meduloblastom
	kraniofaryngiom
	ependymom
10	pinealom
	hemangioblastom
	sluchový neuron
	oligodendrogliom
	menangiom
15	neuroblastom
	retinoblastom

20 Ve specifických provedeních vynálezu malignantní nebo dysproliferativní (jako jsou metaplázie a dysplázie) nebo hyperproliferativní poruchy se ošetřují nebo se jim předchází v centrálním nervovém systému, v míše nebo v libovolné neurální tkáni.

Premaligní stavy

25 Aby se léčily premaligní stavy a předcházelo se postupu do neoplastického nebo maligního stádia onemocnění uvedených v tabulce č. 1, mohou se také aplikovat terapeutická činidla podle vynálezu, která podporují aktivitu proteinu Nogo. Takové léčebné nebo profylaktické použití se indikuje u stavů, u kterých se očekává postup do stádia neoplázie nebo karcinomu, zvláště tam, kde růst buněk, který není neoplastický, zahrnuje hyperplázii, metaplázii nebo dysplázii (abnormální stavy růstu se popisují v publikaci Robbins and Angell, 1976, Basic Pathology, 2d Ed., W. B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 68–79). Hyperplázie je forma řízené buněčné proliferace zahrnující zvýšení počtu buněk v tkáni nebo orgánu, aniž se podstatně změní jeho funkce nebo struktura. Metaplázie je forma řízeného růstu buněk, při němž jeden typ dospělých nebo zcela diferenciovaných buněk substituuje jiný typ dospělých buněk. Metaplázie se může vyskytovat v epitelálních nebo pojivových tkáňových buňkách. Netypická neoplázie zahrnuje libovolný mimořádně metaplastický epitel. Dysplázie často předchází stádiu karcinomu a vyskytuje se 35 hlavně v epitelu. Jde většinou o netypickou formu růstu buněk, který není neoplastický, a zahrnuje ztrátu jednotnosti jednotlivých buněk a architektonickou orientaci buněk. Buňky tvořící dysplázie jsou často abnormálně velké, jádro je tmavě zbarveno a vykazují pleomorfizmus. Výskyt dysplázie je charakteristický pro místa s chronickým drážděním nebo zánětem.

40 V alternativním případě nebo vedle přítomnosti abnormálního růstu buněk, který se charakterizuje jako hyperplázie, metaplázie nebo dysplázie, přítomnost jedné nebo více charakteristik transformovaného fenotypu nebo maligního fenotypu vyjádřeného *in vivo* nebo *in vitro* ve vzorku buněk pacienta může indikovat požadavek profylaktické/terapeutické aplikace terapeutického 45 činidla, které podporuje funkci proteinu Nogo. Jak se uvádí shora v textu, takové charakteristiky transformovaného fenotypu zahrnují morfologické změny, dochází k odloučení od spodní vrstvy, ztrátu kontaktní inhibice, ztrátu kotvící závislosti, uvolnění proteáz, zvýšený transport cukrů, snížení sérových požadavků, expresi fetálních antigenů, vymizení buněčného povrchového proteinu o molekulové hmotnosti 250 000 (popisuje se dále v textu ve spojení s charakteristikami 50 souvisejícími s transformovaným nebo maligním fenotypem).

V jiných provedeních vynálezu se popisuje léčba pacienta, který vykazuje jeden nebo více z následujících predispozičních faktorů maligních nádorů, aplikací účinného množství terapeutického činidla: neurofibromatóza Von Recklinghausen nebo retinoblastom (popisuje se v publikaci

Robbins and Angell, 1976, Basic Pathology, 2d Ed., W. B. Saunders Co., Philadelphia, pp. 112–113).

5 V jiném specifickém provedení vynálezu se terapeutická činidlo podle vynálezu aplikuje lidskému pacientovi aby se předešlo postupu zhoubnému bujení ledvin, chrupavky (prsni kosti), kůže, skeletového svalu, plic nebo sleziny, melanomu nebo sarkomu.

Hyperproliferativní a dysproliferativní poruchy

10 V jednom provedení vynálezu se terapeutická činidla, která podporují aktivitu Nogo, používají k léčbě nebo prevenci hyperproliferativních nebo benigních dysproliferativních poruch. Specifická provedení vynálezu jsou použita při léčbě a prevenci cirhózy jater (podmínky, kdy zjizvení předčilo normální regenerační proces), při léčbě koloidních formací (hypertrofní jizvy) (dochází k deformaci kůže, kdy proces tvorby jizvy interferuje s normálním obnovením), lupénky (což
15 jsou běžné stavy kůže charakterizované nadměrnou proliferací kůže a oddálení správné buněčné determinace), benigní nádory, fibrocystické stavy a tkáňová hypertrofie (například prostatická hyperplázie).

Genová terapie

20 Ve specifickém provedení nukleové kyseliny obsahující sekvenci kódující protein Nogo nebo jeho funkční derivát se aplikovaly, aby se podpořila funkce Nogo cestou genové terapie. Genová terapie se uskutečnila aplikací nukleové kyseliny subjektu. V tomto provedení vynálezu nukleová kyselina produkuje svůj kódovaný protein, který zprostředkovává terapeutický účinek při vyvo-
25 lání funkce Nogo.

Libovolná z metod genové terapie dostupná v oboru se může použít podle vynálezu. Příklady metod se popisují dále v textu.

30 Obecné metody v genové terapii se popisují v publikaci Goldspiel et al., 1993, Clinical Pharmacy 12: 488–505, Wu and Wu, 1991, Biotherapy 3: 87–95, Tolstoshev, 1993, Ann. rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573–596, Mulligan, 1993, Science 260, 926–932 a Morgan and Anderson, 1993, Ann. Rev. Biochem. 62: 191–217, May, 19993, TIBTECH 11(5): 155–215. Používané metody běžně známé v oboru technologie rekombinace DNA se popisují v publikaci Ausubel et al., 1993,
35 Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, NY a Kriegler, 1990, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY.

V preferovaném provedení vynálezu se popisuje terapeutické činidlo obsahující nukleovou kyselinu Nogo, která je součástí expresního vektoru, jenž exprimuje protein Nogo nebo jeho fragment
40 nebo chimérický protein ve vhodném hostiteli. Taková nukleová kyselina vykazuje promotor operativně spojený s kódující oblastí Nogo, přičemž uvedený promotor je indukovatelný nebo konstitutivní a může být tkáňově specifický. V jiném určitém provedení vynálezu se používá molekula nukleové kyseliny, ve které kódující sekvence Nogo a libovolné jiné požadované sekvence jsou lemovány oblastmi, které podporují homologní rekombinaci v požadovaném místě
45 v genomu, přičemž poskytují intrachromozomální expresi nukleové kyseliny Nogo (popisuje se v publikaci Koller and Smithies, 199, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8 932–8 935, Zijlstra et al., 1989, Nature 342: 435–438).

Zavedení nukleové kyseliny do pacienta se může provést buď přímo, přičemž se pacient přímo
50 vystaví nukleové kyselině nebo vektoru, který nese nukleovou kyselinu nebo nepřímo, kdy buňky se nejdříve transformovaly nukleovou kyselinou *in vitro* a pak se transplantovaly do pacienta. Tyto dva přístupy jsou známy jako *in vivo* nebo *ex vivo* genová terapie.

55 Ve specifickém provedení vynálezu se nukleová kyselina přímo aplikuje *in vivo*, kde se exprimuje, aby se produkoval kódovaný produkt. Toho je možné dosáhnout libovolným počtem metod

známých v oboru, například konstrukcí, kdy je součástí expresního vektoru vhodné nukleové kyseliny a její aplikací, která se provede tak, aby se stala vnitrobuněčnou, například infekcí za použití defektivního nebo atenuovaného retrovirového nebo jiného virového vektoru (popisuje se například v dokumentu – patent US 4 980 286) nebo přímým zavedením injekcí samotnou DNA nebo použitím bombardováním partikulami (například genové dělo, Biolistic Dupont) nebo potažení lipidy nebo buněčnými povrchovými receptory nebo transfekčními činidly, kapsulizací v lipozómech, mikročásticemi nebo mikrokapsulemi nebo aplikací ve spojení s peptidem, který je znám tím, že vstupuje do jádra, ve spojení s ligandem, čímž se vystavuje endocytóze zprostředkované receptorem (popisuje se například v publikaci Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262: 4 429–4 432) (která se může použít v případě cílových buněčných typů, které specificky exprimují receptory) atd. V jiném provedení vynálezu se tvoří komplex nukleová kyselina–ligand, kde ligand obsahuje fúzogenní virový peptid za účelem porušení endozómů, což umožňuje nukleové kyselině zabránit lysozomálnímu rozpadu. V jiném provedení vynálezu nukleová kyselina se může cílit *in vivo* za účelem specifického buněčného pohlčení a exprese cílením specifického receptoru (popisuje se v PCT dokumentu WO 92/06180 s datem 16. dubna 1992 (Wu et al.), WO 92/22635 s datem 23. prosince 1992 (Wilson et al.), WO 92/20316 s datem 26. listopadu 1992 (Findeis et al.), WO 93/14188 s datem 22. červenec 1993 (Clarke et al.), WO 93/20221 s datem 14. října 1993 (Young)). V jiném případě nukleová kyselina se může zavést do buňky a začlenit do hostitelské buňky vhodné pro její expresi homologní rekombinací (popisuje se v publikaci Koller and Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8932–8935, Zijlstra et al., 1989, Nature 342: 435–438).

Ve specifickém provedení se používá virový vektor, který obsahuje nukleovou kyselinu Nogo. Může se například použít retrovirový vektor (popisuje se v publikaci Miller et al., 1993, Meth. Enzymol. 217: 581–599). Tyto retrovirové vektory se mohou modifikovat, aby se deletovaly retrovirové sekvence, které nejsou nezbytné pro zabalení virového genomu a začlenění DNA do hostitelské buňky. Nukleová kyselina Nogo, která se může použít při genové terapii, se klonuje do vektoru, který umožňuje začlenění genu do pacienta. Více detailů o retrovirových vektorech je možné nalézt v publikaci Bosen et al., 1994, Biotherapy 6: 291–302, kde se popisuje použití retrovirového vektoru pro zavedení genu *mdr1* do hematopoitických kmenových buněk, aby se kmenové buňky staly více rezistentní vůči chemoterapii. Retrovirové vektory použitelné v genové terapii se dále popisují v publikaci Clowes et al., 1994, J. Clin. Invest. 93: 644–651, Kiem et al., 1994, Blood 83: 1 467–1 473, Salmons and Gunzberg, 1993, Human Gene Therapy 4: 129–141 a Grossman and Wilson, 1993, Curr. Opin., Genetics and Devel. 3: 110–114.

Adenoviry jsou další virové vektory, které se mohou použít při genové terapii. Adenoviry jsou zvláště atraktivní při zavedení genů do centrálního nervového systému. Adenoviry přirozeně infikují respirační epitel, kde způsobují lehké onemocnění. Jiným cílem pro zaváděcí systémy založené na adenovirech jsou játra, respirační epitel, endoteliální buňky a svaly. Adenoviry jsou výhodné tím, že dokáží infikovat buňky, které se nedělí. V publikaci Kozarsky and Wilson 1993, Current Opinion in Genetics and Development 3: 499–503 poskytuje přehled genové terapie založené na adenovirech. V publikaci Bout et al., 1994, Human Gen Therapy 5: 3–10 ukazuje použití adenovirových vektorů pro transfer genů do respiračního epitelu opice rhesus. Jiné příklady použití adenovirů při genové terapii se popisují v publikacích Rosenfeld et al., 1991, Science 252: 431–434, Rosenfeld et al., 1992, Cell 68: 143–155 and Mastrangeli et al., 1993, J. Clin. Invest. 91: 225–234.

Vedle adenovirů adenoasociovaný virus (AAV) je také možné použít při genové terapii (Walsh et al., 1993, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204: 289–300).

Další přístup genové terapie zahrnuje transfer genu do buněk v tkáňové kultuře metodami, jako jsou elektroporace, lipofekce, transfekce zprostředkovaná fosforečnanem vápenatým nebo virovou infekcí. Způsob transferu zahrnuje v obvyklém případě transfer selektovatelného markeru do buněk. Buňky se pak umístí do selekčního prostředí, aby se daly izolovat ty buňky, které pohltily DNA a exprimují transferovaný gen. Takové buňky se pak zavedou do pacienta.

V tomto provedení vynálezu se nukleová kyselina zavede do buňky dříve než se aplikuje *in vivo* výsledná rekombinantní buňka. Takové zavedení se může provést libovolnou metodou známou v oboru, které zahrnují, ale nejsou omezeny na transfekci, elektroporaci, mikroinjekci, infekci s virovým nebo bakteriofágovým vektorem, který obsahuje sekvence nukleové kyseliny, buněčnou fúzi, transfer genů zprostředkovaný chromozómem, transfer genů zprostředkovaný mikrobuňkou, sféroplastovou fúzí atd. V oboru je známo řada metod, které jsou vhodné pro zavedení cizorodých genů do buněk (popisuje se například v publikaci Loeffler and Behr, 1993, Meth. Enzymol. 217: 599–618, Cohen et al., 1993, Meth. Enzymol. 217: 618–644, Cline, 1985, Pharmac. Ther. 29: 69–92) a mohou se použít v souladu s přítomným vynálezem, což ukazuje, že nezbytné vývojové a fyziologické funkce recipientní buňky nejsou poškozeny. Metoda by měla poskytnout stabilní transfer nukleové kyseliny do buňky tak, že nukleová kyselina se exprimuje buňkou a přednostně se dědí a exprimuje na její potomstvo.

Výsledné rekombinantní buňky se mohou zavést do pacienta různými metodami známými v oboru. V preferovaném provedení vynálezu se epitelální buňky zavedly podkožní injekcí. V jiném provedení vynálezu se mohou pacientovi aplikovat rekombinantní kožní buňky jako kožní štěpy. Rekombinantní krevní buňky (například hematopoietické kmenové nebo progenitorové buňky) se přednostně aplikují intravenózně. Množství buněk určených pro použití závisí na požadovaném účinku, stádiu onemocnění pacienta atd. a odborník je může snadno stanovit.

Buňky, do kterých je možné zavést nukleovou kyselinu pro účely genové terapie zdůrazňují libovolný požadovaný dostupný buněčný typ a zahrnují, ale nejsou omezeny na epitelální buňky, endotelální buňky, keratinocyty, fibroblasty, svalové buňky, hepatocyty, krevní buňky, jako jsou T lymfocyty, B lymfocyty, monocyty, makrofágy, neutrofilny, eosinofily, megakaryocyty, granulocyty, různé kmenové nebo progenitorové buňky, zvláště hematopoetické kmenové nebo progenitorové buňky například získané z kostní dřeně, z pupečnickové krve, periferní krve, fetálních jater atd.

V preferovaném provedení buňka užívaná při genové terapii je pro pacienta autologní.

V provedení vynálezu, ve kterém se rekombinantní buňky používají v genové terapii se nukleová kyselina Nogo zavede do buněk tak, že jí buňky nebo jejich potomstvo exprimuje a rekombinantní buňky se pak aplikují *in vivo* pro terapeutický účinek. Ve specifickém provedení vynálezu se mohou použít kmenové nebo progenitorové buňky. Libovolné kmenové a/nebo progenitorové buňky, které se mohou izolovat a udržovat *in vitro* se mohou potencionálně použít v souladu s tímto provedením vynálezu. Takové kmenové buňky zahrnují, ale nejsou omezeny na neurální kmenové buňky (Stemple and Anderson, 1992, Cell 71: 973–985).

Ve specifickém provedení vynálezu nukleová kyselina, která se zavedla pro účely genové terapie obsahuje indukovatelný promotor operativně spojený s kódující oblastí tak, že exprese nukleové kyseliny je říditelná tak, že se řídí přítomnost nebo absence vhodného induktoru transkripce.

Další metody se mohou upravit při použití pro zavedení nukleové kyseliny kódující protein Nogo nebo funkční derivát.

Léčba a prevence poruch, při kterých protein Nogo blokuje regeneraci.

Onemocnění a poruchy, při kterých je nutné zvětšení neuritů, jejich růst a regenerace, se ošetřují aplikací terapeutického činidla, který antagonizuje (inhibuje) funkci proteinu Nogo. Onemocnění, poruchy nebo poškození, které vedou k poškození nervového systému zahrnují, ale nejsou omezeny na trauma centrálního nervového systému (CNS) (například poranění míchy nebo mozku), infarkt, infekce, maligní nádory, vystavení toxickým činidlům a degenerativní nervové onemocnění (zahrnující Alzheimerovu nemoc, Parkinsonovu nemoc, Huntingtonovu choreu, roztroušenou sklerózu a progresivní supra-jadernou paralýzu), aplikací sloučenin, které interferují

s aktivitou Nogo (například dominantní negativní derivát Nogo, protilátky proti proteinu Nogo, Anti-sense nukleové kyseliny, které kódují protein *Nogo*, ribozymy nebo chemické skupiny, které se vážou na aktivní místa proteinu Nogo).

5 Terapeutická činidla, která se mohou použít, zahrnují, ale nejsou omezeny na antisense nukleovou kyselinu Nogo, která je dysfunkční (což je například způsobeno heterologní inzercí (sekvence, která není sekvencí Nogo) do sekvence kódující *Nogo*), které se používají k vyjmutí endogenní funkce *Nogo* homologní rekombinací (popisuje se například v publikaci Capecchi, 1989, Science 244: 1 288–1 292). Protilátky proti proteinu Nogo (jejich fragmenty a deriváty obsahující
10 jejich vazebnou oblast) se mohou použít jako antagonisti proteinu Nogo. Ve specifickém provedení vynálezu nukleová kyselina obsahující část genu *Nogo*, ve kterém sekvence *Nogo* lemuje (na 5' i 3'konci) odlišnou genovou sekvencí se používá jako antagonist Nogo, aby podpořil deaktivaci genu *Nogo* homologní rekombinací (popisuje se také v publikaci Koller and Smithies, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 8 932–8 935, Zijlstra et al., 1989, Nature 342: 435–438). Jiná
15 terapeutická činidla, která inhibují funkci Nogo se mohou identifikovat použitím známých vhodných testů *in vitro* například založených na jejich schopnosti inhibovat navázání proteinu Nogo na jiný protein nebo inhibovat libovolnou známou funkci Nogo, jak se přednostně testuje *in vitro* nebo v buněčné kultuře ačkoli se mohou také použít genetické testy. Upřednostňuje se vhodné *in vitro* nebo *in vivo* testy se využívají ke stanovení účinku specifického terapeutického činidla a
20 ačkoli jeho aplikace je indikována pro léčbu postižené tkáně.

Ve specifickém provedení vynálezu terapeutická činidla, která inhibují funkci Nogo, se aplikují terapeuticky (zahrnují profylaxi): (1) při onemocnění nebo poruchách, které zahrnují zvýšené množství (vztaženo k normálnímu nebo požadovanému) proteinu Nogo nebo funkci, například u
25 pacientů, kde protein Nogo je nadměrně reaktivní nebo se nadměrně exprimuje nebo (2) při onemocnění nebo poruchách, kde *in vitro* testy (nebo *in vivo*) (popisuje se shora v textu) indikují, že využitelnost aplikace antagonisty Nogo. Snadno detekovatelné je zvýšené množství proteinu Nogo nebo funkce, například kvantifikací proteinu a/nebo RNA získáním vzorku pacientovy tkáně (například z biopsie tkáně) a jejím testováním *in vitro* za účelem zjištění množství RNA
30 nebo proteinu, struktury a/nebo aktivity exprimované RNA Nogo nebo proteinu. Může se použít řada metod, které se považují v oboru za standardní. Jsou to například kinázové testy, imunologické testy za účelem detekce a/nebo vizualizace proteinu Nogo (například western přenos, imunoprecipitace, po níž následuje elektroforéza na SDS polyakrylamidovém gelu, imunocytochemie, atd.) a/nebo hybridizační testy za účelem detekce exprese Nogo detekci a/nebo vizualizační mRNA Nogo (například northern testy, dot bloty, hybridizace *in situ* atd.).
35

„Antisense“ regulace exprese genu *Nogo*

40 Ve specifickém provedení vynálezu se funkce Nogo inhibuje použitím „antisense“ nukleové kyseliny *Nogo*. Vynález poskytuje terapeutické nebo profylaktické použití nukleových kyselin, které obsahuje alespoň šest nukleotidů, které vystupují jako pozitivní vůči genu nebo cDNA kódující *Nogo* nebo jeho část. Kódující nukleová kyselina *Nogo* je nukleová kyselina schopná hybridizovat s částí RNA *Nogo* (upřednostňuje se mRNA) na základě sekvenční komplementarity. „Antisense“ nukleová kyselina může být komplementární s kódující a/nebo nekódující
45 oblastí mRNA *Nogo*. Takové „antisense“ nukleové kyseliny se mohou použít jako terapeutická činidla, která inhibují funkci Nogo a mohou se použít při léčbě nebo prevenci poruch popsanych shora v textu.

50 „Antisense“ nukleové kyseliny podle vynálezu mohou být oligonukleotidy, které jsou jednořetězcové nebo dvouřetězcové, RNA nebo DNA nebo jejich modifikace nebo deriváty, které se mohou přímo aplikovat do buňky nebo které se mohou produkovat vnitrobuněčně transkripční exogenních zavedených sekvencí.

55 Ve specifickém provedení vynálezu se „antisense“ nukleové kyseliny *Nogo* mohou použít k podpoře regenerace neuronů centrálního nervového systému zvláště zahrnující regeneraci kor-

tikospinální dráhy, plasticitu během získávání, opětný růst neuronů a hojení poškození spojeného s traumatickým poraněním, mrtvice a neurodegenerativní onemocnění.

5 Vynález dále popisuje farmaceutické prostředky obsahující účinné množství antisense nukleové kyseliny *Nogo* podle vynálezu na farmaceuticky přijatelném nosiči jak se popisuje dále v textu.

10 V jiném provedení vynálezu se popisují metody inhibující expresi sekvence nukleové kyseliny *Nogo* v prokaryontní nebo eukaryontní buňce obsahující buňku s účinným množstvím prostředku, který obsahuje „antisense“ nukleovou kyselinu *Nogo* podle vynálezu.

„Antisense“ nukleové kyseliny *Nogo* a jejich použití se popisují dále v textu.

„Antisense“ nukleové kyseliny *Nogo*

15 „Antisense“ nukleové kyseliny *Nogo* obsahují alespoň šest nukleotidů a jsou to přednostně oligonukleotidy (v rozsahu 6 až přibližně 50 oligonukleotidů). Ve specifických případech oligonukleotid obsahuje alespoň 10 nukleotidů, alespoň 15 nukleotidů, alespoň 100 nukleotidů nebo alespoň 200 nukleotidů. Oligonukleotidy mohou být DNA nebo RNA nebo chimérické směsi nebo deriváty nebo jejich modifikované verze, jednořetězcové nebo dvouřetězcové. Oligonukleotid se může modifikovat v části báze, v části cukru nebo fosfátové kostry. Oligonukleotid může zahrnovat další připojené skupiny, jako jsou peptidy nebo činidla umožňující transport skrz buněčnou membránu (popisuje se například v publikaci Letsinger et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 6553–6556, Lemaitre et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 648–652, dokument PCT WO 88/09810 publikovaný 15. prosince 1988) nebo bariéra krev–mozek (popisuje se například v dokumentu PCT WO89/10134 publikovaný 25. dubna 1988), štěpící činidla podněcovaná hybridizací (popisuje se například v publikaci Krol et al., 1988, BioTechniques 6: 958–976) nebo interkalační činidla (popisují se v publikaci Zon, 1988, Pharm. Res. 5: 539–549).

30 Vynález dále popisuje „antisense“ oligonukleotid *Nogo*, přičemž se upřednostňuje jednořetězcová DNA. Dále se uvádí, že takový nukleotid obsahuje „antisense“ sekvenci vzhledem k sekvenci blízko jedné ze dvou promotorových sekvencí genu *Nogo* nebo sekvenci kódující C–terminální část genu *Nogo*. Může být nutné, aby se selektivně inhibovala exprese jedné z izoformy *Nogo*. Oligonukleotid se může upravit v libovolné poloze na své struktuře pomocí substituentů, které jsou obecně známy v oboru.

35 „Antisense“ oligonukleotid může obsahovat alespoň jednu část modifikované báze, která se vybrala ze skupiny zahrnující například 5–fluorouracil, 5–bromouracil, 5–chlorouracil, 5–jodouracil, hypoxantin, xantin, 4–acetylcytosin, 5–(karboxyhydroxymethyl)uracil, 5–karboxymethylaminomethyl–2–thiouridin, 5–karboxymethylaminomethyluracil, dihydrouracil, beta–D–galaktosylkveozin, Inozin, N6–izopentenyladenin, 1–methylguanin, 1–methylinozin, 2,2–dimethylguanin, 2–methyladenin, 2–methyladenin, 2–methylguanin, 3–methylcytosin, 5–methylcytosin, N6–adenin, 7–methylguanin, 5–methylaminomethyluracil, 5–methoxyaminomethyl–2–thiouracil, beta–D–manosylkveozin, 5′–methoxykarboxymethyluracil, 5–methoxyuracil, 2–methylthio–N6–izopentenyladenin, kyselina uracil–5–oxyoctová (v), wybutoxozin, pseudouracil, kveozin, 2–thiocytosin, 5–methyl–2–thiouracil, 2–thiouracil, 4–thiouracil, 5–methyluracil, methylester kyseliny uracil–5–oxyoctové, kyselina uracil–5–oxyoctová(v), 5–methyl–2–thiouracil, 3–(3–amino–3–A–2–karboxypropyl)uracil, (acp3)w a 2,6–diaminopurin.

50 V jiném provedení vynálezu oligonukleotid obsahuje alespoň jednu upravenou cukernou část vybranou ze skupiny zahrnující například arabinózu, 2–fluoroarabinózu, xylulózu a hexózu.

V jednom provedení podle vynálezu oligonukleotid obsahuje alespoň jednu upravenou fosfátovou kostru vybranou ze skupiny obsahující fosforothioát, fosforodithioát, fosforamidothioát, fosforamidát, fosfordiamidát, methylfosfonát, alkylfosfotriester a formacetyl nebo jeho analog.

55

V dalším provedení vynálezu oligonukleotid je α -anomerní oligonukleotid. α -anomerní oligonukleotid tvoří specifické dvouřetězcové hybridy s komplementární RNA, ve které na rozdíl od obvyklých β -jednotek, se řetězce vyskytují paralelně jeden k druhému (popisuje se v publikaci Gautier et al., 1987, Nucl. Acids. Res. 15: 6 625–6 641).

5

Oligonukleotid může konjugovat s jinou molekulou například s peptidem, hybridizací podněcovaným síťovacím činidlem, transportním činidlem, hybridizací podněcovaným štěpícím činidlem atd.

10

Oligonukleotidy podle vynálezu se mohou syntetizovat standardními metodami, které jsou dobře známy v oboru, například použitím automatického syntetizéru DNA (který je například běžně dostupný u firmy Biosearch, Applied Biosystems, atd.). Fosforothioátové oligonukleotidy se mohou syntetizovat způsobem popsáným v publikaci Stein et al., 1988, Nucl. Acids Res. 16: 3 209), methylfosfonátové oligonukleotidy se mohou připravit za použití pórového skleněného polymérového podkladu (popisuje se v publikaci Sarin et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 7 448–7 451) atd..

15

Ve specifickém provedení vynálezu antisense oligonukleotid *Nogo* obsahuje katalytickou RNA nebo ribozym (popisuje se například v PCT mezinárodní přihlášce WO 90/11364 publikované 4. října 1990, Sarvel et al., 1990, Science 247: 1 222–1 225). V jiném provedení vynálezu oligonukleotid je 2'-O-methylribonukleotid (popisuje se v publikaci Inoue et al., 1987, Nucl. Acids Res. 15: 6 131–6 148) nebo chimérický analog RNA-DNA (popisuje se v publikaci Inoue et al., 1987, FEBS Lett. 215: 327–330).

20

25

V jiném provedení vynálezu „antisense“ nukleová kyselina *Nogo* podle vynálezu se produkuje vnitrobuněčně transkripce z exogenní sekvence. Vektor je možné například zavést *in vivo* tak, že je pohlcen buňkou, ve které je vektor nebo jeho část přepsána za vzniku antimediatorové nukleové kyseliny (RNA) podle vynálezu. Takový vektor bude obsahovat sekvenci kódující „antisense“ nukleovou kyselinu *Nogo*. Uvedený vektor může zůstat epizomální nebo se může začlenit do chromozomu. Pokud se vektor přepisuje, vzniká požadovaná antimediatorová RNA. Takové vektory se mohou konstruovat technologií rekombinace DNA, která se v oboru považuje za standardní. Vektory mohou být plazmidy, viry nebo jiné dobře známé v oboru, které se používají při replikaci a expresi v savčích buňkách.

30

35

Expres sekvence kódující antimediatorovou RNA *Nogo* se může řídit pomocí libovolného promotoru známého v oboru, který působí v savčích, upřednostňuje se v lidských, buňkách. Takové promotory mohou být indukovatelné nebo konstitutivní. Uvedené promotory zahrnují, ale nejsou omezeny na oblast časného promotoru SV40 (popisuje se v publikaci Bernoist and Chambon, 1981, Nature 290: 304–310), promotor obsahoval na 3'konci dlouhou opakovanou repetici viru Rousova sarkomu (popisuje se v publikaci Yamamoto et al., 1980, Cell 22: 787–797), promotor thymidinové kinázy viru herpes (popisuje se v publikaci Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 1 441–1 445), regulační sekvence metallothioneinového genu (popisuje se v publikaci Brinster et al., 1982, Nature 296: 39–42) atd.

40

45

„Antisense“ nukleové kyseliny podle vynálezu obsahují sekvenci komplementární s alespoň jednou částí transkriptu RNA genu *Nogo*, upřednostňuje se lidský gen *Nogo*. Avšak absolutní komplementarita, ačkoli se preferuje, není nutná. Termín sekvence „komplementární s alespoň částí RNA“ znamená sekvenci vykazující dostatečnou komplementaritu, aby byla schopná hybridizovat s RNA, která tvoří stabilní duplex. V případě dvouřetězcových „antisense“ nukleových kyselin *Nogo* se může tak testovat jediný řetězec duplexní DNA nebo se může testovat triplexová formace. Schopnost hybridizovat bude záviset na stupni komplementarity a délce „antisense“ nukleové kyseliny. V obecném případě delší hybridizující nukleová kyselina tvořící více chybných párů s RNA *Nogo* může obsahovat a stále tvořit stabilní duplex (nebo triplex podle daného případu). Odborník může stanovit tolerovatelný stupeň nesprávných párů použitím standardních postupů za účelem stanovení bodu denaturace hybridizovaného komplexu.

50

55

Terapeutické použití „antisense“ nukleových kyselin *Nogo*

5 Antisense nukleové kyseliny *Nogo* se mohou použít k léčbě (nebo prevenci) poruch typu buněk, které exprimují nebo přednostně nadměrně exprimují, gen *Nogo*. Ve specifickém provedení vynálezu taková porucha je růstová proliferativní porucha. V preferovaném provedení vynálezu se používá jednořetězcový DNA „antisense“ oligonukleotid *Nogo*.

10 Buněčné typy, které exprimují nebo nadměrně exprimují RNA *Nogo*, se mohou identifikovat různými metodami, které jsou dobře známy v oboru. Takové metody zahrnují, ale nejsou omezeny na hybridizaci s nukleovou kyselinou, která je specifická pro gen *Nogo* (například northern hybridizace, „dot blot“ hybridizace, hybridizace *in situ*), pozorování schopnosti RNA pocházející z buněčného typu být přeložena *in vitro* na protein *Nogo*, imunotesty atd. V preferovaném provedení vynálezu se popisuje, že u primární tkáně pocházející z pacienta se může testovat, zda
15 dochází před léčbou k expresi, například za použití imunocytochemických metod nebo hybridizací *in situ*.

20 Farmaceutické prostředky podle vynálezu obsahující účinné množství „antisense“ nukleové kyseliny *Nogo* ve farmaceuticky přijatelném nosiči se mohou aplikovat pacientovi, který trpí onemocněním nebo poruchou, což je typ, kde dochází k expresi nebo k nadměrné expresi RNA *Nogo* nebo proteinu.

25 Množství „antisense“ nukleové kyseliny *Nogo*, která bude účinná při léčbě určité poruchy nebo stavu, bude záviset na podstatě poruchy nebo podmínek a může se stanovit standardní klinickou poruchou. Kde je to možné, je nutné stanovit „antisense“ toxicitu typu nádoru, který se bude léčit, *in vitro* a pak v použitelných zvířecích modelových systémech dříve než se otestují a použijí na lidech.

30 Ve specifickém provedení vynálezu farmaceutické prostředky obsahující „antisense“ nukleové kyseliny *Nogo* se aplikují prostřednictvím lipozómů, mikročástic nebo mikrokapsulí. V různých provedeních vynálezu se mohou použít takové prostředky, aby se dosáhlo nepřerušovaného uvolnění „antisense“ nukleových kyselin *Nogo*. Ve specifickém provedení vynálezu může být nutné využít lipozómy cílené prostřednictvím protilátek na specifické identifikovatelné nádorové anti-
35 geny (popisuje se v publikaci Leonetti et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87: 2 448–2 451, Renneisen et al., 1990, J. Biol. Chem. 265: 16 337–16 342).

Demonstrace terapeutického a profylaktického použití

40 U terapeutických činidel se přednostně testuje požadovaná terapeutická nebo profylaktická aktivita před použitím v případě člověka *in vitro* a pak *in vivo*. Testy *in vitro*, které se mohou použít při stanovení, zda se indikovala aplikace specifického terapeutického prostředku, zahrnuje testy *in vitro* buněčné kultivace, kde rostou v kultuře tkáňové vzorky pacienta, a vystavují se působení terapeutického činidla nebo terapeutické činidlo se aplikuje jiným způsobem. Pozoruje se účinek uvedeného terapeutického činidla na vzorek tkáně. Terapeutické činidlo, které je inhibitor funkce
45 *Nogo*, se může například testovat měřením opětného růstu neuritů nebo funkční návratení motorky u pacienta.

50 V různých specifických provedeních vynálezu se mohou provádět testy *in vitro* s reprezentativními buňkami buněčných typů, které jsou zahrnuty v pacientově poruše, aby se stanovilo, zda terapeutické činidlo vykazuje požadovaný účinek na takové buněčné typy.

55 Sloučeniny vhodné pro použití při terapii se mohou testovat ve vhodných zvířecích modelových systémech dříve, než se testují na lidech. Tyto zvířecí modely zahrnují krysy, myši, kuřata, krávy, opice, králíky atd. Při testování *in vivo*, dříve než se aplikují člověku, se může použít libovolný zvířecí modelový systém.

Terapeutická/profylaktická aplikace a prostředky

5 Vynález popisuje způsoby léčby (a profylaxe) aplikací subjektu účinného množství terapeutického činidla podle vynálezu. V preferovaném provedení vynálezu se používají v podstatě čistá terapeutická činidla. Subjektem je přednostně zvíře, které zahrnuje například krávy, prasata, koně, kuřata, kočky, psi atd. a přednostně jsou to savci a nejvíce se preferuje člověk. Ve specifických provedeních vynálezu subjektem je savec, nikoli však člověk.

10 Přípravky a metody aplikace, které se mohou použít, když terapeutické činidlo obsahuje nukleovou kyselinu, se popisují shora v textu.

15 Jsou známy různé zaváděcí systémy a mohou se použít při aplikaci terapeutického činidla podle vynálezu. Je to například kapsulizace v lipozómech, mikročástice, mikrokapsule, rekombinantní buňky schopné exprimovat terapeutické činidlo, endocytóza zprostředkovaná receptorem (popisuje se v publikaci Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262: 4 429–4 432), konstrukce terapeutické nukleové kyseliny, jako část retrovirového nebo jiného vektoru atd. Metody zavedení zahrnují, ale nejsou omezeny na intradermální, intramuskulární, intraperitoneální, intravenózní, podkožní, intranasální, epidurální nebo orální. Sloučeniny se mohou aplikovat libovolným vhodným způsobem, například infuzí nebo jednorázovou injekcí, absorpcí epitelem nebo sliznicí (například orální sliznicí, rektální a střevní sliznicí) a může se aplikovat spolu s jinými biologicky aktivními činidly. Aplikace může být systémová nebo lokální. Navíc může být nutné zavést farmaceutické kompozice podle vynálezu do centrálního nervového systému libovolnou vhodnou cestou, která zahrnuje intraventrikulární a intratekální injekci. Intraventrikulární injekce se může provést intra-
25 vertikulárním katetrem například napojeným na rezervoár, jako je rezervoár podle Ommaya.

Pulmorální aplikace se může použít například při použití inhalátoru a nebulizátoru a přípravků s činidlem tvořící aerosol.

30 Ve specifické provedení vynálezu je možné aplikovat farmaceutické kompozice podle vynálezu lokálně v oblasti potřeby léčby. Toho je možné dosáhnout například lokální infúzí během chirurgického zákroku, povrchové aplikace například ve spojení s obvazováním ran po chirurgickém zákroku, injekcí, katetrem nebo způsoby implantátu, přičemž uvedený implantát je porézní, neporézní nebo želatinový materiál, který zahrnuje membrány, jako jsou silastické membrány nebo
35 vlákna. V jednom provedení vynálezu se aplikace může provést přímo injekcí do místa (nebo do předešlého místa) maligního nádoru nebo neoplastové nebo pre-neoplastové tkáně.

40 V jiném provedení vynálezu terapeutické činidlo se může zavést do vezikuly, zvláště do lipozómu (popisuje v publikaci Langer, Science 249: 1 527–1 533 (1990), Trest et al., Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez–Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353–365 (1989), Lopez–Berestein, *ibid.*, pp. 317–327).

45 V jiném provedení vynálezu terapeutické činidlo se může zavést do systému s řízeným uvolňováním. V jednom provedení vynálezu se může pro aplikaci použít pumpa (popisuje se v publikaci Langer, Science 249: 1 527–1 533 (1990), Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201 (1987), Buchwald et al., Surgery 88: 507 (1980), Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321: 574 (1989)). V jiném provedení vynálezu se mohou použít polymerní materiály (popisuje se v publikaci Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Přes., Boca Raton, Florida (1974), Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984), Ranger and Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23: 61 (1983), Levy et al., Science 228: 190 (1985), During et al., Ann. Neurol. 25: 351 (1989), Howard et al., J. Neurosurg. 71: 105 (1989)). V jiném provedení vynálezu řízený uvolňovací systém se může umístit do blízkosti terapeutického cíle, to znamená mozku, což vyžaduje použití pouze části systémové dávky (popisuje se v publikaci Goodson, Medical Applications of
55 Controlled Release, vol. 2, pp. 115–138 (1984)).

Jiné systémy s řízeným uvolňováním se popisují v publikaci Langer (Science 249: 1527–1533 (1990)).

- 5 Ve specifickém provedení vynálezu, kde terapeutické činidlo je nukleová kyselina kódující proteinové terapeutické činidlo, nukleová kyselina se může aplikovat *in vivo*, aby se podpořila exprese kódovaného proteinu, přičemž se připraví konstrukce, kde vhodná nukleová kyselina je součástí expresního vektoru a aplikuje se tak, že se stává vnitrobuněčnou, například použitím retrovirového vektoru (popisuje se v publikaci–patent US 4 980 286) nebo přímou injekcí nebo
10 použitím bombardováním mikročásticemi (například genovým dělem, Biolistic, Dupont) nebo potažením lipidy nebo buněčnými povrchovými receptory nebo transfekčními činidly nebo aplikací ve spojení s peptidem, který je podobný homeoboxu a který je znám tím, že vstupuje do jádra (popisuje se například v publikaci Joliot et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 1864–1868) atd. V jiném případě nukleová kyselina terapeutického činidla se může zavést do buňky a
15 začlenit se do DNA hostitelské buňky, aby došlo k expresi, homologní rekombinací.

Vynález také popisuje farmaceutické kompozice. Takové kompozice obsahují terapeuticky aktivní množství terapeutického činidla a farmaceuticky přijatelný nosič. Ve specifickém provedení vynálezu termín „farmaceuticky přijatelný“ znamená, že vyhovuje regulační agentuře federální nebo státní vlády nebo je uveden na seznamu v U.S. Pharmacopeia nebo v jiných obecně známých pharmacopeia vhodných pro zvířata a zvláště pro lidi. Termín „nosič“ znamená ředidlo, adjuvans, excipient nebo vehikl, ve kterém se mohou aplikovat terapeutická činidla, takové farmaceutické nosiče mohou být sterilní kapaliny, takové jako je voda nebo oleje, které zahrnují olej, který je zvířecího, rostlinného nebo syntetického původu, jako je arašídový olej, sójový olej,
25 minerální olej, sezamový olej a podobně. Voda je preferovaný nosič v případě, že se farmaceutická kompozice aplikuje intravenózně. Fyziologické roztoky a vodné roztoky dextrózy a glycerolu se mohou také použít jako kapalné nosiče, zvláště pak injektovatelné roztoky. Vhodní farmaceutičtí excipienti zahrnují škrob, glukózu, laktózu, sacharózu, želatinu, slad, rýži, mouku, křídou, silika gel, stearát sodný, glycerol monostearát, talek, chlorid sodný, sušené netučné mléko, glycerol, propylen, glykol, vodu, ethanol a podobně. Kompozice, jestliže je to nutné, může také obsahovat malé množství zvlhčovacího nebo emulgačního činidla nebo činidla, která upraví pH. Tyto kompozice mohou být ve formě roztoků, suspenzí, emulze, tablet, pilulí, kapsulí, prášků, formulací pro nepřerušované uvolňování a podobně. Orální formulace mohou zahrnovat standardní nosiče, jako jsou manitol, laktóza, škrob, stearát hořečnatý, sacharin sodíku, celulóza,
35 uhličitán hořečnatý, které odpovídají farmaceutickému stupni čistoty atd. Příklady vhodných farmaceutických nosičů se popisují v publikaci „Remington’s Pharmaceutical Science“ E. W. Martin. Takové kompozice budou obsahovat terapeuticky účinné množství terapeutického činidla, které se přednostně vyskytuje v čisté formě spolu s vhodným množstvím nosiče, za vzniku formy, která je vhodná pro aplikaci pacientovi. Formulace by měla být aplikována pacientovi
40 podle vhodného módu.

V preferovaném provedení vynálezu se kompozice tvoří podle vhodných postupů, jako farmaceutická kompozice upravená pro intravenózní aplikaci lidským jedincům. V typickém případě kompozice pro intravenózní aplikaci jsou roztoky ve sterilním izotonickém vodném pufru.
45 V případě, že je to nezbytné, kompozice může také zahrnovat rozpustné činidlo a lokální anestetikum, jako je například lignokain, aby se zmenšila bolest v místě aplikace injekce. V obecném případě se ingredience dodávají buď odděleně nebo smíšené dohromady s jednotkovou dávkovou formou například jako suchý lyofilizovaný prášek nebo bezvodý koncentrát v hermeticky uzavřeném kontejneru, jako jsou ampule nebo taštičky, které indikují množství aktivního činidla.
50 V případě, že kompozice se má aplikovat infúzí, podává se z infúzní lahve, která obsahuje sterilní vodu nebo fyziologický roztok farmaceutického stupně čistoty. V případě, že se kompozice aplikuje injekcí, ampule sterilní vody vhodné pro injekce nebo fyziologický roztok se může před aplikací smíchat.

Terapeutická činidla podle vynálezu mohou vytvořit neutrální nebo solné formy. Farmaceuticky přijatelné sole zahrnují ty, které se tvoří s volnými aminoskupinami, jako jsou ty odvozené od kyseliny chlorovodíkové, fosforečné, octové, oxalové, vinné atd. Ty jsou tvořené volnými karboxylovými skupinami, jako jsou ty získané z hydroxidu sodného, draselného, amonného, vápenatého, železitého, izopropylaminu, triethylaminu, 2-ethylaminoethanolu, histidinu, prokainu atd.

Množství terapeutického činidla podle vynálezu, které bude účinné při léčbě zvláštní poruchy nebo stavu závisí na podstatě poruchy nebo stavu a může se stanovit standardní klinickou metodou. Navíc testy *in vitro* mohou pomoci identifikovat rozmezí optimální dávky. Přesná použitelná dávka ve formulaci bude také záviset na způsobu aplikace a vážnosti onemocnění nebo poruchy a měla by se určit na základě úvahy praktického lékaře a stavu pacienta. Vhodné rozmezí dávky v případě intravenózní aplikace je v obecném případě přibližně 20 až 500 mikrogramů aktivní sloučeniny na kilogram tělesné hmotnosti. Rozmezí vhodné dávky při intranasální aplikaci je v obecném případě přibližně 0,01 pg/kg tělesné hmotnosti až 1 mg/kg tělesné hmotnosti. Účinné dávky se mohou extrapolovat z křivky vyjadřující odezvu na dávku získanou z testovacích systémů *in vitro* nebo zvířecích modelů.

Vynález také poskytuje farmaceutický balíček nebo sadu, která obsahuje jeden nebo více kontejnerů naplněných jednou nebo více ingrediencí farmaceutických kompozic podle vynálezu. Ve spojení s takovými kontejnery je nutné poznamenat, že forma musí vyhovovat vládní agentuře regulující výrobu, použití nebo prodej léků nebo biologických produktů, které získaly povolení být aplikovány člověku.

Diagnóza a testování

Proteiny Nogo, analogy, deriváty a jejich subsekvence, nukleové kyseliny *Nogo* (a s nimi komplementární sekvence), protilátky proti *Nogo* nacházejí využití při diagnostice. Takové molekuly se mohou použít v testech, jako jsou imunologické testy, při detekci, prognóze, diagnostice nebo monitorování různých stavů, onemocnění nebo poruch, které ovlivňují expresi Nogo nebo monitorují jejich léčbu. Takové testy se zvláště provádějí způsobem, který zahrnuje kontakt vzorku získaného z pacienta s protilátkami proti Nogo za podmínek, při kterých může dojít k imunospecifickému navázání a detekci nebo měření množství libovolného imunospecifického navázání protilátek. Takové navázání protilátek v tkáňových sekcích se může použít při detekci lokalizace aberujícího proteinu Nogo nebo aberujícího množství proteinu Nogo (například malé množství nebo v případě, že není přítomen). Ve specifickém provedení vynálezu se protilátky proti proteinu Nogo mohou použít při testu v pacientově tkáni nebo vzorku séra, kdy se testuje přítomnost proteinu Nogo, kde aberující množství proteinu Nogo je indikace stavu onemocnění. Termín „aberující množství“ znamená zvýšené nebo snížené množství vztaheno na přítomné nebo standardní množství, které reprezentuje množství přítomné v analogickém vzorku z části těla nebo ze subjektu, který netrpí poruchou.

Používané imunologické testy zahrnují kompetitivní a nekompetitivní testovací systémy, které používají imunohistochemické, patologické metody, western přenosy, radioimunologické testy, test ELISA, sendvičové imunologické testy, imunoprecipitační testy, precipitační reakce, gelové difúzní precipitační reakce, imunodifúzní testy, aglutinační testy, testy fixující komplement, imunoradiometrické testy, fluorescenční imunotesty, imunohistochemické testy, imunotesty s proteinem A.

V hybridizačních testech se mohou také použít geny *Nogo* a příbuzné sekvence a subsekvence nukleové kyseliny zahrnující komplementární sekvence. Sekvence nukleové kyseliny *Nogo* nebo jejich subsekvence obsahující přibližně alespoň 8 nukleotidů se mohou použít jako hybridizační sondy. Hybridizační testy se mohou použít při detekci, prognóze a diagnostice nebo monitorování stavů, poruch nebo stádií onemocnění spojeného s aberujícími změnami v expresi proteinu Nogo a v aktivitě, jak se popisuje shora v textu. Takový hybridizační test je možné provést způsobem zahrnujícím kontakt vzorku, který obsahuje nukleovou kyselinu se sondou nukleové kyseliny,

kteřá je schopna hybridizovat DNA nebo RNA *Nogo* za podmínek, při kterých dojde k hybridizaci a detekci nebo měření libovolné výsledné hybridizace.

5 Ve specifických provedeních vynálezu se onemocnění a poruchy zahrnující buněčný růst a vývojové poruchy mohou diagnostikovat nebo se může testovat jejich očekávaná přítomnost nebo se může detekovat predispozice pro vývoj takových poruch detekcí zvýšeného množství proteinu Nogo, RNA Nogo nebo funkční aktivity proteinu Nogo, jak ukazuje inhibice růstu nebo detekce mutací v RNA, DNA nebo proteinu Nogo (například translokace v nukleových kyselinách, zkrácení genu nebo proteinu Nogo, změny v nukleotidové nebo aminokyselinové sekvenci vztážené k Nogo divokého typu), které způsobují zeslabení exprese nebo aktivity proteinu Nogo. 10 Takové onemocnění nebo poruchy zahrnují, ale nejsou omezeny na ty popsané shora v textu. Množství proteinu Nogo se může detekovat imunologickými testy, množstvím RNA Nogo se může detekovat hybridizačními testy (například northern přenos, dot bloty), navázání Nogo na buněčné růstové inhibiční proteinové receptory se může provést vazebnými testy, které jsou 15 běžně známy v oboru, translokace a bodové mutace v nukleových kyselinách Nogo se mohou detekovat Southernovými přenosy, analýzou RFLP, PCR za použití primerů, které přednostně tvoří fragment, který zahrnuje alespoň většinu genu Nogo, sekvenování genomové DNA nebo cDNA Nogo získané od pacienta atd.

20 Také se popisují sady pro diagnostické použití, které obsahují jeden nebo více kontejnerů protilátek proti Nogo a mohou obsahovat značeného partnera vázajícího se na protilátky. V jiném případě se protilátky proti proteinu Nogo mohou značit (s detekovatelnou značkou, například chemoluminiscenční, enzymatickou, fluorescenční nebo radioaktivní částí). Také se popisuje sada, která obsahuje v jednom nebo ve více kontejnerech sondu nukleové kyseliny, která je 25 schopna hybridizovat s RNA *Nogo*. Ve specifickém provedení sada může obsahovat v jednom nebo více kontejnerech pár primerů (například v rozmezí velikosti 6 až 30 nukleotidů), které jsou schopny vyvolat amplifikaci (například polymerázovou řetězovou reakcí (popisuje se v publikaci Innis et al., 1990, PCR Protocols, Academic Press, Inc., San Diego, CA), ligázová řetězová reakce (popisuje se v dokumentu EP 320,308) používá replikázu Q β , cyklickou reakci se sondou nebo jiné metody známé v oboru) za vhodných podmínek reakce alespoň části nukleové kyseliny *Nogo*. Sada může dále v kontejneru obsahovat předem stanovené množství čištěného proteinu Nogo nebo jeho nukleové kyseliny například jako standardní nebo kontrolní. 30

Testování agonistů a antagonistů Nogo

35 Nukleové kyseliny, proteiny a deriváty Nogo se také používají v testech vhodných pro detekci molekul, které specificky váží nukleové kyseliny, proteiny nebo deriváty Nogo a tak mají potenciální použití jako agonisté nebo antagonisté Nogo, zvláště molekuly, které tak regulují buněčný růst. V preferovaném provedení vynálezu testy slouží k testování molekul s potenciálním 40 použitím jako neurální růstové promotory při vývoji léků. Vynález tak popisuje testy vhodné pro detekci molekul, které se specificky váží na nukleové kyseliny, proteiny Nogo nebo jejich deriváty. Rekombinantní buňky exprimující nukleové kyseliny *Nogo* se mohou použít při rekombinantní produkci proteinů Nogo v uvedených testech, přičemž se testují molekuly, které se váží na protein Nogo. Molekuly (například putativní vazební partneři proteinu Nogo) přijdou do kontaktu s proteinem Nogo (nebo s jeho fragmentem) za podmínek podporujícího navázání a pak se identifikují molekuly, které se specificky váží na protein Nogo. Podobné metody se mohou použít k testování molekul, které se váží na deriváty Nogo nebo nukleové kyseliny. Metody, které se 45 mohou použít, jsou dobře známy v oboru.

50 Různé knihovny, jako je náhodná peptidová nebo kombinační peptidová nebo nepeptidová knihovna se mohou testovat za účelem zjištění přítomnosti molekul, které se specificky váží na protein Nogo. Může se použít řada knihoven, které jsou dobře známy v oboru. Jsou to například chemicky syntetizovaná knihovna, rekombinantní (například knihovna vykazujícího fága) a knihovna založená na translaci *in vitro*.

55

Příklady chemicky syntetizovaných knihoven se popisují v publikaci Fodor et al., 1991, Science 251: 767–773, Houghten et al., 1991, Nature 354: 84–86, Lam et al., 1991, Nature 354: 82–84, Medynski, 1994, Bio/Technology 12: 709–710, Gallop et al., 1994, J. Medicine Chemistry 37(9): 1 233–1 251, Ohlmeyer et al., 1993, proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10 922–10 926, Erb et al.,
 5 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11 422–11 426, Houghten et al., 1992, Biotechniques 13: 412, Jayawickreme et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 1 614–1 618, Salmon et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11 708–11 712, přihláška PCT č. WO 93/20242 a Brenner and Lerner, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5 381–5 383.

10 Příklady knihovny, která vykazuje fága, se popisuje v publikaci Scott and Smith, 1990, Science 249: 386–390, Devlin et al., 1990, Science, 249: 404–406, Christian, R. B., et al., 1992, J. Mol. Biol. 227: 711–718), Lenstra, 1992, J. Immunol. Meth. 152: 149–157, Kay et al., 1993, Gene 128: 59–65 a přihláška PCT č. WO 94/18318 s datem 18. srpna 1994.

15 Knihovny založené na translaci *in vitro* se popisují v dokumentu přihláška PCT č. WO 91/05058 s datem 18. dubna 1991 a v publikaci Mattheakis et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci USA 91: 9 022–9 026.

20 Nepeptidové knihovny, jako je například benzodiazepinová knihovna (popisuje se například v publikaci Bunin et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 4 708–4 712), se mohou upravovat, aby byly vhodné pro další použití. Dále se mohou také použít peptidové knihovny (popisuje se v publikaci Simon et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 9 367–9 371). Může se použít jiný příklad knihovny, kde amidové funkce v peptidech se předem methylovaly za vzniku chemicky transformované kombinační knihovny, jak se popisuje v publikaci Ostresh et al., 1994,
 25 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11 138–11 142).

Testování knihoven se může provést libovolnou z běžně známých metod. Testování peptidových knihoven se popisuje v publikaci Parmley and Smith, 1989, Adv. Exp. Med. Biol. 251: 215–218, Scott and Smith, 1990, Science 249: 386–390, Fowlkes et al., 1992, BioTechniques 13: 422–427,
 30 Oldenburg et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5 393–5 397, Yu et al., 1994, cell 76: 933–945, Staudt et al., 1988, Science 241: 577–580, Bock et al., 1992, Nature 355: 564–566, Tuerk et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6 988–6 992, Ellington et al., 1992, Nature 355: 850–852, patent US 5 096 815, patent US 5 223 409 a patent US 5 198 346, Ladner et al., Rebar and Pabo, 1993, Science 263: 671–673 a přihláška PCT č. WO 94/18318.

35 Ve specifickém provedení vynálezu se může provést testování tak, že se členové knihovny dostanou do kontaktu s proteinem Nogo (nebo nukleovou kyselinou nebo derivátem) imobilizovaným na pevné fázi a izoluje se ta knihovna, jejíž členové se vážou na protein (nebo nukleovou kyselinu nebo derivát). Příklady takových testovacích metod se popisují například v publikaci
 40 Parmley and Smith, 1988, Gene 73: 305–318, Fowlkes et al., 1992, BioTechniques 13: 422–427, přihláška PCT WO 94/18318.

V jiném provedení vynálezu se popisuje dvouhybridní systém vhodný pro selekci interakčního proteinu v kvasinkách (popisuje se v publikaci Fields and Song, 1989, Nature 340: 245–246,
 45 Chien et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88. 9 578–9582), který je možné použít k identifikaci molekul, které se specificky váží na protein nebo derivát Nogo.

Zvířecí modely

50 Vynález také popisuje zvířecí modely, které zahrnují modely myší, křečků, ovce, prasete, telete a upřednostňují se savci, kterým není člověk.

V jednom provedení vynálezu se popisují zvířecí modely onemocnění nebo poruch, které zahrnují pomnožení, růst a regeneraci neuritů. Takové zvíře může vznikat vyvoláním homologní rekombinace mezi genem Nogo ve svém chromozomu a exogenním genem Nogo, který není bio-
 55

logicky aktivní (upřednostňuje se začlenění heterologní sekvence například gen rezistence na antibiotika). V preferovaném provedení vynálezu se homologní rekombinace provede transformací kmenových buněk získaných z embrya (ES) vektorem, který obsahuje inzerci deaktivovaný gen *Nogo*, přičemž dochází k homologní rekombinaci, pak se buňky ES zavedou injekcí do blastocytu a blastocyty se implantují do náhradní matky. Pak následuje narození chimérického zvířete („knockoutované zvíře“), kde gen *Nogo* se deaktivoval (popisuje se v publikaci Capecchi, 1989, Science 244: 1 288–1 292). Chimérické zvíře se může křížit za vzniku dalších „knockoutovaných“ zvířat. Mezi taková zvířata patří myši, křečci, ovce, prasata, telata atd. a preferují se savci, kteří nejsou člověkem. Ve specifickém provedení vynálezu se produkuje „knockoutovaná“ myš.

Očekává se, že u takových zvířat dojde k vývoji onemocnění nebo poruch nebo taková zvířata mají predispozice k vývoji uvedeného onemocnění, která zahrnují centrální nervový systém a tak se mohou použít jako zvířecí modely vhodné pro takové onemocnění a poruchy, například při testování molekul (například potencionální terapeutická činidla pro léčbu poruchy nervového systému) za účelem zjištění jejich schopnosti inhibovat nádory nervové tkáně a tak léčit nebo předcházet takovým onemocněním nebo poruchám.

20 Přehled obrázků na výkresech

Obrázek č. 1a až 1b: (a) klony cDNA *Nogo*: CPW1–3 je klon bovinní cDNA izolovaný při testování knihovny cDNA bílé hmoty bovinní míchy s degenerovanými oligonukleotidy MSC5–8 (dané dohromady) a MSC9. Komplementární RNA získaná z tohoto klonu se následně použila při testování knihovny krysí cDNA. Oli3 a Oli8 se izolovaly z knihovny krysích oligodendrocytů s vneseným oligo d(T). R1–3U21, RO18U1 a RO18U37–3 se izolovaly z knihovny krysího mozku kmene/míchy s vnesenými hexanukleotidy (Stratagene). Polohy šesti bovinních peptidových sekvencí NI220 (bNI220) se označily na CWP1–3 a R13U21. Sekvence ve spojení různých exonů jsou označeny na vrcholu každého klonu. Otazníky u RO18U1 identifikují sekvenci na tomto klonu, který se napáruje se sekvencemi s libovolného jiného klonu *Nogo*. RO18U37–3 se sekvenoval pouze z 5'–konce a nesekvencovaná část je označena tečkami. (b) Schémata demonstrují hypotetický mechanismus tvorby tří transkriptů *Nogo*. P1 a P2 reprezentují putativní lokaci alternativních promotorů. Pro vytvoření tří transkriptů je nutný minimální počet tří exonů, ačkoli každý exon by mohl být potencionálně rozdělen na více exonů.

Obrázek č. 2a až 2b: (a) Nukleotidové (SEQ ID NO: 1) a aminokyselinové sekvence (SEQ ID NO: 2) transkriptu A genu *NogoI* (sekvence vytvořená spojením sekvencí cDNA RO18U37–3, Oli18 a R1–3U21). Oválný rámeček: předpokládaný iniciační kodon, podtrženo tečkami: kyselý pruh, potenciální místa PKC, ∇: potenciální místa kaseinové kinázy II, tlustě podtrženo: hydrofóbní oblasti C–konce a potencionální transmembránové oblasti, tenče podtrženo: potencionální místa A–glykosylace. (b) Porovnání peptidové sekvence mezi sekvenovanými, izolovanými bovinními sekvencemi NI220 (bNI220, SEQ ID NO: 3 až 8) a odpovídajícími bovinními sekvencemi (SEQ ID NO: 9 až 14) a krysími sekvencemi (SEQ ID NO: 15 až 20) překládanými z krysí a bovinní cDNA. Krysí a bovinní aminokyselinové sekvence, které se nepárují s peptidovými sekvencemi bNI220 jsou v nižším rámečku.

Obrázek č. 3a až 3b: (a) Porovnání aminokyselinové sekvence 180 aminokyselinových oblastí C–konce NSP (lidská, SEQ ID NO: 21), S–REX krysí, SEQ ID NO: 22), CHS–REX (kuřecí, SEQ ID NO: 23), NOGOBOV (bovinní, SEQ ID NO: 24), NOGORAT (krysí, SEQ ID NO: 25) a klon EST *E.elegans* (WO6A7A, SEQ ID NO: 26) a klon EST *D. melanogaster* (US51048, SEQ ID NO: 27). (b) Evoluční konzervovanost dvou hydrofóbních oblastí. Na obrázku je zobrazeno procento podobnosti s jinými druhy nebo v jednom druhu běžných hydrofóbních oblastí. Stínovaným písmem: konzervativní aminokyseliny.

Obrázek č. 4a až 4c: (a) Northern hybridizace různých tkání s běžnou sondou *Nogo*. Běžná sonda obsahuje transkript A sekvence mezi nukleotidy 2 583 až 4 678. Zkratka ON znamená zrakový nerv a zkratka SC znamená míchu. Symbol C znamená cerebrální kortex. Zkratka DRG znamená dorzální kořeny ganglií. Zkratka SN znamená ischiatický nerv. PC12 označuje buněčnou linii PC12. (b) Northern hybridizace RNA míchy a buněk PC12 se sondou specifickou pro exon 1 (levý panel) a zadní mozek (HB) a RNA skeletálního svalu (M) se specifickou sondou exonu 2 (pravý panel). (c) Northern hybridizace se sondou běžnou pro *Nogo*. Symbol K znamená ledviny. Symbol B znamená chrupavku z prsní kosti). Zkratka Sk znamená kůži. Symbol M znamená skeletální sval. Symbol Lu znamená plíce. Symbol Li znamená játra a symbol Sp znamená slezinu. Označily se tři hlavní transkripty (4,6 kb, 2,6 kb a 1,7 kb). Symbol ∇ značí difúzní, ale konzistentní pruh o přibližné velikosti 1,3 kb.

Obrázek č. 5a až 5f: Hybridizace in situ míchy a sekcí malého mozku dospělých krys. (a,d). Řadu oligodendrocytů (OL) v míše a v bílé hmotě malého mozku je možné vidět po označení *Nogo* „antisense“ běžnou ribosondou. To je velmi podobné pro signály detekované v případě, že konsekutivní sekce míchy hybridizovala s „antisense“ ribosondou (b). (c) Neurony v šedé kůře (GM) jsou také značeny *Nogo* „antisense“ běžnou ribosondou. Zkratka WM znamená bílou mozkovou hmotu. Jasně pole a fluorescenční pohled sekce malého mozku dvojité značené *Nogo* „antisense“ běžné ribosondy (e) a anti-GFAP protilátkou (f). Buňky Perkinje (dvojitá šipka) jsou silně značeny sondou *Nogo*, zatímco astrocyty (černobílá šipka) jsou negativní. Několik buněk granulórní buněčné vrstvy (Gr) je také značeno sondou *Nogo*. Symbol m znamená molekulovou vrstvu. Měřítko: a, b, d–f: 50 p.m. a c: 280 p.m.

Obrázek č. 6a až 6i: In situ hybridizace zrakových nervů v různých dnech postnatálního (a, f: P0, b, g: P3, c, h: P7, d, e, i: P22) období buď se sondami *Nogo* nebo *plp* (antisense nebo sense). (a–d) antisense sonda *Nogo*, (e) sense sonda *Nogo*, (g–i) antisense sonda *plp*, (f) sense sonda *plp*. Expresí genu *Nogo* v prekurzorech oligodendrocytů se může detekovat už v časové fázi P0, zatímco exprese *plp* začíná být detekovatelná už ve fázi P3 ve zrakovém nervu blízko chiazma (g).

Obrázek č. 7: Protílátky AS Bruna a AS 472 rozeznávají protein myelin o přibližné velikosti 200 kD. Příprava extraktu krysího proteinu myelin a bovinního proteinu q-pool se popisuje v publikaci Spilmenn et al., 1998, J. Biol. Chem., 273(30): 19 283–19 293. Protílátky AS Bruna a AS 472 rozeznávají pruh o velikosti 200 kD, stejně jako několik menších pruhů v bovinním myelinu, které se mohou štěpit produkty bNI220. Protílátky AS Bruna obarvily v krysím proteinu myelin pruh odpovídající velikosti 200 kD. Symbol I znamená protílátky AS Bruna. Symbol P označuje protílátky AS Bruna preimunizační sérum. Symbol E značí protílátky AS 472 čištěné na základě afinity.

Obrázek č. 8a až 8i: Imunohistochemie provedená s krysí míchou a malým mozkiem za použití protilátek IN-1 (a–e), AS Bruna (d–f) a AS 472 (g–i), jak je zobrazeno na levé části každého panelu. Silné zbarvení proteinu myelin se pozorovalo v obou tkáních za použití všech tří protilátek, kdy zmrazené sekce se fixovaly se směsí ethanolu/kyseliny octové (a, b, c, d, e, g, h). Ošetření sekcí methanolem odstranilo obarvení myelinem s výjimkou těla buněk oligodendrocytů (šipky, c, f, i). Hrot špičky: buňky Purkinje, WM, bílá hmota; GM, šedá hmota, DR: dorzální kořeny; Gr vrstva granulórních buněk; m, molekulární vrstva. Měřítko: a, d, g: 415 μm, b, c, e, f, h, i: 143 μm.

Obrázek č. 9a až 9d: Obrázky znázorňují neutralizační aktivitu protilátek AS 472 a AS Bruna v různých biotestech. (a) Fibroblasty NIH 3T3 se nanasly na buněčné kultivační misky s proteinem q-pool a předem ošetřené protilátkou IN-1, AS Bruna, AS 472 nebo odpovídajícím pre-imunitním sérem. Polyklonální sérum vykazuje dokonce o trochu lepší neutralizaci inhibičního substrátu ve srovnání s protilátkou IN-1. Pre-imunitní séra nevykazují podstatný účinek na rozšíření buněk NIH 3T3. Přidání přebytku peptidu (P472), který se použil ke vzniku protilátek AS 472 soutěžil s neutralizační aktivitou, zatímco nespecifický peptid (Px) nevykazoval žádný

účinek. (b) Když se inhibiční substrát ošetřil předem protilátkami AS Bruna nebo AS 472 vedlo to ke vzniku výrůstků neuritů DRG, který je srovnatelný s tím, co se pozorovalo na laminárním substrátu. Příklady vyrůstání neuritů z DRG na q-pool předem ošetřených PBS (c, skóre = 0) a předem se ošetřil protilátkami AS Bruna (d, skóre = 4).

5

Obrázek č. 10a až 10d: Injekce explantátů zrkového nervu s AS 472 vede k růstu axonů. (a) Získaly se páry zrkových nervů dospělé krysy, injekcí se do nich zavedla protilátka AS 472 nebo preimunní sérum a nechaly se kultivovat tak, že jeden konec nervů byl v kontaktu s disociovanými P0 krysích DRG neuronů. (b) Po dvou týdnech *in vitro* se odřízly sekce EM nervů ve vzdálenosti 3,5 mm od odříznutého místa (šipky v panelu A a systematicky se hledaly neporušené axony (3 experimenty). (c) Snopce regenerovaných axonů (šipky) prorůstají degenerovaným zrkovým nervem po injekci s protilátkami AS 472. (d) Regenerující axony v kontaktu s proteinem myelin. Zvětšení: c, 12 000x, d: 35 000x.

Obrázek č. 11a až 11c: Expresie rekombinantního proteinu Nogo A v transfekovaných buňkách COS. (a) Western blot vykazující imunoreaktivitu protilátek AS Bruna s rekombinantním proteinem Nogo A (dráha 2) a endogenní Nogo A z primárních kultivovaných krysích oligodendrocytů (dráha 3). Hybnost těchto dvou proteinů je na 5% denaturačním gelu SDS skoro shodná s fragmenty o velikosti 200 kD. Kontrolní vzorek transfekovaný konstrukcí LacZ (dráha 1) nevykazuje imunoreaktivitu s protilátkou AS Bruna. Stejný blot se také testoval protilátkou anti-myc 9E10. Pruh, který reagoval s protilátkou AS Bruna také reagoval s protilátkou anti-myc tag 9E10 (dráha 5), zatímco endogenní protein Nogo A nereagoval (dráha 6). Kontrolní vzorek transfekce LacZ vykazoval očekávaný pruh o přibližné velikosti 118 kD (dráha 4). Buňky COS dočasně transfekované konstrukcí Nogo A s dvojitě obarvily protilátkou AS Bruna (b) a IN-1 (c). Buňky pozitivně obarvené protilátkou AS Bruna byly také pozitivní s protilátkou IN-1.

25

Obrázek č. 12: Nukleotidová sekvence (SEQ ID NO: 28) bovinní cDNA genu *Nogo*.

Obrázek č. 13: Aminokyselinová sekvence krysího proteinu Nogo A (SEQ ID NO: 2) se porovnávala s teoretickou aminokyselinovou sekvencí lidského Nogo (SEQ ID NO: 29). Aminokyselinová sekvence lidského proteinu Nogo se odvodila z uspořádání exprimované sekvence tags (EST) spolu se sekvencí krysího Nogo a překládala se do uspořádaného lidského ETS za použití krysího Nogo jako templátu.

30

Obrázek č. 14 zobrazuje sekvenci nukleové kyseliny krysího Nogo C (SEQ ID NO: 31) a jeho odpovídající aminokyselinovou sekvenci (SEQ ID NO: 32).

35

Obrázky č. 15a až 15e zobrazují, že protein Nogo A je přítomen v plazmatické membráně oligodendrocytů, jak se prokazuje imunocytochemií a biotinylací buněčného povrchu oligodendrocytů v kultuře.

40

Imunocytochemie (a–d): Oligodendrocyty získané ze zrkového nervu krys P10 se disociovaly a kultivovaly po dobu dvou dní. Barvení živých buněk monoklonální protilátkou IN-1 (a) nebo AS 472 (c) vykazují imunoreaktivitu na těla oligodendrocytů. V přítomnosti soutěžícího peptidu P472, AS 472 došlo pouze k zabarvení pozadí (všechny typy buněk) (d). Podobné nespecifické barvení bylo možné vidět, když se vynechaly primární protilátky (b).

45

Hodnocení: Destičky zakódované číslem se náhodně mixovaly a klasifikovaly třemi nezávislými pozorováními. Osm z deseti destiček se správně klasifikovaly jako AS 472 pozitivní, IN-1 pozitivní a v případě všech tří pozorování se provedly kontroly.

50

Biotinylace (e): Kultury celého mozku krys P4 bohaté na oligodendrocyty se na buněčném povrchu značily biotinovým činidlem, které po sedmi dnech v kultuře prochází membránou. Následně se buněčné homogenáty ošetřily Dynabeads se streptavidinem. Sraženina (Ppt) a supernatant (sup) testovaly na membráně protilátkou AS 472, přičemž vykazují odlišný proteinový

55

patern: Buněčný povrchový protein Nogo A zjištěný ve sraženině vykazuje vyšší zjevnou molekulovou hmotnost ve srovnání s vnitrobuněčným proteinem Nogo A. Tento posun je pravděpodobně způsoben glykosylací. Luminální ER protein BiP a většina β -tubulinu se mohou zjistit pouze ve vnitrobuněčné frakci.

5

Obrázek č. 16a až 16j: Funkční testy ukazují přítomnost proteinu Nogo A na buněčné membráně oligodendrocytů. Preinkubace kultur zrakového nervu s protilátkou AS 472 (a, b) umožňuje fibroblasty NIH 3T3 rozšířit se přes vysoce větvené oligodendrocyty, které jsou nastíněny imuno-
 fluorescenčním barvením, kdy se testuje přítomnost GalC (protilátky 01) (a). Šipky
 10 v odpovídající fázi kontrastního zobrazení (b) indikují fibroblasty NIH 3T3 rozseté na povrchu oligodendrocytů (c, d); kdy protilátka AS 472 se přidala spolu s P472, přičemž fibroblasty NIH 3T3 se striktně vyhýbají oblastem oligodendrocytů pozitivních na GalC (šipka) (popisuje se v publikaci Caroni and Schwab, 1988 Neuron 1: 85–96). (e, f): V přítomnosti protilátky AS472 P0 kryší disociované DRG neurony jsou schopny rozšířit neurity přes oblast vysoce roz-
 větvených oligodendrocytů (šipka na obrázku 16f). (g, h): Peptid P472 účinně soutěží
 15 s neutralizační aktivitou AS 472: neurity se zcela vyhýbají oligodendrocytům. Protilátka AS 472 užívaná v těchto experimentech se vytvořila proti kryší peptidové sekvenci 472. (i, j): Kvantifikace těchto výsledků (jak se popisuje v metodách) demonstruje silnou neutralizační aktivitu protilátek AS 472 v obou typech testů. Měřítka 40 μ m.

20

Obrázek č. 17a až 17e: Rekombinantní protein Nogo A je inhibiční substrát a jeho inhibiční akti-
 vita je neutralizována monoklonální protilátkou IN-1. Extrakty bohaté na RecNogoA pocházející
 ze stabilní buněčné linie CHO–Nogo A nebo β -galaktozidáza izolovaná paralelně ze stabilní
 buněčné linie CHO–LacZ se použily v případě testů nanesení fibroblastů NIH 3T3 a růstu neuritů
 25 DRG. (a) Stříbrný gel myc–his–značený recLacZ (dráha 1) a recNogo A (dráha 2) vykazuje pruh Nogo A o velikosti 180 kD. Shoda pruhu Nogo A se potvrdila western přenosem inkubovaným s protilátkou AS Bruna (dráha 3) a anti–myc protilátkou 9E10 (dráha 4). (b) Plotny potažené RecNogo A jasně inhibovaly rozšíření buněk NIH 3T3. Předchozí inkubace s monoklonální protilátkou IN-1 nebo s AS Bruna vedla k vysoce podstatné neutralizaci (p je menší než 0,01) inhi-
 30 biční aktivity. 1 μ m kontrolních monoklonálních protilátek 01 a preimunní séra nebyla účinná. Extrakt CHO–LacZ vykazuje částečně inhibiční účinek na buňky NIH 3T3, což je pravděpodobně způsobeno endogenními proteiny CHO. Tato inhibiční aktivita nebyla ovlivněna předchozí inkubací s protilátkou.

(c) Při růstových testech neuritů DRG se smíchal s lamininem stejný proteinový materiál jako
 35 v případě (b) a směs se použila k potažení. RecNogo A vykazuje velmi silný inhibiční účinek na růst neuritů v disociovaném DRG způsobem závislým na dávce. Aktivita se neutralizovala monoklonální protilátkou IN-1 (p je menší než 0,001), ale nikoli kontrolní monoklonální protilátkou 01. Proteinový materiál z buněk CHO–LacZ nepůsobil inhibičně v libovolně použité koncentraci. Příklady skóre jsou zobrazeny na obrázku (d): 1 μ m recNogo A, žádné nebo krátké neurity (šipka), skóre 2 a na obrázku (e): 1 μ m CHO–LacZ, dlouhé, větvené neurity (šipka) skóre 5 až
 40 6. Statistická analýza za použití Studentského testu t. Měřítka 280 μ m.

Na obrázku č. 18 je znázorněna funkční analýza mutantů s delecí Nogo. Následující deleční konstrukce kódující fúzní proteiny obsahující fragmenty Nogo nebo zkrácené části Nogo (jak se
 45 uvádí dále v textu) se vytvořily jak se popisuje dále v textu.

Nogo–A: His–tag/T7–tag/vektor/Nogo–A seq. ak1–1162
 Nogo–B: His–tag/T7–tag/vektor/Nogo–A seq ak–171+975–1162
 50 Nogo–C: His–tag/T7–tag/Nogo–C N–konec (11 ak) + Nogo–A seq ak975–1162
 NiAext: His–tag/T7–tag/Nogo–A seq ak172–974/His–tag
 EST: His–tag/T7–tag/Nogo–A seq ak760–1162
 NiG–D1: His–tag/T7–tag/Nogo–A seq ak172–908/vektor
 NiG–D2: His–tag/T7–tag/Nogo–A seq ak1722–866/his–tag

- NiG-D3: His-tag/T7-tag/Nogo-A seq ak172-734/His-tag
 NiG-D4: His-tag/T7-tag/Nogo-A seq ak172-646/His-tag
 NiG-D5: His-tag/T7-tag/Nogo-A seq ak291-646/His-tag
 NiG-D7: His-tag/T7-tag/Nogo-A seq ak172-234+292-974/His-tag
 5 NiG-D8: His-tag/T7-tag/Nogo-A seq ak172-628
 NiG-D9: His-tag/T7-tag/Nogo-A seq ak172-259+646-974/His-tag
 NiG-D10: His-tag/T7-tag/Nogo-A seq ak291-974/His-tag
 NiG-D14: His-tag/T7-tag/Nogo-A seq ak172-259
 NiG-D15: His-tag/T7-tag/Nogo-A seq ak172-189+491-974/His-tag
 10 NiG-D16: His-tag/T7-tag/Nogo-A seq ak172-189+619-974/His-tag
 NiG-D17: His-tag/T7-tag/Nogo-A seq ak172-189+257-974/His-tag
 NiG-D18: His-tag/T7-tag/Nogo-A seq ak172-189+261-974/His-tag
 NiG-D20: His-tag/T7-tag/Nogo-A seq ak542-722/His-tag

- 15 Čísla aminokyselin (ak) jsou založena na číslování aminokyselinové sekvence Nogo A (SEQ ID NO: 2) začínající prvním metioninem. His-tag a T7-tag obsahuje 34 aminokyselin. N-a C-terminální vektorové sekvence se získaly z expresního vektoru pET28.

20 Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Charakterizace nukleotidu a proteinového produktu genu *Nogo*

- 25 Zde popsané příklady demonstrují, že klonovaný gen *Nogo* kóduje protein, který je silný inhibitor růstu neurálních buněk a je také rozeznáván monoklonálními protilátkami popsanými v dokumentu Schwab et al., patent US 5 684 133.

Materiály a metody

- 30 V následující sekci se popisují materiály a metody používané podle vynálezu. Odborník ví, že uvedené materiály a metody jsou toliko ilustrativní a je možné provést jejich modifikace. Takové modifikace jsou také předmětnou věcí vynálezu.

- 35 Izolace bovinního proteinu Nogo z myelinu

- 40 Všechny kroky čištění se provádějí při teplotě 4 °C a inhibiční aktivita substrátu získaných frakcí se rutinně stanovila rozšířením buněk NIH 3T3 a testem nadměrného růstu neuritů PC12 (popisuje se dále v textu). Z tkáně bovinní míchy se opatrně odstranily mozkové blány a nakrájela se na malé kousky. Myelin se pak extrahoval v extrakčním pufru (60 mM CHAPS, 100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10mM pufr EDTA pH 8,0, 2,5 mM jodacetamid, 1 mM fenylmethylsulfonylfluorid, 0,1 µg/ml aprotininu, 1 µg/ml leupeptinu, 1 µg/ml pepstatinu 1).

- 45 Aby se získal míšňí extrakt, tkáň se homogenizovala přímo v extrakčním pufru CHAPS v poměru (1:1, hmotnost:objem). Homogenát se centrifugoval dvakrát při 100 000 x g (Kontron, typ: K50.13, fixovaný úhel rotoru) po dobu jedné hodiny při teplotě 4 °C. Čistý supernatant (extrakt) se bezprostředně aplikoval na kolonu Q-sefaraža (2,6 x 11,5 cm) a uvedl se do rovnováhy pufrům A (20 mM Tris-Cl, pH 8,0, 0,5 % (hmotnost/objem) CHAPS). Vázané proteiny se eluovaly pětinasobným objemem lineárního gradientu od 0 do 1M NaCl v pufru A (100 ml gradient v 50 minutách). Aktivní frakce obsahující bovinní NI220 se eluovaly při přibližné koncentraci 0,4M NaCl a slily se (q-pool 1) a pak se nanosly na kolonu Superdex 200 (2,6 x 60 cm), která se uvedla do rovnováhy pufrům B (150 mM NaCl, 20 mM Tris-Cl, pH 8,0, 0,5 % (hmotnost/objem) CHAPS).
- 50

Aktivní frakce se po gelové filtraci (s-pool 1) separovaly 6 % SDS-PAGE za redukčních podmínek a s nízkou konstantní silou (2 watty na gel) při celkové hodnotě 2 500 Volt-hodin. Pruhy a oblasti gelu se identifikovaly po obarvení Coomassiovou modří (0,1 % hmotnost/objem R250 v 50% methanolu a 10% kyselině octové), vyřízly se a extrahovaly se v 800 µl gelového elučního pufu (0,5 % (hmotnost/objem) CHAPS, 20 mM Tris-Cl, pH 8,0, 10 mM EDTA, pH 8,0, 2,5 mM jodacetamid, 1 mM fenylmethylsulfonylfluorid, 0,1 µg/ml aprotininu, 1 µg/ml leupeptinu, 1 µg/ml pepstatinu A) po dobu alespoň 48 hodin při teplotě 4 °C.

Mikrosekvence izolovaného proteinu Nogo

Na 10% SDS polyakrylamidovém gelu za redukčních podmínek se opět provedla separace materiálu eluovaného z několika neutralizovatelných aktivních gelů IN-1 a polyakrylové gely se obarvily 0,1 % (hmotnost/objem) Coomassiovou modří R250 v 50% methanolu a 10% kyselinou octovou. Pruh o molekulové hmotnosti 220 000 se vyřízl a štěpení endoproteinázou Lys-C (v molárním poměru 1:50) se provedlo přímo v gelu. Vzorek se okyselil a aplikoval se na kolonu vysokovýkonné kapalinové chromatografie a peptidy se separovaly lineárním gradientem (0–100) 0,04% kyseliny trifluoroctové a 80% acetonitrilem a frakce obsahující jedině druh peptidu se vystavily automatizované degradaci podle Edmana.

Elektroforéza izolovaného proteinu Nogo

SDS-PAGE s vysokým rozlišením se provedla za použití 6% (hmotnost/objem) SDS-polyakrylamidových gelů (10 x 24 x 0,01 cm) za redukčních podmínek (100mM dithiotreitol). Přenos na membrány Immobilon-P (Millipore) se provedl v 20mM Tris bázi, 192mM glycinu, pH 8,3, 0,03% (hmotnost/objem) SDS, 20% methanolu se semisuchým transferovým přístrojem (Bio-Rad, Trans Blot SD). Čas přenosu byl 2 hodiny při 0,8 mA/cm². Blokační činidlo (1 hodina při teplotě místnosti) byla 3% želatina v PBS (fyziologický roztok puřovaný fosforečnanem, pH 7,2, 8 g NaCl, 0,2 g KH₂PO₄, 2,8 g Na₂HPO₄ · 12H₂O a 0,2 g KCl, rozpuřtěný v jednom litru vody) a promývací roztok obsahoval 20 mM Tris-Cl, pH 7,5, 150 mM NaCl a 0,4% Tween (3 x 10 minut při teplotě místnosti). Inkubace v případě první protilátky (pro ředění 1 % želatiny v PBS) se provedla obvykle přes noc při teplotě 4 °C. Sekundární protilátka anti-myří IgG konjugovaná s křenovou peroxidázou (1 : 2 000) se inkubovala po dobu jedné hodiny při teplotě místnosti. Při detekci se použil chemoluminiscenční systém ECL (Amersham Pharmacia Biotech).

Testování cDNA knihovny sondou

Bílá hmota čerstvě získaná z bovinní míchy a poly(A)⁺RNA se extrahovala za použití sady Fast-Track (Invitrogen). Konstrukce knihovny cDNA se uskutečnila za použití sady Uni-ZAP (Stratagene) podle instrukcí výrobce. Komplexnost knihovny byla větší než 4 x 10⁶ jednotek tvořících plaky celkem a průměrná velikost inzertů byla přibližně 1,8 kilobáze.

Degenerované oligonukleotidy MSC5–8 (MSC5:

TCIGTIGGYAAIACIGCIGGYAARTC (SEQ ID NO:47); MSC6:

TCIGTIGGLAGIACIGCIGGYAAYTC (SEQ ID NO:48); MSC7:

TCIGTIGGYAAIACIGCIGGIAGRTC (SEQ ID NO:49); MSC8:

TCIGTIGGLAGIACIGCIGGIAGRTC (SEQ ID NO:50))

se vytvořily ze sekvence peptidu 1 bNI220 a MSC9 (GARATHGCIGAIATHCARGAYGGIGA (SEQ ID NO: 51)) se vytvořily ze sekvence peptidu 2 bNI220. Oligonukleotidy se syntetizovaly pomocí MWG Biotech (Munchestein, Švýcarsko) a značily se značícím kitem „DIG DNA 3'-end“. Ribonukleové sondy se syntetizovaly za použití značící sady DIG RNA (Boehringer Mannheim).

Použila se hybridizace sondy a podmínky promývání, jak je popisuje výrobce (MSC5–8 a MSC9 se použily při hybridizaci a teplota promývání je 57 °C). Detekce sondy se uskutečnila za použití systému CDP–star (Boehringer Mannheim). Používání a testování knihovny cDNA se provádí podle protokolů vhodných pro knihovny cDNA lambda ZAP (Stratagene). Při přenosu plaků se použily nylonové membrány „Genescreen“ (DunPont).

Sekvenování DNA

Oba řetězce CWP1–3, Oli18, Oli3 a R1–3U21 se sekvenovaly za použití systému Perkin Elmer AB1377 pomocí Microsynth (Balgach, Švýcarsko). Sekvence DNA se analyzovaly pomocí programu DNASIS (hitachi). Vyhledávání v databázi se provedlo za použití programu BLAST (NCBI).

Analýza RNA

Celková RNA a poly(A)⁺RNA se extrahovaly z tkání za použití „RNAgent“ (Promega) nebo sady „FastTrack“ (Invitrogen). RNA se separovaly elektroforézou na 1% formaldehydovém gelu a přenesly se na membrány Genescreen. Bloty se hybridizovaly s antisense ribonukleovými sondami, které se vytvořily pomocí značícího kitu DIG RNA (Boehringer Mannheim) z relevantních plazmidů. Hybridizace blotů, promývání a podmínky detekce za použití kitu „CDP–star“ jsou popsány výrobcem. „Běžná“ sonda EST111410 (TIGR, ATCC, Rockville, MD, USA) obsahuje transkript A sekvence mezi nukleotidy 2 535–4 678, sonda specifická pro exon 1 obsahuje transkript A sekvence mezi nukleotidy 65–769 a sonda specifická pro exon 2 obsahuje transkript A sekvence mezi nukleotidy 815–3 183.

Produkce antiséra

Antisérum 472 (AS 472) se připravilo ve firmě Research Genetics, Inc. (Huntsville, AL, USA) proti syntetickému peptidu P472, SYDSIKLEPENPPYEEA (bovinní sekvence, SEQ ID NO: 33), který odpovídá aminokyselinové sekvenci krysího proteinu Nogo v poloze 623 až 640 SEQ ID NO: 2 se třemi nesprávnými páry.

Antisérum Bruna (AS Bruna) se vytvořilo proti fragmentu rekombinantního proteinu Nogo, který se exprimuje v mikroorganismu *E. coli* jako fúzní protein. Specificky C–konec nukleotidové sekvence krysího Nogo A kódující aminokyseliny 762 až 1 163 sekvence SEQ ID NO: 2 (expresovaný v mikroorganismu *E. coli* za použití systém Novagen pET) se použil při tvorbě antiséra A Bruna proti proteinu Nogo.

Elektroforéza a western přenos

SDS–PAGE a western přenos se provedl za použití standardních metod, které jsou dobře známy v oboru. Protilátky se ředily následovně: AS Bruna 1:7 500, AS 472 1:2 000, anti–myc(9E10) 1:5 000 (Invitrogen), anti–BiP 2 µg/ml (Stressgen), supernatant hybridomu mAb IN–1 se použil neředěný. Jako sekundární protilátky se použily: antikráličí protilátky konjugované s HRP (Pierce, 1:20 000), antimyší IgM (1:50 000) a anti–myšší protilátky konjugované s alkalickou fosfatázou (Analytica AG, La Roche, Švýcarsko, 1:5 000).

Imunohistochemické metody

Z dospělých krys se rychle vyňala mícha a cerebellum, ponořily se do OTC a zamrazily se při teplotě –40 °C. Dvacet posmrtných sekcí se nařezalo a fixovaly se směsí ethanolu a kyseliny octové při teplotě 40 °C. Provedlo se imunologické barvení, jak se popisuje v publikaci Rubin et al., 1994, *J. Neurocytol.* 23: 209–217 s výjimkou vypuštění kroku rychlého chlazení. V jiném případě se tkáňové sekce fixovaly methanolem (po dobu 2 minuty při teplotě –20 °C) a provedlo

se imunologické barvení, jak se popisuje v publikaci Rubin et al., 1994, J. Neurocytol. 23: 209–217. Jako primární protilátky se použily (protilátka: (ředění)): supernatant hybridomu IN–1: (neředěno), AS Bruna: (1:5 000) nebo afinitně čištěné AS 472 (1:50).

5 Test rozšíření fibroblastů NIH 3T3

Fibroblasty NIH 3T3 se nanosly na kultivační plotny potažené 5 mikrogramy na jednu prohlubeň (=1 cm²) q–pool. Q–pool jsou smíchané aktivní frakce extraktu bovinní míchy separovaného na koloně Q sefaroza. IN–1 se použily jako naředěný supernatant kultury a AS 472 a pre–imunizované sérum se ředilo v poměru 1:500 v PBS. Aby se kompenzovaly výchyly aktivity u různých q–pool, množství buněk nanosených na q–pool se normalizovalo na 100 % a na 0 % nanosených na kontrolní pufr (popisuje se v publikaci Spillman et al., 1998, J. Biol. Chem. 273: 19 283–93).

15 Test růstu neuritů DRG

Ganglie dorzálních kořenů (DRG) se vyňaly z embryí kuřat E16 a daly se do Hankova roztoku s vyváženými solemi (HBSS), rozdělily se na části a nanosly se na plotny předem potažené q–pool ve 100 µl média F12 s 10 % (FCS) a 1% metocelem. Výrůstky neuritů z jednotlivých ganglií dorzálních kořenů se hodnotily po 24 hodinách při teplotě 37 °C semi–kvantitativním způsobem za použití měřítka od 0 (žádné výrůstky) do 4 (maximální výrůstky).

Ko–kultivační test DRG a zrakového nervu

Zrakové nervy se vyňaly z dospělých krys, ozářily se 5 500 Gray a injekcí se aplikovalo sérum AS 472 nebo odpovídající preimunizované sérum (ředění 1:10). Páry nervů se kultivovaly ve 3–komorových kulturách tak, že jeden konec každého nervu dosahoval přes silikonový tuk/teflonovou kruhovou bariéru do střední komory, kde se umístily disociované kultivované primární neurony DRG z krys P0. Po dvou týdnech v kultuře se tyto nervy fixovaly metodami, které jsou dobře známy v oboru a fixovaly se způsobem vhodným pro elektronovou mikroskopii (EM) a připravily se ultratenké sekce ve vzdálenosti 3,5 mm DRG exponovaného kořene. Sekce se systematicky analyzovaly za účelem zjištění přítomnosti znovu rostoucích axonů za použití mikroskopu Zeiss EM 902.

35 Exprese Nogo v buňkách COS

Otevřený čtecí rámec Nogo A se subklonoval do vektoru pcDNA3.1mychis (Invitrogen) za použití standardních klonovacích metod, které jsou dobře známy v oboru. Výsledný plazmid (NOGO–myc19) dává vzniku rekombinantního proteinu, který obsahuje sekvenci Nogo A fúзованou s myc–his Tag (21 aminokyselin). Nogo–myc19 (2 µg DNA na plotnu o průměru 35 mm) nebo kontrolní plazmid (pcDNAMychisLacZ) se transfekovaly do buněk COS za použití kitu „Superfact“ (Qiagen) podle protokolu výrobce. Na základě imunofluorescenčního barvení s protilátkou anti–myc a enzymatickou barevnou reakcí s β–galaktozidázou se odhadl průměrný poměr transfekce na hodnotu přibližně 20 %. Transfekované buňky COS se fixovaly směsí 95 % ethanolu a 5% kyselinou octovou (při teplotě 4 °C po dobu 25 minut), blokovaly se směsí PBS a 10 % FCS a inkubovaly se sérem AS Bruna (v ředění 1:200) nebo IN–I (v ředění 1:2) po dobu 2 hodin ve směsi PBS a 1% FCS při teplotě místnosti. Buňky se promyly PBS a při detekci IN–1 se použily koží protilátky anti–myš–TRITC (popisuje se v publikaci Jackson Immuno Research Lab. Inc., West Grove, PA).

50 Kultury oligodendrocytů

Oligodendrocyty izolované z mozku nově narozených krys se umístily do polylyzinových nádob o objemu 75 cm² (Sigma, St. Louis, MO) a kultivovaly se po dobu 10 až 12 dní v DMEM doplněném 5 % FCS. Obohacená smáčená populace oligodendrocytů a jejich potomci se uvolnily z astrocytové monovrstvy mícháním přes noc při 210 otáčkách za minutu v orbitální míchačce.

Buňky se nanaly na plotnu při hustotě 1 až 2 x 10⁶ buněk o ploše 35 cm² potažené polylyzinem. Potomstvo se nechalo diferenciovat v chemicky definovaném médiu (CDM) po dobu 3 až 4 dní.

Biotinylace buněčného povrchu

5 Přípravily se kultury celého mozku krys P4, jak se popisuje v publikaci van der Haar, et al., (1998, J. Neurosci, Res. 51: 371–81). V den 7 *in vitro* se biotinylovaly s EZ–LINK–Sulfo–NHS–LC–Biotin (Pierce), který nevstupuje do buněk podle popsaného postupu s výjimkou, že všechny kroky se prováděly při teplotě 15 °C a buňky se lyzovaly v 1 ml lyzačního pufru (0,05 M NaH₂PO₄ pH 8,0, 0,15 M NaCl, 0,5% CHAPS (Sigma), 2,5 mM jodacetamid, 1mM fenylmethylsulfonylfluorid, 0,1 µg/ml pepstatinu A). Biotinylované proteiny se imunologicky srážely pomocí přípravku Dunabeads M–280 Streptavidin (Dynal), provedla se s nimi analýza SDS–Page a přenesly se na nitrocelulózoové membrány, které se testovaly použitím AS472, α–BiP a α–β–tubulinu. Membrány se stripovaly za použití sady Re–Blot Western Blot Recykling (Chemicon).

15 Imunocytochemické metody

Oligodendrocyty zrakového nervu se připravily způsobem, který se popisuje v publikaci Achwab and Caroni, 1988, J. Neurosci. 8: 2 381–2 393). Dva dny staré kultury se inkubovaly se sérem AS 472 (v ředění 1:200) nebo monoklonální látky IN–1 (v ředění 1:3) po dobu 25 minut při teplotě místnosti (RT). Kultury se promyly, fixovaly směsí 4% paraformaldehydu a 5% sacharózy v PBS a blokovaly se směsí 0,1M kyseliny maleové a 2% blokačního činidla (Boehringer Mannheim) po dobu 1 hodiny. Sekundární protilátky konjugované s alkalickou fosfatázou (Milan Analytica) se použily v ředění 1:7 500 ve směsi 0,1M kyseliny maleinové a 1% blokačního činidla (po dobu jedné hodiny a při teplotě místnosti). Transfekované buňky COS se fixovaly směsí 95 % ethanolu a 5% kyseliny octové (při teplotě 4 °C, po dobu 25 minut), blokovaly se a inkubovaly se sérem AS Bruna (v ředění 1:200) nebo s mAb IN–1 po dobu 2 hodin při teplotě místnosti. Buňky se nechaly reagovat s kozími anti–králičími–FITC protilátkami a kozími anti–myšimi–TRITC protilátkami (Jackson Immuno Research Lab).

30 Komora vhodná pro zrakový nerv

Páry zrakového nervu se kultivovaly v 3–komorovém kultivačním systému, jak se popisuje v publikaci Schwab et al., 1988, J. Neurosci. 8: 2 381–2 393) a injekcí se aplikovalo AS 472 nebo 35 odpovídající preimunizované sérum (v ředění 1:10). Zrakové nervy se fixovaly způsobem vhodným pro elektronovou mikroskopii (EM) a připravily se ultratenké sekce ve vzdálenosti 3,5 mm DRG exponovaného kořene. Sekce se systematicky analyzovaly za účelem zjištění přítomnosti znovu rostoucích axonů za použití mikroskopu Zeiss EM 902.

40 Výsledky experimentů

Dále v textu se uvádějí experimentální výsledky získané za použití metod popsaných shora v textu.

45 Izolace cDNA Nogo

Bovinní homolog krysího NI–250 se čistil a štěpením proteinázou se připravily peptidy čistěného proteinu. Podle šesti různých peptidových sekvencí bNI220 se připravilo velké množství degenerovaných oligonukleotidů značených digoxigeninem. Několik klonů cDNA se izolovalo při 50 testování knihovny boviní bílé hmoty za použití těchto oligonukleotidů. Inzert nejdelšího klonu (CWP1–3, zobrazený na obrázku č. 1a) se požil k syntéze sond v případě následného testování krysí cDNA knihovny. Vybrané klony z takového testování se zobrazily na obrázku č. 1a. Analýza DNA sekvence těchto klonů cDNA naznačuje, že tři různé transkripty pocházejí z jednoho genu a tento gen se označil jako gen Nogo. Odlišné transkripty jsou pravděpodobně výsledkem 55 alternativního použití promotorů a alternativního sestřihu (Nogo A, Nogo B a Nogo C, zobrazeno

na obrázku č. 1b). Sekvence DNA se kompilovaly z klonů zobrazených na obrázku č. 1A za vzniku transkriptu A, přičemž sekvence DNA uvedeného transkriptu je uvedena na obrázku č. 2a.

Pojmová translace tří transkriptů vede ke vzniku proteinových produktů označených Nogo A (1 163 aminokyselin), Nogo B (360 aminokyselin) a Nogo C (199 aminokyselin). Protože Nogo A obsahuje všech šest peptidových sekvencí získaných z čištěných bNI220 (zobrazeno na obrázku č. 2b), je pravděpodobně ekvivalentní s čištěným proteinem krysí NI-250. Nogo A, B a C vykazuje běžný C-konec 188 aminokyselin (běžná oblast) a Nogo A a B sdílí N-konec obsahující 172 aminokyselin. Nogo A je delší než Nogo B o 803 aminokyselin, což způsobuje alternativní sestřih.

Žádná z izoforem Nogo nevykazuje hydrofóbní pruh aminokyselin na N-konci, který by se mohl použít jako běžný signální peptid. Avšak popsaly se proteiny, kterým chybí běžný signální peptid, ale stále procházejí membránami, jako je například fibroblastový růstový faktor (popisuje se v publikaci Florkiewicz et al., 1995, J. Cell. Physiology 162: 388–399), ciliární neurotrofický faktor (popisuje se v publikaci Sendtner et al., 1994, J. Neurobiology 25: 1 436–1 353) a interleukin-1 (popisuje se v publikaci Rubartelli et al., 1990, EMBO J. 9: 1 503–1 510). Membránové proteiny, jako je například „commissureless“ (popisuje se v publikaci Tear et al., 1996, Neuron 16: 501–514), které také nevykazují signální peptid, se začlenily do membrány.

Ačkoli v putativní 5' nepředkládané oblasti neexistuje stop kodon, který by jednoznačně definoval počáteční kodon, následující důkaz naznačuje, že methionin indikovaný na obrázku č. 2a je počáteční kodon Nogo A a Nogo B: (1) sekvence kolem uvedeného předpokládaného startovacího kodonu souhlasí se sekvencí počátečních míst translace (GCCGCC A/G CCATGG, SEQ ID NO: 39), (2) Velké úsilí se věnovalo vyhledávání více „upstream“ sekvencí testováním knihovny a 5'-Race. Žádný z těchto průzkumů nevedl k identifikaci více „upstream“ sekvencí a (3) eukaryontní rekombinantní protein Nogo A se exprimoval ze shora uvedeného methioninu a vykazuje zjevnou molekulovou hmotnost okolo 200 000, jak se odhaduje pomocí testu SDS PAGE, který se může odlišit od endogenního proteinu Nogo A, jenž pochází z krysích oligodendrocytů (zobrazeno na obrázku č. 11a).

Analýza sekvence Nogo

Protein Nogo A obsahuje potenciální N-glykosylační místa, avšak biochemický důkaz indikuje, že protein Nogo A nevykazuje hlavní polysacharidový komponent. Protein Nogo A také vykazuje devatenáct míst, které rozeznává PKC a sedm míst, které rozeznává kaseinová kináza II (obrázek č. 2a). Všechny tři proteiny Nogo mají dvě běžné hydrofóbní oblasti C-konce, které obsahují 35 a 36 aminokyselin. Libovolná z nich nebo obě se mohou použít jako trans- nebo intramembránové oblasti, které jsou konzistentní s charakterizací bNI220, jako integrální membránový protein. Protein Nogo A (stejně jako Nogo B a C) neobsahuje žádné motivy známých buněčných adhezivních molekul, proteiny extrabuněčné matrice nebo jiné molekuly.

Sekvence Nogo se použily k průzkumu různých databází za účelem vyhledávání homologních genů. Běžná oblast C-konců tří produktů Nogo je podobná (62,5 %) s identifikovaným lidským genem *nsp* (*c113* a *s-rex* u krys a *chs-rex* u kuřat) (zobrazeno na obrázku č. 3). EST z mikroorganismu *C.elegans* a *Drosophila melanogaster* EST také vykazuje podstatnou podobnost (16,6 % a 13,6 %) s oběma geny *Nogo* a *nsp* v této stejné oblasti. 180 aminokyselin oblastí C-konce obou proteinů Nogo a Nsp jsou vysoce konzervativní ve všech druzích savců (98,3 % a 97,3 %), což naznačuje, že mohou uskutečňovat stejné a podstatné funkce. Mimo tuto oblast podobnost s daným proteinem mezi druhy je také vysoká (73 % mezi krysím a bovinním proteinem Nogo A, 76,2 % mezi NSP-A a S-rexb, 50 % mezi Chs-rexb a NSP-A nebo S-rexb). Podobnost mezi NSP a Nogo je však omezená na jejich hydrofóbní, běžnou oblast C-konce (obrázek č. 3a) a na kyselou podstatu proteinů vně této konzervativní oblasti. NSP (NSP-A, -B a -C) se už dříve popisují jako neuro-endokrinní specifické produkty se známými funkcemi. Hybridizace in situ a imunohistologie vykazuje neuronální lokalizaci NSP v nervovém systému. Identifikoval se jiný

lidský gen *nsp-like-1*, který také obsahuje C-terminální hydrofóbní oblast s 50% podobností s *Nsp* a *Nogo*.

Expresí proteinu *Nogo* v tkáni

5

Expresní patern *Nogo* se testoval northern přenosem a hybridizací *in situ*. Když se použila běžná sonda (popisuje se shora v textu) detekovaly se ve zrakovém nervu, míše a v mozkové kůře tři hlavní transkripty *Nogo* (označené : A, 4,6 kb, B, 2,6 kb a C, 1,7 kb) (zobrazeno na obrázku č. 4a). V gangliích dorzálních kořenů se detekovaly pouze dva větší transkripty. Hlavní transkript obsahující 2,6 kb se detekoval v buňkách PC12, zatímco pruh obsahující 4,6 kb se detekoval pouze po dlouhé expozici (zobrazeno na obrázku č. 4a). U sciatického nervu se detekovalo menší množství transkriptů, přičemž pruh odpovídající velikosti 2,6 kb byl hlavním transkriptem. Když se poly(A)⁺RNA míchy a buněk PC12 hybridizovaly se sondou specifickou pro exon 1 detekovaly se pouze transkripty odpovídající 4,6 kb a 2,6 kb. V případě, že se hybridizovala poly(A)⁺RNA zadního mozku a skeletálního svalu se sondou specifickou pro exon 2, detekoval se pouze transkript odpovídající 4,6 kb (zobrazeno na obrázku č. 4b). Tyto výsledky potvrdily transkripční mapu zobrazenou na obrázku č. 1. Výsledky northern blotu však ukazují, že exprese proteinu *Nogo* není omezena na nervový systém (zobrazeno na obrázku č. 4c). Transkripty *Nogo* se také detekovaly v skeletovém svalu (odpovídá velikosti 1,7 kb), v ledvinách (2,6 kb a 1,7 kb), v chrupavce (pocházející z prsní kosti, odpovídá 1,7 kb), v kůži (odpovídá velikosti 1,7 kb), v plicích (odpovídá velikosti 2,6 kb) a slezině (odpovídá velikosti 2,6 kb). S výjimkou skeletálního svalu, ve kterém dochází k expresi transkriptů *Nogo* C ve velkém množství, množství transkriptů *Nogo* vně nervového systému je nižší než je množství transkriptů v nervovém systému. Zdá se, že transkripty *Nogo* A odpovídající velikosti 4,6 kb se jednoznačně přepisují v nervovém systému.

25

Při hybridizacích *in situ* sekce tkáně CNS dospělých krys za použití běžné sondy vykazovaly slabé značení čar v těle buňky v bílé hmotě různých částí mozku a míchy. Toto uspořádání je typické pro interfascikulární oligodendrocyty (obrázek č. 5a,d). Vedle oligodendrocytů několik typů neuronů také exprimuje transkripty *Nogo* ve vysokém množství (obrázek č. 5c, e). V případě malého mozku dvakrát barvené sekce s protilátkou anti-GFAP a *in situ* hybridizace jasně vykazují silné značení buněk Purkinje sondou *Nogo*, zatímco astrocyty nebyly značeny (zobrazeno na obrázku č. 5e,f). Při vyvíjení zrakových nervů se detekovaly transkripty *Nogo* už v postnatální den 0 (P0), to znamená několik dní před tím, než se mohly detekovat mRNA hlavních myelinových proteinů proteolipidového proteinu (PLP) a myelinového základního proteinu (MBP) (zobrazeno na obrázku č. 6). Uvedené načasování je konzistentní s objevením prvních oligodendrocytů, které jsou pozitivní na galactocerebrosid a exprimují inhibiční aktivitu růstu neuritů, která může být neutralizována IN-1.

35

Vytvořilo se antisérum proti syntetickému peptidu založenému na specifické sekvenci bovinního proteinu *Nogo* A (AS 472) a proti rekombinantnímu částečnému krysímu proteinu *Nogo* A o molekulové hmotnosti 45 000 (AS Bruna). Sérum AS 472 a AS Bruna rozeznává protein o přibližně molekulové hmotnosti 200 000 v bovinním myelinu a sérum AS Bruna rozeznává dále krysí myelinový protein o molekulové hmotnosti 200 000 na western blotech (zobrazeno na obrázku č. 7). Sekce míchy a malého mozku z dospělých krys se barvily pomocí AS 472, AS Bruna a IN-1. Když se sekce fixovaly směsí ethanolu a kyseliny octové (dříve zobrazený postup se zdá být nutný při ochraně a dostupnosti antigenů IN-1) silné obarvení bílé hmoty/myelinu se dosáhlo za použití všech tří protilátek (zobrazeno na obrázku č. 8). Barvení těl oligodendrocytových buněk bylo zvláště zřetelné se sérem AS Bruna. Ošetření čerstvých zmrazených sekcí methanolem místo směsí ethanol a kyselina octová se dosáhlo obarvení myelinu s výjimkou těl oligodendrocytových buněk.

45

50

Sérum AS Bruna a AS 472 také obarvilo některé typy neuronů, které zahrnují řídicí neurony v míše a granulární a molekulovou vrstvu v malém mozku. Buňky Purkinje se silně obarvily pomocí AS 472 a AS Bruna, ale nedošlo k detekci barvením s IN-1.

55

Protilátky Nogo inhibují *in vitro* inhibici růstu indukovaný Nogo

5 Přípravek semičištěné bovinní míchy NI-220 (q-pool) může předcházet rozšíření fibroblastů NIH 3T3 a tvorbě výrůstků neuritů. V přítomnosti antiséra Nogo se snížila inhibiční aktivita buď AS Bruna, AS 472 nebo IN-1, q-pool. To znamená, že fibroblasty NIH 3T3 se rozšířily a neurity ganglií dorzálních kořenů (DRG) rostly na plotnách potažených q-pool (zobrazeno na obrázku č.9). Specificita se projevila přidáním peptidu P472, kterým byl peptid používaný k vytvoření AS 472 (popisuje se shora v textu). P472 úspěšně blokuje inhibiční účinek AS 472, zatímco kontrolní peptid neměl účinek na inhibici.

15 Přítomnost proteinu Nogo A na oligodendrocyty na buněčném povrchu se demonstroval imunocytochemicky, funkčně a biochemicky za použití AS 472. Když se živé primárně kultivované oligodendrocyty obarvily buď mAb IN-1 nebo AS 472, pozorovalo se relativně slabé (ve srovnání s imunocytochemickou metodou v případě galaktocerebrosidu), ale jasné povrchové barvení na diferenciovaných oligodendrocytech (zobrazeno na obrázku č. 15 a, c). Vedle konkurenčního peptidu (P 472) v případě AS 472 nebo vynechání primární protilátky se eliminovalo specifické barvení (zobrazeno na obrázku č. 15b, d). Biotinylace buněčného povrchu a následná precipitace streptavidinem dále prokázala přítomnost proteinu Nogo A v plazmatické membráně oligodendrocytů. Ve sraženině AS 472 detekoval pruh, který se nachází nad intracelulárním, pravděpodobně nezpracovaným a neglykosylovaným AS 472 imunopozitivním pruhem. ER protein BiP by se nemohl detekovat v biotinylované frakci (zobrazeno na obrázku č. 15e).

25 Protein Nogo A jako povrchová molekula oligodendrocytu se také funkčně analyzoval. Společná kultivace oligodendrocytů a fibroblastů NIH 3T3 nebo oligodendrocytů a neuronů DRG jasně ukazují inhibiční vlastnosti zralých oligodendrocytů. Tyto testy demonstrují, že fibroblasty NIH 3T3 a neurity DRG silně vyhýbaly oblasti oligodendrocytů, přičemž tento účinek se neutralizoval monoklonální protilátkou In-1. V přítomnosti AS 472 se tato inhibice redukovala rovnou měrou (zobrazeno na obrázku č. 16a, b, c a e, f), zatímco preinkubace AS 472 s P472 obnovila inhibici zprostředkovanou oligodendrocyty (zobrazeno na obrázku č. 16 c, d a g, h). Kvantifikace vykázala vysoce podstatnou neutralizační kapacitu monoklonálních protilátek IN-1 a AS 472 v obou typech testů (zobrazeno na obrázku 16i aj).

35 RecNogo-A (obrázek č.17a) produkovaný stabilně transfekovanou buněčnou linií CHO se testoval za účelem zjištění jeho aktivity na rozšíření fibroblastů NIH 3T3 a tvorbu výrůstků DRG neuritů. Rekombinantně produkovaná β -galaktozidáza izolovaná ze stabilní buněčné linie CHO (CHO-LacZ) se obohatila paralelně recNogo-A a použila se jako kontrola inhibiční aktivity endogenních proteinů CHO v obou testech. V testu rozšíření fibroblastů NIH 3T3 extrakt CHO obsahující recNogo-A (Nogo A: přibližně 1 až 5 % celkového proteinu, obrázek č. 9a) vykazoval jasné inhibiční účinky na rozšíření buněk při hustotě 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (zobrazeno na obrázku č. 17b). Tento účinek závisí na dávce: při hustotě 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ byla inhibiční aktivita vyšší, zatímco při hustotě 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ nedošlo k žádné inhibici (data nejsou uvedeny). Inhibiční aktivita by se mohla neutralizovat na úroveň pozadí preinkubací potaženého proteinu s monoklonální protilátkou IN-1 nebo AS Bruna, zatímco kontrolní protilátky proti preimunnímu séru galaktocerebrosidu (mAb 01) nebo AS Bruna neměly žádný účinek (zobrazeno na obrázku č. 17b).

50 Vedle silného účinku na rozšíření fibroblastů NIH 3T3, CHO extrakt obsahující recNogo-A, ale nikoli extrakt CHO-LacZ vykazují potencionální inhibiční účinek na růst neuritů z primárních kultivovaných neuronů: Disociované neurony DRG se inhibovaly pomocí recNogo-A způsobem, který je závislý na dávce (zobrazeno na obrázku č. 17c). Tato inhibiční aktivita by se mohla neutralizovat monoklonálními protilátkami In-1, ale nikoli kontrolní monoklonální protilátkou 01 (zobrazeno na obrázku č. 17c až e). Rekombinantní protein izolovaný z CHO-LacZ nevykazoval inhibici v množství 1 a 5 mikrogramů a vedle monoklonálních protilátek 01 nebo IN-1 neměly žádný účinek na vytvoření výrůstků neuritů.

Opětný růst neuritů *in vitro*

Zkoumala se schopnost nově narozených krysích DRG neuritů regenerovat a prorůstat dospělou tkání CNS. Páry zřakových nervů se vyňaly z dospělých krys a kultivovaly se ve speciálním komorovém kultivačním systému tak, že DRG neurity měly přístup k jednomu konci každého nervu (zobrazeno na obrázku č. 10a). V každé kultuře se do jednoho z nervů injekcí aplikovalo preimunizované králičí sérum a do druhého nervu se injekcí aplikovalo sérum AS 472, které je také přítomné v boční komoře okolo nervu. Následují dva týdny *in vitro* v přítomnosti NGF, kultury se fixovaly, rozebraly a fixovaly se za účelem zkoumání elektronovou mikroskopií (EM). EM sekce se odebraly ve vzdálenosti 3,5 mm od konce nervu v kontaktu s neurony DRG. Nervy, kterým se injekcí aplikovalo preimunizované sérum, neobsahovaly nebo obsahovaly pouze několik axonů (zobrazeno na obrázku č. 10b). Později se našly pouze ve spojení z bazální membránou a astrocyty na povrchu nervů. Naopak většina optických nervů se zavedlo injektovaných AS 472 obsahovala podstatné množství axonů, často až několik stovek. Také je často možné vidět kontakt s myelinem (zobrazeno na obrázku č. 10c, d).

Rekombinantní Nogo na rozeznávání pomocí IN-1

V případě, že se Nogo A exprimoval jako karboxyterminální rekombinantní protein značený myc-his v transfekovaných buňkách COS, western přenos za použití protilátek proti myc a AS Bruna demonstrovaly, že rekombinantní Nogo A má zjevnou molekulovou hmotnost přibližně 200 000, což se zjistilo na denaturačním SDS gelu (zobrazeno na obrázku č. 11a). Na stejném blotu se detekoval v primární kultuře krysích oligodendrocytů pruh se stejnou mobilitou za pomoci séra AS Bruna, což naznačuje, že rekombinantní Nogo A má skoro identickou molekulovou hmotnost jako endogenní Nogo A z oligodendrocytů (zobrazeno na obrázku č. 1a). Když se transfekované buňky obarvily imunofluorescencí pomocí IN-1 a AS Bruna, IN-1 a AS Bruna rozeznávaly stejné transfekované buňky (zobrazeno na obrázku č. 11b, c). Většina imunoreaktivity se lokalizovala uvnitř v buňce a byla dostupná pouze po permeabilizaci.

30 Mapování aktivní oblasti(i) Nogo

Série delečních mutantů Nogo se vytvořila za účelem mapování inhibiční oblasti(i) proteinu Nogo. Deleční konstrukce genu *Nogo* se vytvořila použitím vnitřního restričního místa, štěpením exonukleázou III z fazolí mungo a polymerázovou řetězcovou reakcí. Popis mutací se popisuje na obrázku č. 18 a shora v textu. Většina konstrukcí má N-konec označený T7 za účelem identifikace monoklonálními protilátkami proti T7 a dále obsahuje N- nebo C-terminální hexahistidinovou značku („His-tag“), která se využívá při čištění imobilizovanou Co(II)-afinitní chromatografií. Deleční mutanti Nogo, které se nazývají NiG-D1, NiG-D2 až NiG-D20 se také testovaly za použití testu rozšíření fibroblastů NIH 3T3, aby se stanovila inhibiční aktivita. Někteří mutanti se testovaly při tvorbě výrůstků neuritů PC12, při tvorbě výrůstků disociovaných krysích DRG neuritů nebo testů za použití retinálních ganglií. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 2 dále v textu.

Tabulka č. 2: Funkční aktivity delečních mutantů Nogo

	3T3	PC12	DRG	RGC
Nogo-A	++		+	+
Nogo-B	+			
Nogo-C	-			-
NiAext	++	+		+
EST	+/-			
NiR	+			
NiG	++			
NiG-D1	+			
NiG-D2	+			
NiG-D3	++			
NiG-D4	+			
NiG-D5	-			
NiG-D7	+			
NiG-D8	+			
NiG-D9	+			
NiG-D10	+/-			
NiG-D14	-			
NiG-D15	+			
NiG-D16	+			
NiG-D17	+			
NiG-D18	+			
NiG-D20	++			

5 Pozitivní výsledek v testu fibroblastů NIH 3T3 (3T3) nebo v testu PC12 se hodnotil, když se inhibovalo rozšíření fibroblastů nebo buněk PC12 na plotně potažené přípravkem Nogo získaného z delečního mutantu. Pozitivní výsledek v testu růstu gangliomu dorzálních kořenů embrya kuřete (DRG) nebo testu růstu konusu gangliomu (RGC) indikuje, že růst neuritů se inhibuje
10 nebo že růst je zpomalen v přítomnosti přípravku Nogo, který se získal z delečního mutantu.

Data naznačují, že hlavní inhibiční oblast se identifikovala ve specifické oblasti Nogo-A z aminokyselin čísla 172 až 974, zvláště aminokyselin čísla 542 až 722. Navíc A-terminální sekvence Nogo-A a Nogo-B (aminokyseliny číslo 1 až 171) také inhibují rozšíření 3T3. Na základě
15 výsledků oblasti Nogo obsahující aminokyseliny číslo 172 až 259 a 975 až 1 162 se jeví být nepodstatné a mohou se odstranit, aniž dojde ke ztrátě aktivity.

Příklad 2: Nukleové kyseliny lidského Nogo a proteiny, deriváty a fragmenty

Vynález popisuje nukleotidové sekvence kódující lidský protein Nogo a fragmenty lidských proteinů Nogo, které zahrnují lidské ekvivalenty s krysím proteinem Nogo A, Nogo B a část Nogo C. Lidská aminokyselinová sekvence Nogo je znázorněna na obrázku č. 13 a je zobrazena v sekvenci SEQ ID NO: 29.

Vynález dále popisuje nukleotidové sekvence fragmentů lidského genu *Nogo*. Nukleotidová sekvence lidského Nogo se může stanovit za použití krysího transkriptu Nogo A s cílem uspořádat a sestříhem upravit dohromady lidské exprimované sekvence tag (EST), které jsou homologní se sekvencí krysí nebo bovinní cDNA.

EST AA081783 a AA333267 (popisuje se shora v textu) se vzájemně překrývají a odpovídají nukleové kyselině krysího proteinu Nogo A (Obrázek č. 2a, SEQ ID NO: 1) v polohách 765 až 1 272. EST AA322592, AA092565 a AA081525 (popisuje se shora v textu) se také vzájemně překrývají a odpovídají nukleové kyselině krysího proteinu Nogo A (Obrázek č. 2a, SEQ ID NO: 1) v polohách 765 až 1 272. EST AA322592, AA092565 a AA081525 (popisuje se shora v textu) se také vzájemně překrývají a překrývající se sekvence odpovídá nukleovým kyselinám 1 642 až 2 131. Tyto dvě nezávislé sady překrývajících se ESR se nemohou uspořádat za vzniku lidské sekvence, aniž se provede přímé porovnání za použití počítače s nukleotidovou sekvencí krysího nebo bovinního Nogo podle vynálezu. V případě počátečního počítačového uspořádání se preferuje ENTREZ Nucleotide QUERRY. Jiné počítačové programy pro uspořádání se popisují shora v textu jako alternativní příklady, přičemž neomezují výběr programů, které se mohou použít pro tyto účely.

Diskuze

Klonování inhibitoru růstu neuritů Nogo

Protein Nogo A má řadu vlastností, které podporují to, co se dříve napsalo o krysím NI-250, což je hlavní inhibiční protein růstu neuritů CNS myelinu a o antigenu IN-1. Na molekulové úrovni všech šest peptidů se původně získalo sekvenováním bNI-220, což je nejvíce inhibiční komponent bovinního míšního myelinu. Na úrovni exprese oligodendrocyty jsou hlavní buněčný typ u dospělého CNS v případě exprese Nogo A a načasování exprese *Nogo* ve zrakovém nervu souhlasí s dřívějším popisem IN-1 neutralizované myelinové inhibiční aktivity růstu neuritů. Western přenos ukázal přítomnost proteinu Nogo A v aktivních frakcích q-pool a bílá hmota z různých oblastí CNS se obarvila sérem AS Bruna stejně jako s AS 472 (specifické pro protein Nogo A) u pacienta identického s pacientem IN-1. Obě tyto skutečnosti souhlasí s interpretací, že Nogo A je NI-250.

Dvě antiséra vytvořená proti sekvencím Nogo A, což jsou AS Bruna a AS 472, velice snižují inhibiční aktivitu částečně čištěného bovinního míšního přípravku (q-pool). Sérum AS 472 také umožní prorůstání velkého množství axonů ganglií dorzálních kořenů do explantátů dospělého zrakového nervu, což je velmi podobné jako v případě IN-1.

Ačkoli vypočítaná molekulová hmotnost proteinu Nogo A je přibližně 140 000, vykazuje zjevnou molekulovou hmotnost na denaturačním gelu SDS přibližně 200 000, což je v rozmezí předchozího odhadu hodnoty okolo 250 000. Aberující pohyblivost Nogo A na gelech SDS je pravděpodobně způsobena svou kyselou povahou spíše než post-translační modifikací. Aberující pohyblivost proteinů na SDS-Page se také stanovila pro jiné vysoce kyselé proteiny, jako je s růstem spojený protein GAP-43, stejně jako NSP-A. Bakteriálně exprimovaný rekombinantní Nogo A vykazuje stejnou zjevnou molekulovou hmotnost jako je hmotnost endogenního Nogo A exprimovaného krysími oligodendrocyty. To namítá proti hlavním modifikacím proteinu Nogo A mechanismem, jako je glykosylace.

Nogo brání regeneraci a omezuje plasticitu dospělého CNS

5 Exprese proteinu *Nogo* v oligodendrocytech krysího optického nervu z P0 souhlasí s dřívějším zjištěním, že IN-1 neutralizuje inhibiční aktivitu růstu neuritů. Tato exprese předstihuje expresi hlavních myelinových proteinů a tvorbu kompaktního myelinu o několik dní. Výskyt proteinu Nogo pravděpodobně jako odezva na axonální signály může předcházet axonovému růstu v odpovídajících vláknitých drahách (maximální počet axonů při E20 v krysím zřakovém nervu). Protein Nogo může také inhibovat kolaterální formaci a tím stabilizovat obecnou strukturu dife-
10 renciovaného CNS. V šedé hmotě mozkové různých oblastí CNS obsah myelinu a IN-1 imuno-reaktivita koreluje nepřímo s množstvím GAP-43 a s potenciálem plasticity dané oblasti. Proti-
15 látky IN-1 aplikované do dospělého CNS umožní, že se v mozkovém kmenu objeví klíčení a plasticita a mícha se prodlouží, což je známo pouze u CNS novorozenců. Velké obnovení funkcí, což přichází paralelně s plasticitou, indikuje že klíčíci axony jsou schopny tvořit funkčně vhodné propojení.

Dříve se ukázalo, že odezva neuronů na inhibiční proteiny Nogo se liší podle stáří neuronů. To je způsobeno diferenciální expresí receptorů, které budou snad brzy charakterizovány. Jako v případě Netrinů a řady růstových faktorů existence různých receptorů Nogo, které způsobují
20 různé odezvy, zůstává možnost. Skutečnost, že proteiny Nogo se také exprimují v některých typech neuronů, zdůrazňuje možné interakce mezi stejnými a různými izoformami Nogo.

Nogo patří do nové rodiny molekul regulující neurity

25 Sekvenční analýza proteinu Nogo ukázala neznámé motivy buněčných povrchových a matricových proteinů, které se podílejí na axonálním řízení (repulzivní nebo atraktivní). To znamená, že se nenašel žádný imunoglobulin, fibrinektin typu III nebo oblasti EGF. Ani neexistuje homologie s popsány inhibitory neurálního růstu, se semaforiny, netriny ani efriny.

30 Proteiny Nogo tvoří nové rodiny se skupinou současně popsanych proteinů založené na podobnosti jejich karboxyterminálních 180 aminokyselin. Jsou to proteiny NSP/s-rex a NSP-like 1. Jako v případě *Nogo* použití alternativního promotoru (gen *Nsp* a *Nsp-like 1*) a alternativní sestřih (pouze *Nsp*) jsou odpovědné za produkci alternativních proteinových produktů s běžným karboxylovým koncem, který obsahuje dva pruhy hydrofóbních aminokyselin. NSP (neuroendo-
35 krinní specifické proteiny) se exprimují převážně v neuronech a v několika typech endokrinních buněk. Lokalizují se hlavně uvnitř buněk ve spojení s endoplazmatickým retikulem. Funkce rodiny NSP ani *Nsp-like 1* nejsou známy. Skutečnost, že potencionální ortology existují jak u organizmu *C. elegans* a *Drosophila melanogaster* naznačují, že Nogo se schopností regenerovat nervy a vykazovat inhibiční aktivitu se může zahrnout do rodiny NSP a stát se nepopsaným členem této
40 rodiny.

Nogo v tkáních, které nejsou neurální

45 Transkript *Nogo* se exprimuje v kosterních svalech v množství, které je srovnatelné s množstvím exprimovaným v nervovém systému. Jednou z představitelných funkcí svalového proteinu Nogo C je odstranit motorické axony a omezit je na motorickou oblast. Slabá exprese *Nogo* se může také detekovat v jiných tkáních, které nejsou nervové tkáně. Pozorovaná inhibice rozšíření fibroblastů a astrocytů myelinovým extraktem a NI-250 naráží na přítomnost receptorů a mechanismů odezvy na proteiny Nogo v těchto buňkách. To naznačuje pravděpodobné obecné funkce proteinu
50 Nogo při kontaktní inhibici pohybu buněk.

<110> University of Zürich

55 <120> NUCLEOTIDE AND PROTEIN SEQUENCES OF NOGO GENES AND METHODS BASED THEREON

<130> 32571-CZ-PCT
 <150> 99972673.0
 5 <151> 1999-11-05
 <150> PCT/US99/26160
 <151> 1999-11-05
 10 <150> 60/107,446
 <151> 1998-11-06
 <160> 51
 15 <170> FastSEQ for Windows Version 3.0
 <210> 1
 <211> 3741
 <212> DNA
 20 <213> Rattus sp.
 <220>
 <221> CDS
 <222> (253)...(3741)
 25 <400> 1

```

attgctcgtc tgggcggcgg cggcggctgc agcctgggac agggcgggtg gcacatctcg      60
atcgcgaagg cagcagaagc agtctcattg ttccgggagc cgtcgcctct gcaggttctt      120
cggctcggct cggcagcact cggcctgcct ggcccctgcc agtcttgccc aacccccaca      180
accgcccgcg actctgagga gaagcggccc tgcggcggct gtagctgcag catcgtcggc      240
gaccgccag cc atg gaa gac ata gac cag tgc tgc ctg gtc tcc tgc tcc      291
                Met Glu Asp Ile Asp Gln Ser Ser Leu Val Ser Ser Ser
                  1             5             10

acg gac agc ccg ccc cgg ect ccg ccc gcc ttc aag tac cag ttc gtg      339
Thr Asp Ser Pro Pro Arg Pro Pro Pro Ala Phe Lys Tyr Gln Phe Val
      15             20             25

acg gag ccc gag gac gag gag gac gag gag gag gag gag gac gag gag      387
Thr Glu Pro Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu
      30             35             40             45

gag gac gac gag gac cta gag gaa ctg gag gtg ctg gag agg aag ccc      435
Glu Asp Asp Glu Asp Leu Glu Glu Leu Glu Val Leu Glu Arg Lys Pro
      50             55             60

gca gcc ggg ctg tcc gca gct gcg gtg ccg ccc gcc gcc gcc gcg ccg      483
Ala Ala Gly Leu Ser Ala Ala Ala Val Pro Pro Ala Ala Ala Ala Pro
      65             70             75

ctg ctg gac ttc agc agc gac tgc gtg ccc ccc gcg ccc cgc ggg ccg      531
Leu Leu Asp Phe Ser Ser Asp Ser Val Pro Pro Ala Pro Arg Gly Pro
      80             85             90

ctg ccg gcc gcg ccc cct gcc gct cct gag agg cag cca tcc tgg gaa      579
Leu Pro Ala Ala Pro Pro Ala Ala Pro Glu Arg Gln Pro Ser Trp Glu
      95             100             105

cgc agc ccc gcg gcg ccc gcg cca tcc ctg ccg ccc gct gcc gca gtc      627
Arg Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ser Leu Pro Pro Ala Ala Ala Val
      110             115             120             125
    
```

ctg ccc tcc aag ctc cca gag gac gac gag cct ccg gcg agg ccc ccg	675
Leu Pro Ser Lys Leu Pro Glu Asp Asp Glu Pro Pro Ala Arg Pro Pro	
130 135 140	
cct ccg ccg cca gcc gcc gcc agc ccc ctg gcg gag ccc gcc gcg ccc	723
Pro Pro Pro Pro Ala Gly Ala Ser Pro Leu Ala Glu Pro Ala Ala Pro	
145 150 155	
cct tcc acg ccg gcc gcg ccc aag cgc agg gcc tcc gcc tca gtg gat	771
Pro Ser Thr Pro Ala Ala Pro Lys Arg Arg Gly Ser Gly Ser Val Asp	
160 165 170	
gag acc ctt ttt gct ctt cct gct gca tct gag cct gtg ata ccc tcc	819
Glu Thr Leu Phe Ala Leu Pro Ala Ala Ser Glu Pro Val Ile Pro Ser	
175 180 185	
tct gca gaa aaa att atg gat ttg atg gag cag cca ggt aac act gtt	867
Ser Ala Glu Lys Ile Met Asp Leu Met Glu Gln Pro Gly Asn Thr Val	
190 195 200 205	
tcg tct ggt caa gag gat ttc cca tct gtc ctg ctt gaa act gct gcc	915
Ser Ser Gly Gln Glu Asp Phe Pro Ser Val Leu Leu Glu Thr Ala Ala	
210 215 220	
tct ctt cct tct cta tct cct ctc tca act gtt tct ttt aaa gaa cat	963
Ser Leu Pro Ser Leu Ser Pro Leu Ser Thr Val Ser Phe Lys Glu His	
225 230 235	
gga tac ctt ggt aac tta tca gca gtg tca tcc tca gaa gga aca att	1011
Gly Tyr Leu Gly Asn Leu Ser Ala Val Ser Ser Ser Glu Gly Thr Ile	
240 245 250	
gaa gaa act tta aat gaa gct tct aaa gag ttg cca gag agg gca aca	1059
Glu Glu Thr Leu Asn Glu Ala Ser Lys Glu Leu Pro Glu Arg Ala Thr	
255 260 265	
aat cca ttt gta aat aga gat tta gca gaa ttt tca gaa tta gaa tat	1107
Asn Pro Phe Val Asn Arg Asp Leu Ala Glu Phe Ser Glu Leu Glu Tyr	
270 275 280 285	
tca gaa atg gga tca tct ttt aaa gcc tcc cca aaa gga gag tca gcc	1155
Ser Glu Met Gly Ser Ser Phe Lys Gly Ser Pro Lys Gly Glu Ser Ala	
290 295 300	
ata tta gta gaa aac act aag gaa gaa gta att gtg agg agt aaa gac	1203
Ile Leu Val Glu Asn Thr Lys Glu Glu Val Ile Val Arg Ser Lys Asp	
305 310 315	
aaa gag gat tta gtt tgt agt gca gcc ctt cac agt cca caa gaa tca	1251
Lys Glu Asp Leu Val Cys Ser Ala Ala Leu His Ser Pro Gln Glu Ser	
320 325 330	
cct gtg ggt aaa gaa gac aga gtt gtg tct cca gaa aag aca atg gac	1299
Pro Val Gly Lys Glu Asp Arg Val Val Ser Pro Glu Lys Thr Met Asp	
335 340 345	
att ttt aat gaa atg cag atg tca gta gta gca cct gtg agg gaa gag	1347
Ile Phe Asn Glu Met Gln Met Ser Val Val Ala Pro Val Arg Glu Glu	
350 355 360 365	
tat gca gac ttt aag cca ttt gaa caa gca tgg gaa gtg aaa gat act	1395
Tyr Ala Asp Phe Lys Pro Phe Glu Gln Ala Trp Glu Val Lys Asp Thr	
370 375 380	
tat gag gga agt agg gat gtg ctg gct gct aga gct aat gtg gaa agt	1443
Tyr Glu Gly Ser Arg Asp Val Leu Ala Ala Arg Ala Asn Val Glu Ser	
385 390 395	
aaa gtg gac aga aaa tgc ttg gaa gat agc ctg gag caa aaa agt ctt	1491

Lys	Val	Asp	Arg	Lys	Cys	Leu	Glu	Asp	Ser	Leu	Glu	Gln	Lys	Ser	Leu		
		400					405					410					
ggg	aag	gat	agt	gaa	ggc	aga	aat	gag	gat	gct	tct	ttc	ccc	agt	acc		1539
Gly	Lys	Asp	Ser	Glu	Gly	Arg	Asn	Glu	Asp	Ala	Ser	Phe	Pro	Ser	Thr		
	415					420					425						
cca	gaa	cct	gtg	aag	gac	agc	tcc	aga	gca	tat	att	acc	tgt	gct	tcc		1587
Pro	Glu	Pro	Val	Lys	Asp	Ser	Ser	Arg	Ala	Tyr	Ile	Thr	Cys	Ala	Ser		
430					435					440					445		
ttt	acc	tca	gca	acc	gaa	agc	acc	aca	gca	aac	act	ttc	cct	ttg	tta		1635
Phe	Thr	Ser	Ala	Thr	Glu	Ser	Thr	Thr	Ala	Asn	Thr	Phe	Pro	Leu	Leu		
				450					455					460			
gaa	gat	cat	act	tca	gaa	aat	aaa	aca	gat	gaa	aaa	aaa	ata	gaa	gaa		1683
Glu	Asp	His	Thr	Ser	Glu	Asn	Lys	Thr	Asp	Glu	Lys	Lys	Ile	Glu	Glu		
			465					470					475				
agg	aag	gcc	caa	att	ata	aca	gag	aag	act	agc	ccc	aaa	acg	tca	aat		1731
Arg	Lys	Ala	Gln	Ile	Ile	Thr	Glu	Lys	Thr	Ser	Pro	Lys	Thr	Ser	Asn		
		480					485					490					
cct	ttc	ctt	gta	gca	gta	cag	gat	tct	gag	gca	gat	tat	gtt	aca	aca		1779
Pro	Phe	Leu	Val	Ala	Val	Gln	Asp	Ser	Glu	Ala	Asp	Tyr	Val	Thr	Thr		
	495					500					505						
gat	acc	tta	tca	aag	gtg	act	gag	gca	gca	gtg	tca	aac	atg	cct	gaa		1827
Asp	Thr	Leu	Ser	Lys	Val	Thr	Glu	Ala	Ala	Val	Ser	Asn	Met	Pro	Glu		
510					515					520					525		
ggg	ctg	acg	cca	gat	tta	ggt	cag	gaa	gca	tgt	gaa	agt	gaa	ctg	aat		1875
Gly	Leu	Thr	Pro	Asp	Leu	Val	Gln	Glu	Ala	Cys	Glu	Ser	Glu	Leu	Asn		
				530					535					540			
gaa	gcc	aca	ggt	aca	aag	att	gct	tat	gaa	aca	aaa	gtg	gac	ttg	gtc		1923
Glu	Ala	Thr	Gly	Thr	Lys	Ile	Ala	Tyr	Glu	Thr	Lys	Val	Asp	Leu	Val		
			545				550						555				
caa	aca	tca	gaa	gct	ata	caa	gaa	tca	ctt	tac	ccc	aca	gca	cag	ctt		1971
Gln	Thr	Ser	Glu	Ala	Ile	Gln	Glu	Ser	Leu	Tyr	Pro	Thr	Ala	Gln	Leu		
		560					565					570					
tgc	cca	tca	ttt	gag	gaa	gct	gaa	gca	act	ccg	tca	cca	gtt	ttg	cct		2019
Cys	Pro	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Glu	Ala	Thr	Pro	Ser	Pro	Val	Leu	Pro		
	575					580					585						
gat	att	ggt	atg	gaa	gca	cca	tta	aat	tct	ctc	ctt	cca	agc	gct	ggt		2067
Asp	Ile	Val	Met	Glu	Ala	Pro	Leu	Asn	Ser	Leu	Leu	Pro	Ser	Ala	Gly		
590					595					600					605		
gct	tct	gta	gtg	cag	ccc	agt	gta	tcc	cca	ctg	gaa	gca	cct	cct	cca		2115
Ala	Ser	Val	Val	Gln	Pro	Ser	Val	Ser	Pro	Leu	Glu	Ala	Pro	Pro	Pro		
				610					615					620			
ggt	agt	tat	gac	agt	ata	aag	ctt	gag	cct	gaa	aac	ccc	cca	cca	tat		2163
Val	Ser	Tyr	Asp	Ser	Ile	Lys	Leu	Glu	Pro	Glu	Asn	Pro	Pro	Pro	Tyr		
			625					630					635				
gaa	gaa	gcc	atg	aat	gta	gca	cta	aaa	gct	ttg	gga	aca	aag	gaa	gga		2211
Glu	Glu	Ala	Met	Asn	Val	Ala	Leu	Lys	Ala	Leu	Gly	Thr	Lys	Glu	Gly		
		640				645						650					
ata	aaa	gag	cct	gaa	agt	ttt	aat	gca	gct	ggt	cag	gaa	aca	gaa	gct		2259
Ile	Lys	Glu	Pro	Glu	Ser	Phe	Asn	Ala	Ala	Val	Gln	Glu	Thr	Glu	Ala		
	655					660					665						
cct	tat	ata	tcc	att	gcg	tgt	gat	tta	att	aaa	gaa	aca	aag	ctc	tcc		2307

Pro 670	Tyr	Ile	Ser	Ile	Ala 675	Cys	Asp	Leu	Ile	Lys 680	Glu	Thr	Lys	Leu	Ser 685		
act Thr	gag Glu	cca Pro	agt Ser	cca Pro	gat Asp	ttc Phe	tct Ser	aat Asn	tat Tyr	tca Ser	gaa Glu	ata Ile	gca Ala	aaa Lys	ttc Phe	2355	
gag Glu	aag Lys	tcg Ser	gtg Val 705	ccc Pro	gaa Glu	cac His	gct Ala	gag Glu 710	cta Leu	gtg Val	gag Glu	gat Asp	tcc Ser 715	tca Ser	cct Pro	2403	
gaa Glu	tct Ser	gaa Glu 720	cca Pro	gtt Val	gac Asp	tta Leu	ttt Phe 725	agt Ser	gat Asp	gat Asp	tcg Ser	att Ile 730	cct Pro	gaa Glu	gtc Val	2451	
cca Pro	caa Gln 735	aca Thr	caa Gln	gag Glu	gag Glu	gct Ala 740	gtg Val	atg Met	ctc Leu	atg Met	aag Lys 745	gag Glu	agt Ser	ctc Leu	act Thr	2499	
gaa Glu 750	gtg Val	tct Ser	gag Glu	aca Thr	gta Val 755	gcc Ala	cag Gln	cac His	aaa Lys	gag Glu 760	gag Glu	aga Arg	ctt Leu	agt Ser	gcc Ala 765	2547	
tca Ser	cct Pro	cag Gln	gag Glu	cta Leu 770	gga Gly	aag Lys	cca Pro	tat Tyr	tta Leu 775	gag Glu	tct Ser	ttt Phe	cag Gln	ccc Pro 780	aat Asn	2595	
tta Leu	cat His	agt Ser	aca Thr 785	aaa Lys	gat Asp	gct Ala	gca Ala	tct Ser 790	aat Asn	gac Asp	att Ile	cca Pro	aca Thr 795	ttg Leu	acc Thr	2643	
aaa Lys	aag Lys	gag Glu 800	aaa Lys	att Ile	tct Ser	ttg Leu	caa Gln 805	atg Met	gaa Glu	gag Glu	ttt Phe	aat Asn 810	act Thr	gca Ala	att Ile	2691	
tat Tyr	tca Ser	aat Asn	gat Asp	gac Asp	tta Leu 820	ctt Leu	tct Ser	tct Ser	aag Lys	gaa Glu	gac Asp 825	aaa Lys	ata Ile	aaa Lys	gaa Glu	2739	
agt Ser 830	gaa Glu	aca Thr	ttt Phe	tca Ser	gat Asp 835	tca Ser	tct Ser	ccg Pro	att Ile	gag Glu 840	ata Ile	ata Ile	gat Asp	gaa Glu	ttt Phe 845	2787	
ccc Pro	acg Thr	ttt Phe	gtc Val	agt Ser 850	gct Ala	aaa Lys	gat Asp	gat Asp	tct Ser 855	cct Pro	aaa Lys	tta Leu	gcc Ala	aag Lys 860	gag Glu	2835	
tac Tyr	act Thr	gat Asp	cta Leu 865	gaa Glu	gta Val	tcc Ser	gac Asp	aaa Lys 870	agt Ser	gaa Glu	att Ile	gct Ala	aat Asn 875	atc Ile	caa Gln	2883	
agc Ser	ggg Gly	gca Ala 880	gat Asp	tca Ser	ttg Leu	cct Pro	tgc Cys 885	tta Leu	gaa Glu	ttg Leu	ccc Pro	tgt Cys 890	gac Asp	ctt Leu	tct Ser	2931	
ttc Phe	aag Lys 895	aat Asn	ata Ile	tat Tyr	cct Pro	aaa Lys 900	gat Asp	gaa Glu	gta Val	cat His	gtt Val 905	tca Ser	gat Asp	gaa Glu	ttc Phe	2979	
tcc Ser 910	gaa Glu	aat Asn	agg Arg	tcc Ser	agt Ser 915	gta Val	tct Ser	aag Lys	gca Ala	tcc Ser 920	ata Ile	tcg Ser	cct Pro	tca Ser	aat Asn 925	3027	
gtc Val	tct Ser	gct Ala	ttg Leu	gaa Glu 930	cct Pro	cag Gln	aca Thr	gaa Glu	atg Met 935	ggc Gly	agc Ser	ata Ile	gtt Val	aaa Lys 940	tcc Ser	3075	
aaa	tca	ctt	acg	aaa	gaa	gca	gag	aaa	aaa	ctt	cct	tct	gac	aca	gag	3123	

Lys Ser Leu Thr Lys Glu Ala Glu Lys Lys Leu Pro Ser Asp Thr Glu
 945 950 955

aaa gag gac aga tcc ctg tca gct gta ttg tca gca gag ctg agt aaa 3171
 Lys Glu Asp Arg Ser Leu Ser Ala Val Leu Ser Ala Glu Leu Ser Lys
 960 965 970

act tca gtt gtt gac ctc ctc tac tgg aga gac att aag aag act gga 3219
 Thr Ser Val Val Asp Leu Leu Tyr Trp Arg Asp Ile Lys Lys Thr Gly
 975 980 985

gtg gtg ttt ggt gcc agc tta ttc ctg ctg ctg tct ctg aca gtg ttc 3267
 Val Val Phe Gly Ala Ser Leu Phe Leu Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe
 990 995 1000 1005

agc att gtc agt gta acg gcc tac att gcc ttg gcc ctg ctc tcg gtg 3315
 Ser Ile Val Ser Val Thr Ala Tyr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Ser Val
 1010 1015 1020

act atc agc ttt agg ata tat aag ggc gtg atc cag gct atc cag aaa 3363
 Thr Ile Ser Phe Arg Ile Tyr Lys Gly Val Ile Gln Ala Ile Gln Lys
 1025 1030 1035

tca gat gaa gcc cac cca ttc agg gca tat tta gaa tct gaa gtt gct 3411
 Ser Asp Glu Gly His Pro Phe Arg Ala Tyr Leu Glu Ser Glu Val Ala
 1040 1045 1050

ata tca gag gaa ttg gtt cag aaa tac agt aat tct gct ctt ggt cat 3459
 Ile Ser Glu Glu Leu Val Gln Lys Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Gly His
 1055 1060 1065

gtg aac agc aca ata aaa gaa ctg agg cgg ctt ttc tta gtt gat gat 3507
 Val Asn Ser Thr Ile Lys Glu Leu Arg Arg Leu Phe Leu Val Asp Asp
 1070 1075 1080 1085

tta gtt gat tcc ctg aag ttt gca gtg ttg atg tgg gtg ttt act tat 3555
 Leu Val Asp Ser Leu Lys Phe Ala Val Leu Met Trp Val Phe Thr Tyr
 1090 1095 1100

gtt ggt gcc ttg ttc aat ggt ctg aca cta ctg att tta gct ctg atc 3603
 Val Gly Ala Leu Phe Asn Gly Leu Thr Leu Leu Ile Leu Ala Leu Ile
 1105 1110 1115

tca ctc ttc agt att cct gtt att tat gaa cgg cat cag gtg cag ata 3651
 Ser Leu Phe Ser Ile Pro Val Ile Tyr Glu Arg His Gln Val Gln Ile
 1120 1125 1130

gat cat tat cta gga ctt gca aac aag agt gtt aag gat gcc atg gcc 3699
 Asp His Tyr Leu Gly Leu Ala Asn Lys Ser Val Lys Asp Ala Met Ala
 1135 1140 1145

aaa atc caa gca aaa atc cct gga ttg aag cgc aaa gca gat 3741
 Lys Ile Gln Ala Lys Ile Pro Gly Leu Lys Arg Lys Ala Asp
 1150 1155 1160

- <210> 2
- <211> 1163
- 5 <212> PRT
- <213> Rattus sp.

- <400> 2

Met Glu Asp Ile Asp Gln Ser Ser Leu Val Ser Ser Ser Thr Asp Ser
 1 5 10 15
 Pro Pro Arg Pro Pro Ala Phe Lys Tyr Gln Phe Val Thr Glu Pro
 20 25 30
 Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Glu Asp Asp
 35 40 45

Glu Asp Leu Glu Glu Leu Glu Val Leu Glu Arg Lys Pro Ala Ala Gly
 50 55 60
 Leu Ser Ala Ala Ala Val Pro Pro Ala Ala Ala Ala Pro Leu Leu Asp
 65 70 75
 Phe Ser Ser Asp Ser Val Pro Pro Ala Pro Arg Gly Pro Leu Pro Ala
 85 90
 Ala Pro Pro Ala Ala Pro Glu Arg Gln Pro Ser Trp Glu Arg Ser Pro
 100 105
 Ala Ala Pro Ala Pro Ser Leu Pro Pro Ala Ala Ala Val Leu Pro Ser
 115 120
 Lys Leu Pro Glu Asp Asp Glu Pro Pro Ala Arg Pro Pro Pro Pro
 130 135 140
 Pro Ala Gly Ala Ser Pro Leu Ala Glu Pro Ala Ala Pro Pro Ser Thr
 145 150 155 160
 Pro Ala Ala Pro Lys Arg Arg Gly Ser Gly Ser Val Asp Glu Thr Leu
 165 170 175
 Phe Ala Leu Pro Ala Ala Ser Glu Pro Val Ile Pro Ser Ser Ala Glu
 180 185 190
 Lys Ile Met Asp Leu Met Glu Gln Pro Gly Asn Thr Val Ser Ser Gly
 195 200 205
 Gln Glu Asp Phe Pro Ser Val Leu Leu Glu Thr Ala Ser Leu Pro
 210 215 220
 Ser Leu Ser Pro Leu Ser Thr Val Ser Phe Lys Glu His Gly Tyr Leu
 225 230 235 240
 Gly Asn Leu Ser Ala Val Ser Ser Ser Glu Gly Thr Ile Glu Glu Thr
 245 250 255
 Leu Asn Glu Ala Ser Lys Glu Leu Pro Glu Arg Ala Thr Asn Pro Phe
 260 265 270
 Val Asn Arg Asp Leu Ala Glu Phe Ser Glu Leu Glu Tyr Ser Glu Met
 275 285
 Gly Ser Ser Phe Lys Gly Ser Pro Lys Gly Glu Ser Ala Ile Leu Val
 290 295 300
 Glu Asn Thr Lys Glu Glu Val Ile Val Arg Ser Lys Asp Lys Glu Asp
 305 310 315 320
 Leu Val Cys Ser Ala Ala Leu His Ser Pro Gln Glu Ser Pro Val Gly
 325 330 335
 Lys Glu Asp Arg Val Val Ser Pro Glu Lys Thr Met Asp Ile Phe Asn
 340 345 350
 Glu Met Gln Met Ser Val Val Ala Pro Val Arg Glu Glu Tyr Ala Asp
 355 360 365
 Phe Lys Pro Phe Glu Gln Ala Trp Glu Val Lys Asp Thr Tyr Glu Gly
 370 375 380
 Ser Arg Asp Val Leu Ala Ala Arg Ala Asn Val Glu Ser Lys Val Asp
 385 390 395 400
 Arg Lys Cys Leu Glu Asp Ser Leu Glu Gln Lys Ser Leu Gly Lys Asp
 405 410 415
 Ser Glu Gly Arg Asn Glu Asp Ala Ser Phe Pro Ser Thr Pro Glu Pro
 420 425 430
 Val Lys Asp Ser Ser Arg Ala Tyr Ile Thr Cys Ala Ser Phe Thr Ser
 435 440 445
 Ala Thr Glu Ser Thr Thr Ala Asn Thr Phe Pro Leu Leu Glu Asp His
 450 455 460
 Thr Ser Glu Asn Lys Thr Asp Glu Lys Lys Ile Glu Glu Arg Lys Ala
 465 470 475 480
 Gln Ile Ile Thr Glu Lys Thr Ser Pro Lys Thr Ser Asn Pro Phe Leu
 485 490 495
 Val Ala Val Gln Asp Ser Glu Ala Asp Tyr Val Thr Thr Asp Thr Leu
 500 505 510
 Ser Lys Val Thr Glu Ala Ala Val Ser Asn Met Pro Glu Gly Leu Thr
 515 520 525
 Pro Asp Leu Val Gln Glu Ala Cys Glu Ser Glu Leu Asn Glu Ala Thr
 530 535 540
 Gly Thr Lys Ile Ala Tyr Glu Thr Lys Val Asp Leu Val Gln Thr Ser
 545 550 555 560
 Glu Ala Ile Gln Glu Ser Leu Tyr Pro Thr Ala Gln Leu Cys Pro Ser
 565 570 575
 Phe Glu Glu Ala Glu Ala Thr Pro Ser Val Leu Pro Asp Ile Val
 580 585 590

Met Glu Ala Pro Leu Asn Ser Leu Leu Pro Ser Ala Gly Ala Ser Val
 595 600 605
 Val Gln Pro Ser Val Ser Pro Leu Glu Ala Pro Pro Pro Val Ser Tyr
 610 615 620
 Asp Ser Ile Lys Leu Glu Pro Glu Asn Pro Pro Tyr Glu Glu Ala
 625 630 635 640
 Met Asn Val Ala Leu Lys Ala Leu Gly Thr Lys Glu Gly Ile Lys Glu
 645 650 655
 Pro Glu Ser Phe Asn Ala Ala Val Gln Glu Thr Glu Ala Pro Tyr Ile
 660 665 670
 Ser Ile Ala Cys Asp Leu Ile Lys Glu Thr Lys Leu Ser Thr Glu Pro
 675 680 685
 Ser Pro Asp Phe Ser Asn Tyr Ser Glu Ile Ala Lys Phe Glu Lys Ser
 690 695 700
 Val Pro Glu His Ala Glu Leu Val Glu Asp Ser Pro Glu Ser Glu
 705 710 715 720
 Pro Val Asp Leu Phe Ser Asp Asp Ser Ile Pro Glu Val Pro Gln Thr
 725 730 735
 Gln Glu Glu Ala Val Met Leu Met Lys Glu Ser Leu Thr Glu Val Ser
 740 745 750
 Glu Thr Val Ala Gln His Lys Glu Glu Arg Leu Ser Ala Ser Pro Gln
 755 760 765
 Glu Leu Gly Lys Pro Tyr Leu Glu Ser Phe Gln Pro Asn Leu His Ser
 770 775 780
 Thr Lys Asp Ala Ala Ser Asn Asp Ile Pro Thr Leu Thr Lys Lys Glu
 785 790 795 800
 Lys Ile Ser Leu Gln Met Glu Glu Phe Asn Thr Ala Ile Tyr Ser Asn
 805 810 815
 Asp Asp Leu Leu Ser Ser Lys Glu Asp Lys Ile Lys Glu Ser Glu Thr
 820 825 830
 Phe Ser Asp Ser Ser Pro Ile Glu Ile Ile Asp Glu Phe Pro Thr Phe
 835 840 845
 Val Ser Ala Lys Asp Asp Ser Pro Lys Leu Ala Lys Glu Tyr Thr Asp
 850 855 860
 Leu Glu Val Ser Asp Lys Ser Glu Ile Ala Asn Ile Gln Ser Gly Ala
 865 870 875 880
 Asp Ser Leu Pro Cys Leu Glu Leu Pro Cys Asp Leu Ser Phe Lys Asn
 885 890 895
 Ile Tyr Pro Lys Asp Glu Val His Val Ser Asp Glu Phe Ser Glu Asn
 900 905 910
 Arg Ser Ser Val Ser Lys Ala Ser Ile Ser Pro Ser Asn Val Ser Ala
 915 920 925
 Leu Glu Pro Gln Thr Glu Met Gly Ser Ile Val Lys Ser Lys Ser Leu
 930 935 940
 Thr Lys Glu Ala Glu Lys Lys Leu Pro Ser Asp Thr Glu Lys Glu Asp
 945 950 955 960
 Arg Ser Leu Ser Ala Val Leu Ser Ala Glu Leu Ser Lys Thr Ser Val
 965 970 975
 Val Asp Leu Leu Tyr Trp Arg Asp Ile Lys Lys Thr Gly Val Val Phe
 980 985 990
 Gly Ala Ser Leu Phe Leu Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe Ser Ile Val
 995 1000 1005
 Ser Val Thr Ala Tyr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Ser Val Thr Ile Ser
 1010 1015 1020
 Phe Arg Ile Tyr Lys Gly Val Ile Gln Ala Ile Gln Lys Ser Asp Glu
 1025 1030 1035 1040
 Gly His Pro Phe Arg Ala Tyr Leu Glu Ser Glu Val Ala Ile Ser Glu
 1045 1050 1055
 Glu Leu Val Gln Lys Tyr Ser Asn Si Ala Leu Gly His Val Asn Ser
 1060 1065 1070
 Thr Ile Lys Glu Leu Arg Arg Leu Phe Leu Val Asp Asp Leu Val Asp
 1075 1080 1085
 Ser Leu Lys Phe Ala Val Leu Met Trp Val Phe Thr Tyr Val Gly Ala
 1090 1095 1100
 Leu Phe Asn Gly Leu Thr Leu Leu Ile Leu Ala Leu Ile Ser Leu Phe
 1105 1110 1115 1120
 Ser Ile Pro Val Ile Tyr Glu Arg His Gln Val Gln Ile Asp His Tyr
 1125 1130 1135

Leu Gly Leu Ala Asn Lys Ser Val Lys Asp Ala Met Ala Lys Ile Gln
 1140 1145 1150
 Ala Lys Ile Pro Gly Leu Lys Arg Lys Ala Asp
 1155 1160

- <210> 3
- <211> 13
- 5 <212> PRT
- <213> Bos sp.

<400> 3

Glu Tyr Leu Gly Asp Leu Pro Ala Val Leu Pro Thr Glu
 1 5 10

- <210> 4
- <211> 11
- <212> PRT
- 15 <213> Bos sp.

<400> 4

Glu Ile Ala Glu Ile Gln Asp Gly Glu Ser Leu
 1 5 10

- <210> 5
- <211> 15
- <212> PRT
- <213> Bos sp.

- 25 <220>
- <221> VARIANT
- <222> 2
- <223> Xaa = any amino acid

30 <400> 5

Lys Xaa Tyr Leu Glu Ser Ile Gln Pro Ser Leu Gly Ile Thr Lys
 1 5 10 15

- 35 <210> 6
- <211> 9
- <212> PRT
- <213> Bos sp.

- 40 <220>
- <221> VARIANT
- <222> 2,5
- <223> Xaa = any amino acid

45 <400> 6

Lys Xaa Phe Glu Xaa Val Trp Glu Val
 1 5

<210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Bos sp.

5

<400> 7

Val Val Asp Leu Leu Tyr Trp Arg Asp Ile Lys
 1 5 10

10 <210> 8
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Bos sp.

15 <400> 8

Lys Ala Val Ala Ala Glu Ala Ser Met Arg Glu Glu Tyr Ala Asp Phe
 1 5 10 15

20 <210> 9
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Bos sp.

<400> 9

25

Glu Tyr Leu Gly Asp Leu Pro Ala Val Leu Pro Thr Glu
 1 5 10

30 <210> 10
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Bos sp.

<400> 10

35 Glu Ile Ala Asp Ile Gln Asp Gly Ala Gly Ser Leu
 1 5 10

40 <210> 11
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Bos sp.

<400> 11

Lys Pro Tyr Leu Glu Ser Phe Gln Pro Ser Leu Gly Ile Thr Lys
 1 5 10 15

45

<210> 12
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Bos sp.

<400> 12

Lys Pro Phe Glu Arg Val Trp Glu Val
 1 5

- 5 <210> 13
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> Bos sp.

10 <400> 13

Val Val Asp Leu Leu Tyr Trp Arg Asp Ile Lys
 1 5 10

- 15 <210> 14
- <211> 16
- <212> PRT
- <213> Bos sp.

<400> 14

20

Lys Gly Val Ala Ala Glu Ala Ser Met Gly Glu Glu Tyr Ala Asp Phe
 1 5 10 15

- <210> 15
- <211> 13
- 25 <212> PRT
- <213> Rattus sp.

<400> 15

Gly Tyr Leu Gly Asn Leu Ser Ala Val Ser Ser Ser Glu
 1 5 10

30

- <210> 16
- <211> 12
- <212> PRT
- 35 <213> Rattus sp.

<400> 16

Glu Ile Ala Asn Ile Gln Ser Gly Ala Asp Ser Leu
 1 5 10

40

- <210> 17
- <211> 15
- <212> PRT
- <213> Rattus sp.

45

<400> 17

Lys Pro Tyr Leu Glu Ser Phe Gln Pro Asn Leu His Ser Thr Lys
 1 5 10 15

5 <210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.

<400> 18

Lys Pro Phe Glu Gln Ala Trp Glu Val
 1 5

10 <210> 19
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.

15 <400> 19

Val Val Asp Leu Leu Tyr Trp Arg Asp Ile Lys
 1 5 10

20 <210> 20
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.

25 <400> 20

Met Gln Met Ser Val Val Ala Pro Val Arg Glu Glu Tyr Ala Asp Phe
 1 5 10 15

30 <210> 21
 <211> 186
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <400> 21

Asp Leu Leu Tyr Trp Arg Asp Ile Lys Gln Thr Gly Ile Val Phe Gly
 1 5 10 15
 Ser Phe Leu Leu Leu Leu Phe Ser Leu Thr Gln Phe Ser Val Val Ser
 20 25 30
 Val Val Ala Tyr Leu Ala Leu Ala Leu Ser Ala Thr Ile Ser Phe
 35 40 45
 Arg Ile Tyr Lys Ser Val Leu Gln Ala Val Gln Lys Thr Asp Glu Gly
 50 55 60
 His Pro Phe Lys Ala Tyr Leu Glu Leu Glu Ile Thr Leu Ser Gln Glu
 65 70 75 80
 Gln Ile Gln Lys Tyr Thr Asp Cys Leu Gln Phe Tyr Val Asn Ser Thr
 85 90 95
 Leu Lys Glu Leu Arg Arg Leu Phe Leu Val Gln Asp Leu Val Asp Ser
 100 105 110
 Leu Lys Phe Ala Val Leu Met Trp Leu Leu Thr Tyr Val Gly Ala Leu
 115 120 125
 Phe Asn Gly Leu Thr Leu Leu Leu Met Ala Val Val Ser Met Phe Thr
 130 135 140
 Leu Pro Val Val Tyr Val Lys His Gln Ala Gln Ile Asp Gln Tyr Leu
 145 150 155 160

Gly Leu Val Arg Thr His Ile Asn Ala Val Val Ala Lys Ile Gln Ala
 165 170 175
 Lys Ile Pro Gly Ala Lys Arg His Ala Glu
 180 185

<210> 22
 <211> 186
 5 <212> PRT
 <213> Rattus sp.

<400> 22

Asp Leu Leu Tyr Trp Arg Asp Ile Lys Gln Thr Gly Ile Val Phe Gly
 1 5 10 15
 Ser Phe Leu Leu Leu Phe Ser Leu Thr Gln Phe Ser Val Val Ser
 20 25 30
 Val Val Ala Tyr Leu Ala Leu Ala Ala Leu Ser Ala Thr Ile Ser Phe
 35 40 45
 Arg Ile Tyr Lys Ser Val Leu Gln Ala Val Gln Lys Thr Asp Glu Gly
 50 55 60
 His Pro Phe Lys Ala Tyr Leu Glu Leu Glu Ile Thr Leu Ser Gln Glu
 65 70 75 80
 Gln Ile Gln Lys Tyr Thr Asp Cys Leu Gln Leu Tyr Val Asn Ser Thr
 85 90 95
 Leu Lys Glu Leu Arg Arg Leu Phe Leu Val Gln Asp Leu Val Asp Ser
 100 105 110
 Leu Lys Phe Ala Val Leu Met Trp Leu Leu Thr Tyr Val Gly Ala Leu
 115 120 125
 Phe Asn Gly Leu Thr Leu Leu Ile Met Ala Val Val Ser Met Phe Thr
 130 135 140
 Leu Pro Val Val Tyr Val Lys His Gln Ala Gln Val Asp Gln Tyr Leu
 145 150 155 160
 Gly Leu Val Arg Thr His Ile Asn Thr Val Val Ala Lys Ile Gln Ala
 165 170 175
 Lys Ile Pro Gly Ala Lys Arg His Ala Glu
 180 185

10 <210> 23
 <211> 186
 <212> PRT
 <213> Gallus gallus

15 <400> 23

Asn Leu Leu Tyr Trp Arg Asp Ile Lys Gln Thr Gly Ile Val Phe Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Leu Leu Leu Phe Ser Leu Thr Gln Phe Ser Val Val Ser
 20 25 30
 Val Val Ala Tyr Leu Ala Leu Ala Gly Leu Ser Ala Thr Ile Ser Phe
 35 40 45
 Arg Ile Tyr Lys Ser Val Leu Gln Ala Val Gln Lys Thr Asp Glu Gly
 50 55 60
 His Pro Phe Lys Ala Tyr Leu Asp Met Glu Met Asn Leu Ser Gln Asp
 65 70 75 80
 Gln Ile Gln Lys Tyr Thr Asp Cys Leu Gln Leu Tyr Val Asn Ser Thr
 85 90 95
 Val Lys Glu Leu Arg Arg Leu Phe Leu Val Gln Asp Leu Val Asp Ser
 100 105 110
 Leu Lys Phe Ala Val Leu Met Trp Leu Leu Thr Tyr Val Gly Ala Leu
 115 120 125
 Phe Asn Gly Leu Thr Leu Leu Ile Met Ala Val Val Ser Met Phe Thr
 130 135 140
 Leu Pro Val Val Tyr Asp Lys Tyr Gln Ala Gln Ile Asp Gln Tyr Leu
 145 150 155 160
 Gly Leu Val Arg Thr His Ile Asn Thr Val Val Ala Lys Ile Gln Ala
 165 170 175
 Lys Ile Pro Gly Ala Lys Arg Lys Ala Glu
 180 185

<210> 24
 <211> 186
 <212> PRT
 5 <213> Bos sp.

<400> 24

Asp Leu Leu Tyr Trp Arg Asp Ile Lys Lys Thr Gly Val Val Phe Gly
 1 5 10 15
 Ala Ser Leu Phe Leu Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe Ser Ile Val Ser
 20 25 30
 Val Thr Ala Tyr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Ser Val Thr Ile Ser Phe
 35 40 45
 Arg Ile Tyr Lys Gly Val Ile Gln Ala Ile Gln Lys Ser Asp Glu Gly
 50 55 60
 His Pro Phe Arg Ala Tyr Leu Glu Ser Glu Val Ala Ile Ser Glu Glu
 65 70 75 80
 Leu Val Gln Lys Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Gly His Val Asn Cys Thr
 85 90 95
 Ile Lys Glu Leu Arg Arg Leu Phe Leu Val Asp Asp Leu Val Asp Ser
 100 105 110
 Leu Lys Phe Ala Val Leu Met Trp Val Phe Thr Tyr Val Gly Ala Leu
 115 120 125
 Phe Asn Gly Leu Thr Leu Leu Ile Leu Ala Leu Ile Ser Leu Phe Ser
 130 135 140
 Val Pro Val Ile Tyr Glu Arg His Gln Ala Gln Ile Asp His Tyr Leu
 145 150 155 160
 Gly Leu Ala Asn Lys Ser Val Lys Asp Ala Met Ala Lys Ile Gln Ala
 165 170 175
 Lys Ile Pro Gly Leu Lys Arg Lys Ala Glu
 180 185

10 <210> 25
 <211> 186
 <212> PRT
 <213> Rattus sp.

15 <400> 25

Asp Leu Leu Tyr Trp Arg Asp Ile Lys Lys Thr Gly Val Val Phe Gly
 1 5 10 15
 Ala Ser Leu Phe Leu Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe Ser Ile Val Ser
 20 25 30
 Val Thr Ala Tyr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Ser Val Thr Ile Ser Phe
 35 40 45
 Arg Ile Tyr Lys Gly Val Ile Gln Ala Ile Gln Lys Ser Asp Glu Gly
 50 55 60
 His Pro Phe Arg Ala Tyr Leu Glu Ser Glu Val Ala Ile Ser Glu Glu
 65 70 75 80
 Leu Val Gln Lys Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Gly His Val Asn Ser Thr
 85 90 95
 Ile Lys Glu Leu Arg Arg Leu Phe Leu Val Asp Asp Leu Val Asp Ser
 100 105 110
 Leu Lys Phe Ala Val Leu Met Trp Val Phe Thr Tyr Val Gly Ala Leu
 115 120 125
 Phe Asn Gly Leu Thr Leu Leu Ile Leu Ala Leu Ile Ser Leu Phe Ser
 130 135 140
 Ile Pro Val Ile Tyr Glu Arg His Gln Val Gln Ile Asp His Tyr Leu
 145 150 155 160
 Gly Leu Ala Asn Lys Ser Val Lys Asp Ala Met Ala Lys Ile Gln Ala
 165 170 175
 Lys Ile Pro Gly Leu Lys Arg Lys Ala Asp
 180 185

20 <210> 26
 <211> 194

<212> PRT
 <213> Caenorhabditis elegans
 <400> 26

5

Asp Val Ile Tyr Trp Arg Asp Ala Lys Lys Ser Ala Ile Val Leu Ser
 1 5 10 15
 Leu Ala Leu Leu Val Leu Phe Val Leu Ala Lys Tyr Pro Leu Leu Thr
 20 25 30
 Val Val Thr Tyr Ser Leu Leu Leu Ala Leu Gly Ala Ala Ala Gly Phe
 35 40 45
 Arg Val Phe Lys Lys Val Glu Ala Gln Ile Lys Lys Thr Asp Ser Glu
 50 55 60
 His Pro Phe Ser Glu Ile Leu Ala Gln Asp Leu Thr Leu Pro Gln Glu
 65 70 75 80
 Lys Val His Ala Gln Ala Asp Val Phe Val Glu His Ala Thr Cys Ile
 85 90 95
 Ala Asn Lys Leu Lys Lys Leu Val Phe Val Glu Ser Pro Leu Glu Ser
 100 105 110
 Ile Lys Phe Gly Leu Val Leu Trp Ser Leu Thr Tyr Ile Ala Ser Trp
 115 120 125
 Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ala Ile Leu Gly Leu Leu Gly Val Phe Ser
 130 135 140
 Val Pro Lys Val Tyr Glu Ser Asn Gln Glu Ala Ile Asp Pro His Leu
 145 150 155 160
 Ala Thr Ile Ser Gly His Leu Lys Asn Val Gln Asn Ile Ile Asp Glu
 165 170 175
 Lys Leu Pro Phe Leu Arg Ser Ala Pro Val Ala Ala Glu Glu Lys Lys
 180 185 190
 Asp Gln

10

<210> 27
 <211> 150
 <212> PRT
 <213> Drosophila melanogaster

15

<400> 27

Asn Leu Leu Leu Trp Arg Asn Ser Arg Lys Thr Leu Ile Val Phe Thr
 1 5 10 15
 Gly Ile Leu Leu Leu Leu Leu Asp Val Met Val His Ser Val Ile Ser
 20 25 30
 Val Ile Ser Met Val Gly Ile Thr Val Leu Ile Ala Ala Ile Gly His
 35 40 45
 Arg Leu Leu Val Gln Phe Trp Ser Ile Trp Lys Lys Asp Glu Asn Lys
 50 55 60
 Asp Gln Ile Leu Arg Phe Tyr Pro His Pro Lys Ile Glu Ile Pro Arg
 65 70 75 80
 Glu Glu Thr Leu Tyr Leu Ala Gly Lys Ala Val Ser His Ile Asn Leu
 85 90 95
 Ile Leu Asn Arg Met Ile Glu Leu Leu Leu Val Glu Lys Trp Glu Asp
 100 105 110
 Ser Leu Lys Phe Leu Val Leu Leu Cys Gly Ile Asn Leu Leu Gly Asp
 115 120 125
 Cys Phe Asn Gly Leu Thr Leu Leu Ile Phe Gly Met Cys Ile Cys Cys
 130 135 140
 Leu Thr Leu Leu Tyr Leu
 145 150

20

<210> 28
 <211> 3833
 <212> DNA
 <213> Bos sp.

<400> 28

ctatctcctc	tctcagccgc	tgccttttaa	gaacgtgaat	accttggtga	tttaccagca	60
gtactgcccc	ctgaaggaac	acttccagca	acttcaaatg	aagcttctaa	agcattctca	120
gagaaggcaa	aaaatccatt	tgtagagaga	aatttaacag	aattttcaga	attggaatat	180
tcagaaatgg	aatcatcatt	cagtggctct	caaaaggcag	aacctgccgt	aacagtagcg	240
aatcctaggg	acgaaatagt	tgtgaggagt	agagataaag	aagaggactt	agttagctct	300
aacatccttc	atactcagca	ggagttatct	acagctctta	cgaaatcagt	tgaagaagaa	360
gatagagttc	tgtctccaga	aaaaacaaag	gacagtttta	aggaaaaggg	agttgcagca	420
gaagcttcta	tgggggagga	atatgcagac	ttcaaacat	ttgagcgagt	atgggaagtg	480
aaagatactt	acaagcaaga	tagtgatggt	ttgattgctg	gaggtaatat	agagagcaaa	540
ttggaaggta	aagtggataa	gaaacacttt	tcagatagcc	ttgaacaaac	aaatcgtgaa	600
aaagatagtg	aaagcagtaa	tgatgacact	tcatttcca	gtacaccaga	agctgtaaga	660
ggtggttccg	gagcgtacat	cacgtgtgct	ccctttaacc	caacaactga	gaatgtttca	720
acaaacattt	ttcccttggt	ggaagatcat	acttcggaaa	ataagacaga	tgaaaaaaag	780
atagaaaaaa	aaaggcacia	attgtaacag	agaagaatgc	aagtgtcaag	acatcaaacc	840
ctttccttat	ggcagcacag	gagtctaaga	cagattacgt	tacaacagat	catgtgtcaa	900
aggtgaccga	ggaagtagtg	gcaaacatgc	ctgaaagctc	aaccccagat	ttggttcagg	960
aagcatgtga	aagtgaattg	aatgaagcta	ctggtacaaa	aattgccitt	gaaacaaaaa	1020
tggacctggt	tcaaacctca	gaagctgtgc	aggagtcact	ttaccctgta	acacagcttt	1080
gcccattctt	tgaagaatct	gaagctactc	cgtaaccggt	tttgccctgac	attgtcatgg	1140
aaccaccatt	aaattctgta	gttcttagtg	ctggtgcttc	tgcagtgcag	ctcagttcat	1200
caggctatga	actcttctct	tcagtttaatt	atgaaagcat	aaagtttgag	cctgaaaatc	1260
ccccaccata	tgaggaggcc	atgaatgtat	cactaaaaaa	agaatcagga	atgaatgaag	1320
aaatcacaga	gcttgaaggt	attagtgtag	ctgttcagga	aacagaagct	ccttatatat	1380
ctattgcatg	tgatttaatt	aaagaacaaa	agatctctac	tgaaccgact	ccagatttct	1440
ctagtatttc	agaaatagca	gaagttgcac	agccagtgcc	cgagcattct	gagctatttg	1500
aagattcctc	ccccgattct	gaaccagttg	acttatttag	tgatgattca	ataccggaag	1560
ttccacaaaa	acaagatgaa	gctgtaatac	ttgtgaaaga	aaacctcact	gaaatttcat	1620
ctgagtcaat	gacaggacat	gacaataagg	gaaaaactcag	tgcttcacca	tcacctgagg	1680
gaggaaaaac	gtatttggag	tcttttcagc	ccagtttagg	catcacaaaa	gataccttag	1740
cacctgatga	agtttcagca	ttgacccaaa	aggagaaaat	ccctttgcag	atggaggag	1800
tcaatactgc	agttttattca	agtgatggct	tattcattgc	tcaggaagca	aacctaaag	1860
aaagtgaaac	attttcagat	tcattctccga	ttgagattat	agatgagttc	ccgacctttg	1920
tcagttctaa	agcagattct	tctctacat	tagccagggg	atacactgac	ctagaagtag	1980
ccccaaaaag	tgaatttgct	gacatccagg	atggagctgg	gtcattggct	tgtgcaggat	2040
tgccccatga	cttttctttc	aagagtatac	aacctaaaga	ggaagttcat	gtcccagatg	2100
agtttctcaa	agataggggt	gatgtttcaa	aggtgccctg	actgcctcca	gatgtttctg	2160
ctttggatgc	tcaagcagag	atagggcagca	tagaaaaacc	caaagttctt	gtgaaagaag	2220
ccgagagaaa	acttccctct	gatacagaaa	aagagcgaag	atctccatct	gctataattt	2280
cagcagagct	gagtaaaact	tcagttggtg	acctcctcta	ctggagagac	attaagaaga	2340
ctggagtggt	gtttgggtg	agcttggttc	tgctgtctc	gctgacagta	ttcagcattg	2400
tgagtgtaac	ggcctacatt	gccttgccc	tgctctctgt	gactatcagc	tttaggat	2460
ataaggggtg	gatccaggct	atccagaaat	ctgatgaaag	ccaccattc	agggcatatt	2520
tggaatctga	agttgctata	tctgaggagt	tggttcagaa	gtacagcaat	tctgtctctg	2580
gtcatgttaa	ctgcacaata	aaagaactca	gacgctctt	cttagttgat	tcttagttg	2640
attctctgaa	gtttgcagtg	ttgatgtggg	tatttaccta	tgttgggtgcc	ttgttcaatg	2700
gtctgacact	actaattttg	gctctgattt	cactcttcag	tgttctctgt	atttatgaac	2760
ggcatcagcc	gcaaatagat	cattatctgg	gacttgcaaa	taagaatgtt	aaagatgcta	2820
tggctaaagt	ccaagcaaaa	atccctggat	tgaagcgtaa	agctgaatga	gaaagcctga	2880
aagagttaac	aatagaggag	ttatctttta	aaggggat	tcatttgatt	ccattgggga	2940
gggtcagggg	agaacaaagc	cttgacattg	cagtgacgtt	tcacagatct	ttatttttag	3000
caacgcagtg	tctgaggaaa	aatgacctgt	cttgactgcc	ctgtgttcat	catcttaagt	3060
attgtaagct	gctatgtatg	gatttaaatc	gtaatcatat	ttgtttttcc	tgtatgaggc	3120
actggtgaa	aaacaaagat	ctgagaaagc	tgtatattac	actttgtcgc	aggtagctct	3180
gctgtatttg	gggaattgca	aagaaagtgg	agctgacaga	aataaccctt	ttcacagttt	3240
gtgcaactgt	tacggctctg	gtaggttgat	gcagattttc	tgaaatgaaa	tgttttagacg	3300
agatcatgcc	accaagggcag	gagtgaaaaa	gcttgccttt	cctggatgtg	tctaggtgta	3360
ttgtgaaatt	tactgttgta	ttaattgcca	atataagtaa	atatagatta	tatatatcta	3420
tatatagtg	ttcacgaagc	ttagcccttt	accttccag	ctgcccaca	gtgcttgata	3480
cttctgtcat	gggttttatg	tgtgtagtc	caaagcacat	aagctagggg	gaaacgtact	3540
tctagggcga	ctaccatctg	ttttcaacac	gaaccgacgc	catgcaaaac	gaactcctca	3600
acataaacct	cactgcacag	acttactgta	gttaatttta	tcacaaactc	tggagtgaat	3660
ctaattgctt	caaaaaatgtt	tgcaaatatc	aaacattggt	atgtaagaaa	atataaatga	3720
cgattttatac	aattgtgggt	taagctgtat	tgaactaaat	ctgtggaatg	cattgtgaa	3780
tgtaaaagca	aagtatcaat	aaagcttata	gacttaaaaa	aaaaaaaaaa	aaa	3833

<210> 29

<211> 1178

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

5

- <221> VARIANT
- <222> 187, 188, 189, 190, 221, 328, 477
- <223> Xaa = any amino acid
- <400> 29

```

Met Glu Asp Leu Asp Gln Ser Pro Leu Val Ser Ser Ser Asp Ser Pro
 1      5      10      15
Pro Arg Pro Gln Pro Ala Phe Lys Tyr Gln Phe Val Arg Glu Pro Glu
      20      25      30
Asp Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Asp Glu Asp Glu Asp
      35      40      45
Leu Glu Glu Leu Glu Val Leu Glu Arg Lys Pro Ala Ala Gly Leu Ser
      50      55      60
Ala Ala Pro Val Pro Thr Ala Pro Ala Ala Gly Ala Pro Leu Met Asp
65      70      75      80
Phe Gly Asn Asp Phe Val Pro Pro Ala Pro Arg Gly Pro Leu Pro Ala
      85      90      95
Ala Pro Pro Val Ala Pro Glu Arg Gln Pro Ser Trp Asp Pro Ser Pro
      100      105      110
Val Ser Ser Thr Val Pro Ala Pro Ser Pro Leu Ser Ala Ala Ala Val
      115      120      125
Ser Pro Ser Lys Leu Pro Glu Asp Asp Glu Pro Pro Ala Arg Pro Pro
130      135      140
Pro Pro Pro Pro Ala Ser Val Ser Pro Gln Ala Glu Pro Val Trp Thr
145      150      155      160
Pro Pro Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro Pro Ser Thr Pro Ala Ala Pro
      165      170      175
Lys Arg Arg Gly Ser Ser Gly Ala Val Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Ile
      180      185      190
Met Asp Leu Lys Gln Gln Pro Gly Asn Thr Ile Ser Ala Gly Gln Glu
195      200
Asp Phe Pro Ser Val Leu Leu Glu Thr Ala Ala Ser Xaa Pro Ser Leu
210      215      220
Ser Pro Leu Ser Ala Ala Ser Phe Lys Glu His Glu Tyr Leu Gly Asn
225      230      235      240
Leu Ser Thr Val Leu Pro Thr Glu Gly Thr Leu Gln Glu Asn Val Ser
      245      250      255
Glu Ala Ser Lys Glu Val Ser Glu Lys Ala Lys Thr Leu Leu Ile Asp
      260      265      270
Arg Asp Leu Thr Glu Phe Ser Glu Leu Glu Tyr Ser Glu Met Gly Ser
275      280      285
Ser Phe Ser Val Ser Pro Lys Ala Glu Ser Ala Val Ile Val Ala Asn
290      295      300
Pro Arg Glu Glu Ile Ile Val Lys Asn Lys Asp Glu Glu Glu Lys Leu
305      310      315      320
Val Ser Asn Asn Ile Leu His xaa Gln Gln Glu Leu Pro Thr Ala Leu
      325      330      335
Thr Lys Leu Val Lys Glu Asp Glu Val Val Ser Ser Glu Lys Ala Lys
      340      345      350
Asp Ser Phe Asn Glu Lys Arg Val Ala Val Glu Ala Pro Met Arg Glu
355      360      365
Glu Tyr Ala Asp Phe Lys Pro Phe Glu Arg Val Trp Glu Val Lys Asp
370      375      380
Ser Lys Glu Asp Ser Asp Met Leu Ala Ala Gly Gly Lys Ile Glu Ser
385      390      395      400
Asn Leu Glu Ser Lys Val Asp Lys Lys Cys Phe Ala Asp Ser Leu Glu
      405      410      415
Gln Thr Asn His Glu Lys Asp Ser Glu Ser Ser Asn Asp Asp Thr Ser
420      425
Phe Pro Ser Thr Pro Glu Gly Ile Lys Asp Arg Ser Gly Ala Tyr Ile
435      440      445
Thr Cys Ala Pro Phe Asn Pro Ala Ala Thr Glu Ser Ile Ala Thr Asn
450      455      460
Ile Phe Pro Leu Leu Glu Asp Pro Thr Ser Glu Asn xaa Thr Asp Glu
465      470      475      480
Lys Lys Ile Glu Glu Lys Lys Ala Gln Ile Val Thr Glu Lys Asn Thr
      485      490      495
Ser Thr Lys Thr Ser Asn Pro Phe Phe Val Ala Ala Gln Asp Ser Glu
500      505
Thr Asp Tyr Val Thr Thr Asp Asn Leu Thr Lys Val Thr Glu Glu Val
515      520      525
Val Ala Asn Met Pro Glu Gly Leu Thr Pro Asp Leu Val Gln Glu Ala
530      535      540

```

Cys Glu Ser Glu Leu Asn Glu Val Thr Gly Thr Lys Ile Ala Tyr Glu
 545 550 560
 Thr Lys Met Asp Leu Val Gln Thr Ser Glu Val Met Gln Glu Ser Leu
 565 570 575
 Tyr Pro Ala Ala Gln Leu Cys Pro Ser Phe Glu Glu Ser Glu Ala Thr
 580 585 590
 Pro Ser Pro Val Leu Pro Asp Ile Val Met Glu Ala Pro Leu Asn Ser
 595 600 605
 Ala Val Pro Ser Ala Gly Ala Ser Val Ile Gln Pro Ser Ser Ser Pro
 610 615 620
 Leu Glu Ala Ser Ser Val Asn Tyr Glu Ser Ile Lys His Glu Pro Glu
 625 630 635 640
 Asn Pro Pro Pro Tyr Glu Glu Ala Met Ser Val Ser Leu Lys Val Ser
 645 650 655
 Gly Ile Lys Glu Glu Ile Lys Glu Pro Glu Asn Ile Asn Ala Ala Leu
 660 665 670
 Gln Glu Thr Glu Ala Pro Tyr Ile Ser Ile Ala Cys Asp Leu Ile Lys
 675 680 685
 Glu Thr Lys Leu Ser Ala Glu Pro Ala Pro Asp Phe Ser Asp Tyr Ser
 690 695 700
 Glu Met Ala Lys Val Glu Gln Pro Val Pro Asp His Ser Glu Leu Val
 705 710 715 720
 Glu Asp Ser Ser Pro Asp Ser Glu Pro Val Asp Leu Phe Ser Asp Asp
 725 730 735
 Ser Ile Pro Asp Val Pro Gln Lys Gln Asp Glu Thr Val Met Leu Val
 740 745 750
 Lys Glu Ser Leu Thr Glu Thr Ser Phe Glu Ser Met Ile Glu Tyr Glu
 755 760 765
 Asn Lys Glu Lys Leu Ser Ala Leu Pro Pro Glu Gly Gly Lys Pro Tyr
 770 775 780
 Leu Glu Ser Phe Lys Leu Ser Leu Asp Asn Thr Lys Asp Thr Leu Leu
 785 790 795 800
 Pro Asp Glu Val Ser Thr Leu Ser Lys Lys Glu Lys Ile Pro Leu Gln
 805 810 815
 Met Glu Glu Leu Ser Thr Ala Val Tyr Ser Asn Asp Asp Leu Phe Ile
 820 825 830
 Ser Lys Glu Ala Gln Ile Arg Glu Thr Glu Thr Phe Ser Asp Ser Ser
 835 840 845
 Pro Ile Glu Ile Ile Asp Glu Phe Pro Thr Leu Ile Ser Ser Lys Thr
 850 855 860
 Asp Ser Phe Ser Lys Leu Ala Arg Glu Tyr Thr Asp Leu Glu Val Ser
 865 870 875 880
 His Lys Ser Glu Ile Ala Asn Ala Pro Asp Gly Ala Gly Ser Leu Pro
 885 890 895
 Cys Thr Glu Leu Pro His Asp Leu Ser Leu Lys Asn Ile Gln Pro Lys
 900 905 910
 Val Glu Glu Lys Ile Ser Phe Ser Asp Asp Phe Ser Lys Asn Gly Ser
 915 920 925
 Ala Thr Ser Lys Val Leu Leu Leu Pro Pro Asp Val Ser Ala Leu Gly
 930 935 940
 His Thr Gln Ala Glu Ile Glu Ser Ile Val Lys Pro Lys Val Leu Glu
 945 950 955 960
 Lys Glu Ala Glu Lys Lys Leu Pro Ser Asp Thr Glu Lys Glu Asp Arg
 965 970 975
 Ser Pro Ser Ala Ile Phe Ser Ala Asp Leu Gly Lys Thr Ser Val Val
 980 985 990
 Asp Leu Leu Tyr Trp Arg Asp Ile Lys Lys Thr Gly Val Val Phe Gly
 995 1000 1005
 Ala Ser Leu Phe Leu Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe Ser Ile Val Ser
 1010 1015 1020
 Val Thr Ala Tyr Ile Ala Leu Ala Leu Ser Val Thr Ile Ser Phe
 1025 1030 1035 1040
 Arg Ile Tyr Lys Gly Val Ile Gln Ala Ile Gln Lys Ser Asp Glu Gly
 1045 1050 1055
 His Pro Phe Arg Ala Tyr Leu Glu Ser Glu Val Ala Ile Ser Glu Glu
 1060 1065 1070
 Leu Val Gln Lys Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Gly His Val Asn Cys Thr
 1075 1080 1085

Ile Lys Glu Leu Arg Arg Leu Phe Leu Val Asp Asp Leu Val Asp Ser
 1090 1095 1100
 Leu Lys Phe Ala Val Leu Met Trp Val Phe Thr Tyr Val Gly Ala Leu
 1105 1110 1115 1120
 Phe Asn Gly Leu Thr Leu Leu Ile Leu Ala Leu Ile Ser Leu Phe Ser
 1125 1130 1135
 Val Pro Val Ile Tyr Glu Arg His Gln Ala Gln Ile Asp His Tyr Leu
 1140 1145 1150
 Gly Leu Ala Asn Lys Asn Val Lys Asp Ala Met Ala Lys Ile Gln Ala
 1155 1160 1165
 Lys Ile Pro Gly Leu Lys Arg Lys Ala Glu
 1170 1175

- <210> 30
- <211> 1163
- 5 <212> PRT
- <213> Rattus sp.

- <220>
- <221> VARIANT
- 10 <222> 469
- <223> Xaa = any amino acid

- <400> 30

Met Glu Asp Ile Asp Gln Ser Ser Leu Val Ser Ser Ser Thr Asp Ser
 1 5 10 15
 Pro Pro Arg Pro Pro Pro Ala Phe Lys Tyr Gln Phe Val Thr Glu Pro
 20 25 30
 Glu Asp Glu Glu Asp Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Asp
 35 40 45
 Glu Asp Leu Glu Glu Leu Glu Val Leu Glu Arg Lys Pro Ala Ala Gly
 50 55 60
 Leu Ser Ala Ala Ala Val Pro Pro Ala Ala Ala Pro Leu Leu Asp
 65 70 75 80
 Phe Ser Ser Asp Ser Val Pro Pro Ala Pro Arg Gly Pro Leu Pro Ala
 85 90 95
 Ala Pro Pro Ala Ala Pro Glu Arg Gln Pro Ser Trp Glu Arg Ser Pro
 100 105 110
 Ala Ala Pro Ala Pro Ser Leu Pro Pro Ala Ala Ala Val Leu Pro Ser
 115 120 125
 Lys Leu Pro Glu Asp Asp Glu Pro Pro Ala Arg Pro Pro Pro Pro
 130 135 140
 Pro Ala Gly Ala Ser Pro Leu Ala Glu Pro Ala Pro Pro Ser Thr
 145 150 155 160
 Pro Ala Ala Pro Lys Arg Arg Gly Ser Gly Ser Val Asp Glu Thr Leu
 165 170 175
 Phe Ala Leu Pro Ala Ala Ser Glu Pro Val Ile Pro Ser Ser Ala Glu
 180 185 190
 Lys Ile Met Asp Leu Met Glu Gln Pro Gly Asn Thr Val Ser Ser Gly
 195 200 205
 Gln Glu Asp Phe Pro Ser Val Leu Leu Glu Thr Ala Ala Ser Leu Pro
 210 215 220
 Ser Leu Ser Pro Leu Ser Thr Val Ser Phe Lys Glu His Gly Tyr Leu
 225 230 235 240
 Gly Asn Leu Ser Ala Val Ser Ser Ser Glu Gly Thr Ile Glu Glu Thr
 245 250 255
 Leu Asn Glu Ala Ser Lys Glu Leu Pro Glu Arg Ala Thr Asn Pro Phe
 260 265 270
 Val Asn Arg Asp Leu Ala Glu Phe Ser Glu Leu Glu Tyr Ser Glu Met
 275 280 285
 Gly Ser Ser Phe Lys Gly Ser Pro Lys Gly Glu Ser Ala Ile Leu Val
 290 295 300
 Glu Asn Thr Lys Glu Glu Val Ile Val Arg Ser Lys Asp Lys Glu Asp
 305 310 315 320
 Leu Val Cys Ser Ala Ala Leu His Ser Pro Gln Glu Ser Pro Val Gly
 325 330 335
 Lys Glu Asp Arg Val Val Ser Pro Glu Lys Thr Met Asp Ile Phe Asn
 340 345 350

Glu Met Gln Met Ser Val Val Ala Pro Val Arg Glu Glu Tyr Ala Asp
 355 360 365
 Phe Lys Pro Phe Glu Gln Ala Trp Glu Val Lys Asp Thr Tyr Glu Gly
 370 375 380
 Ser Arg Asp Val Leu Ala Ala Arg Ala Asn Val Glu Ser Lys Val Asp
 385 390 395 400
 Arg Lys Cys Leu Glu Asp Ser Leu Glu Gln Lys Ser Leu Gly Lys Asp
 405 410 415
 Ser Glu Gly Arg Asn Glu Asp Ala Ser Phe Pro Ser Thr Pro Glu Pro
 420 425 430
 Val Lys Asp Ser Ser Arg Ala Tyr Ile Thr Cys Ala Ser Phe Thr Ser
 435 440 445
 Ala Thr Glu Ser Thr Thr Ala Asn Thr Phe Pro Leu Leu Glu Asp His
 450 455 460
 Thr Ser Glu Asn Xaa Thr Asp Glu Lys Lys Ile Glu Glu Arg Lys Ala
 465 470 475 480
 Gln Ile Ile Thr Glu Lys Thr Ser Pro Lys Thr Ser Asn Pro Phe Leu
 485 490 495
 Val Ala Val Gln Asp Ser Glu Ala Asp Tyr Val Thr Thr Asp Thr Leu
 500 505 510
 Ser Lys Val Thr Glu Ala Ala Val Ser Asn Met Pro Glu Gly Leu Thr
 515 520 525
 Pro Asp Leu Val Gln Glu Ala Cys Glu Ser Glu Leu Asn Glu Ala Thr
 530 535 540
 Gly Thr Lys Ile Ala Tyr Glu Thr Lys Val Asp Leu Val Gln Thr Ser
 545 550 555 560
 Glu Ala Ile Gln Glu Ser Leu Tyr Pro Thr Ala Gln Leu Cys Pro Ser
 565 570 575
 Phe Glu Glu Ala Glu Ala Thr Pro Ser Pro Val Leu Pro Asp Ile Val
 580 585 590
 Met Glu Ala Pro Leu Asn Ser Leu Leu Pro Ser Ala Gly Ala Ser Val
 595 600 605
 Val Gln Pro Ser Val Ser Pro Leu Glu Ala Pro Pro Pro Val Ser Tyr
 610 615 620
 Asp Ser Ile Lys Leu Glu Pro Glu Asn Pro Pro Tyr Glu Glu Ala
 625 630 635 640
 Met Asn Val Ala Leu Lys Ala Leu Gly Thr Lys Glu Gly Ile Lys Glu
 645 650 655
 Pro Glu Ser Phe Asn Ala Ala Val Gln Glu Thr Glu Ala Pro Tyr Ile
 660 665 670
 Ser Ile Ala Cys Asp Leu Ile Lys Glu Thr Lys Leu Ser Thr Glu Pro
 675 680 685
 Ser Pro Asp Phe Ser Asn Tyr Ser Glu Ile Ala Lys Phe Glu Lys Ser
 690 695 700
 Val Pro Glu His Ala Glu Leu Val Glu Asp Ser Pro Glu Ser Glu
 705 710 715 720
 Pro Val Asp Leu Phe Ser Asp Asp Ser Ile Pro Glu Val Pro Gln Thr
 725 730 735
 Gln Glu Glu Ala Val Met Leu Met Lys Glu Ser Leu Thr Glu Val Ser
 740 745 750
 Glu Thr Val Ala Gln His Lys Glu Glu Arg Leu Ser Ala Ser Pro Gln
 755 760 765
 Glu Leu Gly Lys Pro Tyr Leu Glu Ser Phe Gln Pro Asn Leu His Ser
 770 775 780
 Thr Lys Asp Ala Ala Ser Asn Asp Ile Pro Thr Leu Thr Lys Lys Glu
 785 790 795 800
 Lys Ile Ser Leu Gln Met Glu Glu Phe Asn Thr Ala Ile Tyr Ser Asn
 805 810 815
 Asp Asp Leu Leu Ser Ser Lys Glu Asp Lys Ile Lys Glu Ser Glu Thr
 820 825 830
 Phe Ser Asp Ser Ser Pro Ile Glu Ile Ile Asp Glu Phe Pro Thr Phe
 835 840 845
 Val Ser Ala Lys Asp Asp Ser Pro Lys Leu Ala Lys Glu Tyr Thr Asp
 850 855 860
 Leu Glu Val Ser Asp Lys Ser Glu Ile Ala Asn Ile Gln Ser Gly Ala
 865 870 875 880
 Asp Ser Leu Pro Cys Leu Glu Leu Pro Cys Asp Leu Ser Phe Lys Asn
 885 890 895

Ile Tyr Pro Lys Asp Glu Val His Val Ser Asp Glu Phe Ser Glu Asn
 900 905 910
 Arg Ser Ser Val Ser Lys Ala Ser Ile Ser Pro Ser Asn Val Ser Ala
 915 920 925
 Leu Glu Pro Gln Thr Glu Met Gly Ser Ile Val Lys Ser Lys Ser Leu
 930 935 940
 Thr Lys Glu Ala Glu Lys Lys Leu Pro Ser Asp Thr Glu Lys Glu Asp
 945 950 955 960
 Arg Ser Leu Ser Ala Val Leu Ser Ala Glu Leu Ser Lys Thr Ser Val
 965 970 975
 Val Asp Leu Leu Tyr Trp Arg Asp Ile Lys Lys Thr Gly Val Phe
 980 985 990
 Gly Ala Ser Leu Phe Leu Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe Ser Ile Val
 995 1000 1005
 Ser Val Thr Ala Tyr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Ser Val Thr Ile Ser
 1010 1015 1020
 Phe Arg Ile Tyr Lys Gly Val Ile Gln Ala Ile Gln Lys Ser Asp Glu
 1025 1030 1035 1040
 Gly His Pro Phe Arg Ala Tyr Leu Glu Ser Glu Val Ala Ile Ser Glu
 1045 1050 1055
 Glu Leu Val Gln Lys Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Gly His Val Asn Ser
 1060 1065 1070
 Thr Ile Lys Glu Leu Arg Arg Leu Phe Leu Val Asp Asp Leu Val Asp
 1075 1080 1085
 Ser Leu Lys Phe Ala Val Leu Met Trp Val Phe Thr Tyr Val Gly Ala
 1090 1095 1100
 Leu Phe Asn Gly Leu Thr Leu Leu Ile Leu Ala Leu Ile Ser Leu Phe
 1105 1110 1115 1120
 Ser Ile Pro Val Ile Tyr Glu Arg His Gln Val Gln Ile Asp His Tyr
 1125 1130 1135
 Leu Gly Leu Ala Asn Lys Ser Val Lys Asp Ala Met Ala Lys Ile Gln
 1140 1145 1150
 Ala Lys Ile Pro Gly Leu Lys Arg Lys Ala Asp
 1155 1160

- <210> 31
- <211> 1568
- <212> DNA
- <213> Rattus sp.

<400> 31

caggccttagt	ctggggaagc	gggtgtttca	tgtctcaggg	agaatthtgc	agtttacagc	60
gtttctgttg	gtatgcataa	tttgtaattg	ctgctggagg	gcagatcgtg	gcaagaaatg	120
gacggacaga	agaaacattg	gaaggacaag	gttgttgacc	tcctctactg	gagagaeatt	180
aagaagactg	gagtggtggt	tgttgccagc	ttattcctgc	tgctgtctct	gacagtgttc	240
agcattgtca	gtgtaacggc	ctacattgcc	ttggccctgc	tctcggtgac	tatcagcttt	300
aggatatata	agggcgtgat	ccaggctatc	cagaaatcag	atgaaggcca	cccattcagg	360
gcataattag	aatctgaagt	tgctatatca	gaggaattgg	ttcagaaata	cagtaattct	420
gctcttggtc	atgtgaacag	cacaataaaa	gaactgaggc	ggcttttctt	agttgatgat	480
ttagttgatt	ccctgaagtt	tgcagtggtg	atgtgggtgt	ttacttatgt	tgggtccctg	540
ttcaatggtc	tgacactact	gattttagct	ctgatctcac	tcttcagtat	tcctgtttatt	600
tatgaacggc	atcagggtgca	gatagatcat	tatctaggac	ttgcaaacia	gagtgtttag	660
gatgccatgg	ccaaaatcca	agcaaaaatc	cctggattga	agcgcgaaagc	agattgaaaa	720
agccccaaac	agaagttcat	ctttaaaggg	gacactcact	tgattacggg	ggtgggaggt	780
caggggtgag	cccttgggtg	ccgtgcgggt	tcagctcttt	atthtttagca	gtgcactggt	840
tgaggaaaaa	ttacctgtct	tgacttcctg	tgtttatcat	cttaagtatt	gtaagctgct	900
gtgtatggat	ctcattgtag	tcacacttgt	cttccccaat	gaggcgcctg	gtgaataaag	960
gactcgggga	aagctgtgca	ttgtatctgc	tgcagggtag	tctagctgta	tgcagagagt	1020
tgtaaaagaag	gcaaatctgg	gggcagggaa	aaccttttc	acagtgtact	gtgtttggtc	1080
agtgataaac	tgatgcagat	ttttctgaaa	tgaaatgttt	agatgagagc	atactactaa	1140
agcagagtgg	aaaactctgt	ctttatgggt	tgttctaggt	gtattgtgaa	tttactgtta	1200
tattgccaat	ataagtaaat	atagacctaa	tctatatata	gtgtttcaca	aagcttagat	1260
ctttaacctt	gcagctgccc	cacagtgcct	gacctctgag	tcattgggta	tgcagtgtag	1320
tcccaagcac	ataaactagg	aagagaaatg	tatttgtagg	agtgtacct	accacctggt	1380
ttcaagaaaa	tatagaactc	taacaaaaat	atagaatgtc	atthcaaaga	cttactgtat	1440
gtatagttaa	ttttgtcaca	gactctgaaa	ttctatggac	tgaatthcat	gcttccaaat	1500
gtttgcagtt	atcaaacatt	gtrattgcaag	aatcataaa	atgaagactt	ataccattgt	1560
ggttttag						1568

<210> 32
 <211> 199
 <212> PRT
 5 <213> Rattus sp.

<400> 32

```

Met Asp Gly Gln Lys Lys His Trp Lys Asp Lys Val Val Asp Leu Leu
 1      5      10      15
Tyr Trp Arg Asp Ile Lys Lys Thr Gly Val Val Phe Gly Ala Ser Leu
 20      25      30
Phe Leu Leu Leu Ser Leu Thr Val Phe Ser Ile Val Ser Val Thr Ala
 35      40      45
Tyr Ile Ala Leu Ala Leu Leu Ser Val Thr Ile Ser Phe Arg Ile Tyr
 50      55      60
Lys Gly Val Ile Gln Ala Ile Gln Lys Ser Asp Glu Gly His Pro Phe
 65      70      75      80
Arg Ala Tyr Leu Glu Ser Glu Val Ala Ile Ser Glu Glu Leu Val Gln
 85      90      95
Lys Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Gly His Val Asn Ser Thr Ile Lys Glu
 100      105      110
Leu Arg Arg Leu Phe Leu Val Asp Asp Leu Val Asp Ser Leu Lys Phe
 115      120      125
Ala Val Leu Met Trp Val Phe Thr Tyr Val Gly Ala Leu Phe Asn Gly
 130      135      140
Leu Thr Leu Leu Ile Leu Ala Leu Ile Ser Leu Phe Ser Ile Pro Val
 145      150      155      160
Ile Tyr Glu Arg His Gln Val Gln Ile Asp His Tyr Leu Gly Leu Ala
 165      170      175
Asn Lys Ser Val Lys Asp Ala Met Ala Lys Ile Gln Ala Lys Ile Pro
 180      185      190
Gly Leu Lys Arg Lys Ala Asp
 195
    
```

10 <210> 33
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Bos sp.

15 <400> 33

```

Ser Tyr Asp Ser Ile Lys Leu Glu Pro Glu Asn Pro Pro Pro Tyr Glu
 1      5      10      15
Glu Ala
    
```

20 <210> 34
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

25 <400> 34

gccgcccrcca tgg

13

30 <210> 35
 <211> 248
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature
 <222> 110
 <223> n=a, c, g, or t

5 <400> 35

```

gagccgtcac cacagtaggt cctcggctc agtcggccca gcccctctca gtcctcccca 60
acccccacaa ccgcccgcgc tcctgagacg cgccccggcg gcggcggcan agctgcagca 120
tcattctccac cctccagcca tggaaacct ggaccagtct cctctgggtct cgtcctcgga 180
cagcccacc cggccgcagc ccgcttcaa gtaccagttc gtgagggagc ccgaggacga 240
ggaggaag 248
  
```

10 <210> 36
 <211> 379
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 91
 <223> n=a, c, g, or t

20 <400> 36

```

gaaaatatgg acttgaagga gcagccaggt aacactattt cggctggtca agaggatttc 60
ccatctgtcc tgcttgaaac tgctgcttct nttccttctc tgtctcctct ctcagccgct 120
tctttcaaa aacatgaata ccttggtaat ttgtcaacag tattaccac tgaaggaaca 180
cttcaagaaa atgtcagtga agcttctaaa gaggtctcag agaaggcaaa aactctactc 240
atagatagag atttaacaga gttttcagaa ttaggaatac tcagaaatgg gatcatcgtt 300
cagtgtctct ccaaaagcag aatctgccgt aaatagtagg caaatcctag gggagaagaat 360
aattcgtgga aaaataaag 379
  
```

25 <210> 37
 <211> 281
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 170, 275
 <223> n=a, c, g, or t

35 <400> 37

```

gatagagatt taacagagtt ttcagaatta gaatactcag aaatgggac atcgttcagt 60
gtctctccaa aagcagaatc tgccgtaata gtagcaaatc ctagggaaga aataatcgtg 120
aaaaataaag atgaagaaga gaagttagtt agtaataaca tccttcatan tcaacaagag 180
ttacctacag ctcttactaa attggttaaa gaggatgaag ttgtgtcttc agaaaaagca 240
aaagacagtt ttatgaaaga gagttgcagt ggaantcctt g 281
  
```

40 <210> 38
 <211> 640
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature

<222> 371, 444, 474, 501, 506, 524, 544, 561, 580, 614, 620

<223> n=a, c, g, or t

<400> 38

5

ttaaagagga	tgaagttgtg	tcttcagaaa	aagcaaaaaga	cagttttaat	gaaaagagag	60
ttgcagtgga	agctcctatg	agggaggaat	atgcagactt	caaaccattt	gagcgagtat	120
gggaagtgaa	agatagtaag	gaagatagtg	atatgttggc	tgctggaggt	aaaatcgaga	180
gcaacttgga	aagtaaagtg	gataaaaaat	gttttgcaga	tagccttgag	caactaatc	240
acgaaaaaga	tagtgagagt	agtaatgatg	atacttcttt	ccccagtagc	ccagaaggta	300
taaaggatcg	ttcaggagca	tatatcacat	gtgctccctt	taaccagca	gcaactgaga	360
gcattgcaac	naacatTTTT	cctttgttgg	agatcctact	tcagaaaatt	agaccgtgaa	420
aaaaaataga	agaaaagaag	gccnaatggt	accgagaaga	atactagcac	aaanctcaac	480
cccttcttgt	gcagcacagg	ntctgngaca	gatatgtccc	acgnntatta	ccaagtgtg	540
agantcttgc	aacatcctga	ngctgactcc	gattgttccn	gagctttgaa	tggattgtgg	600
ttctggtcaa	gttntttgan	caaatggctt	gtcactcgat			640

<210> 39

<211> 346

10

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

15

<222> 149, 198, 207, 246, 312, 317

<223> n=a, c, g, or t

<400> 39

20

ctgtgcccgg	ccccaccccc	tgggcagatg	tccccactg	ctaaggctgc	tggcttcagg	60
gaggggttagc	ctgcaccgcc	gccacccctgc	ccctaagtta	ttacctctcc	agttcctacc	120
gtactccctg	caccgtctca	ctgtgtgnt	cgtgtcagta	atztatatgg	tgttaaaatg	180
tgtatatttt	tgtatgtnac	tattttnact	agggctgagg	ggcctgcgcc	cagagctggc	240
ctcccncaac	acctgctgcg	cttggtaggt	gtgggtggcg	tatggcagcc	cggctgctgc	300
ttggatgcga	gnttggncct	gggcccgtgc	tggggggcac	agttgt		346

<210> 40

<211> 325

25

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 40

30

gtggcaaaca	tgctgaagg	cctgactcca	gatttagtac	aggaagcatg	tgaaagtgaa	60
ttgaatgaag	ttactggtac	aaagattgct	tatgaacaa	aatggacttg	gttcaaacat	120
cagaagttat	gcaagagtca	ctctatcctg	cagcaecagc	ttgcccatca	tttgaagagt	180
cagaagctac	tccttcacca	gttttgcctg	acattgttat	ggaagcacca	ttgaattctg	240
cagttcctag	tgctggtgct	tccgtgatac	agcccagctc	atcaccatta	gaggttcttt	300
cagttaatta	tgaagcataa	acatg				325

<210> 41

<211> 338

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 41

```

gcattgtgaaa gtgaattgaa tgaagttact ggtacaaaga ttgcttatga aacaaaaatg      60
gacttgggttc aaacatcaga agttatgcaa gagtcaactct atcctgcagc acagctttgc      120
ccatcatttg  aagagtcaga agctactcct tcaccagttt  tgcttgacat  tgttatggaa      180
gcaccattga  attctgcagt tcctagtgc  ggtgcttccg  tgatacagcc  cagctcatca      240
ccattagaag  cttcttcagt taattatgaa agcataaaac  atgagcctga  aaacecccca      300
ccatatgaag  aggccatgag  tgtatcacta  aaaaaagt

```

5 <210> 42
 <211> 480
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> 383, 402, 421, 433, 441
 <223> n=a, c, g, or t

15 <400> 42

```

aagactggag  tgggttttgg  tgccagccta  ttctgctgc  tttcattgac  agtattcagc      60
attgtgagcg  taacagccta  cattgccttg  gccctgctct  ctgtgaccat  cagctttagg      120
atatacaagg  gtgtgatcca  agctatccag  aaatcagatg  aaggccaccc  attcagggca      180
tatctggaat  ctgaagttgc  tatactgag  gagttggttc  agaagtacag  taattctgct      240
cttggctatg  tgaactgcac  gataaaggaa  ctcaggcgcc  tcttcttagt  tgatgattta      300
gttgattctc  tgaagtttgc  agtgttgatg  tgggtattta  cctatgttgg  tgccttgttt      360
aatgggtctg  cactactgat  ttnggctctc  attccactcc  tncaagtgtt  cctggtatTT      420
ntgaacggca  tcnggcacag  ntagatcatt  atccaggact  tgcaaatagg  aatgtaaaga      480

```

20 <210> 43
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 43

```

Met Glu Asp Leu Asp Gln Ser Pro Leu Val Ser Ser Ser
 1           5           10

```

30 <210> 44
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <400> 44

```

Lys Ile Met Asp Leu Lys Glu Gln Pro Gly Asn Thr Ile Ser Ala Gly
 1           5           10           15

```

40 <210> 45
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 45

Lys Glu Asp Glu Val Val Ser Ser Glu Lys Ala Lys Asp Ser Phe Asn
 1 5 10 15
 Glu Lys Arg

5 <210> 46
 <211> 50
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 46

Gln Glu Ser Leu Tyr Pro Ala Ala Gln Leu Cys Pro Ser Phe Glu Glu
 1 5 10 15
 Ser Glu Ala Thr Pro Ser Pro Val Leu Pro Asp Ile Val Met Glu Ala
 20 25 30
 Pro Leu Asn Ser Ala Val Pro Ser Ala Gly Ala Ser Val Ile Gln Pro
 35 40 45
 Ser Ser
 50

15 <210> 47
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

20 <220>
 <223> degenerate oligonucleotides designed from the bovine NI220 peptide 1 sequence

<220>
 <221> modified_base
 <222> 3, 6, 12, 15, 18
 25 <223> n=inosine

<400> 47

30 tcngtnggga anacngcngg yaartc 26

<210> 48
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

35 <220>
 <223> degenerate oligonucleotides designed from the bovine NI220 peptide 1 sequence

<220>
 <221> modified_base
 <222> 3, 6, 9, 12, 15
 <223> n=inosine

40 <400> 48

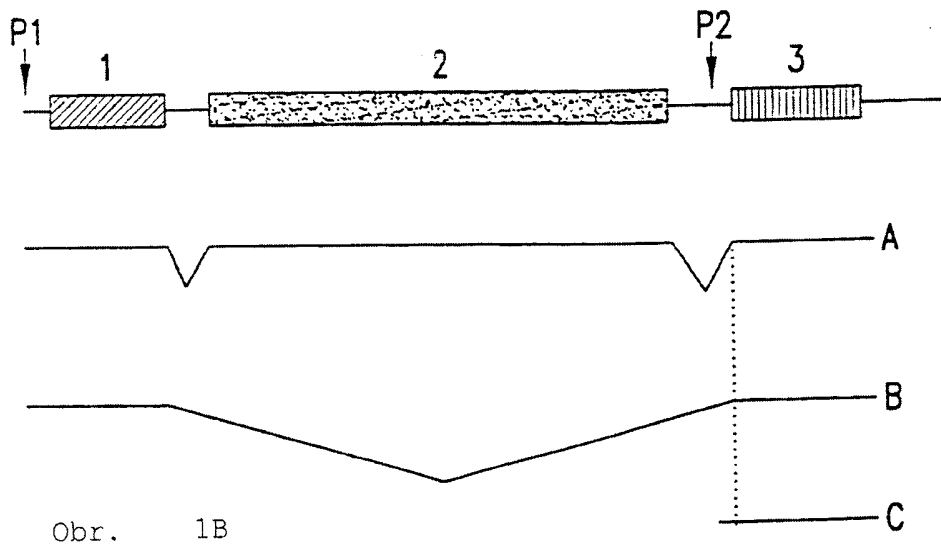
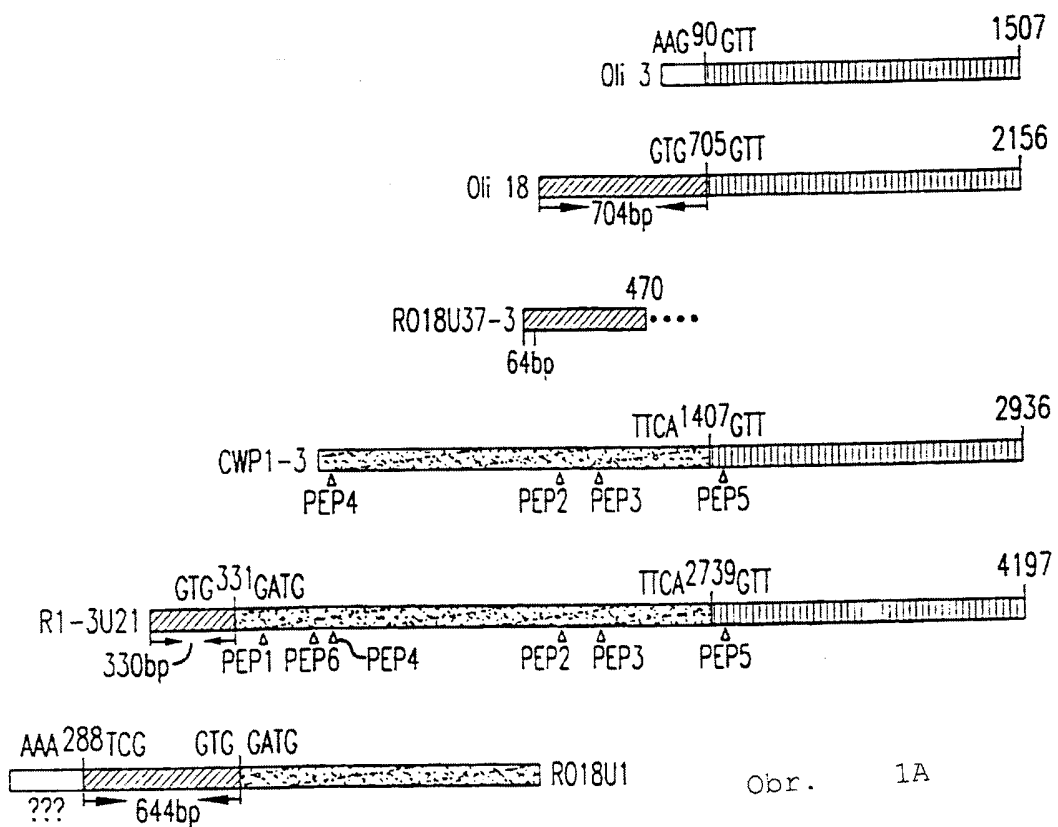
45 tcngtnggna gnacnggyaa ytc 23

PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 **1.** Monoklonální protilátka, kde tato monoklonální protilátka se imunspecificky váže na čištěný protein, který je tvořený sekvencí aminokyselin s více než 90% identitou po celé délce se SEQ ID NO: 29 a je prostý jakéhokoliv myelinového materiálu centrálního nervového systému, s nímž je přirozeně spojen, pro použití jako léčivo.

10

41 výkresů



ATTG CTCGCTGGG CGGGGGGGG GGGTGCAGCC TGGACAGGG GGGTGGCAC ATCTGGATCG
 CGAAGCAGG AGAAGCAGTC TCATTGTTCC GGGAGCCGTC GCCCTGCGC GTTCTTCGGC TGGCTGGCC AGACTCGCC CTGCTGGCC CTGCCCAGTC
 TTGCCAACC CCCACAACG CCCCGACTC IGAGGAGAG CGGCCCTGG GCGGCTGTAG CTGCAGCATC GTCCGGGACC CGCCAGCC (ATG)GAAGACATA
 M E D I 4
 GACGAGTGT CGCTGGTCTC CTCGTCCAGG GACAGCCCGC CCCGGCCCTCC GCCCGCCCTC AAGTACCAGT TCGTGACGGA GCCCGAGGAC GAGGAGGAGC
 D Q S S L V S S S T D S P P R P P A F K Y Q F V T E P E D E E D 37
 AGGAGGAGGA GGAGGACGAG GAGGAGGACT AGAGGAACCT AGAGTGTGG GAGTGTGG AGAGGAAGCC CGCAGCCCGG CTGTCCGCGC CTGCGGTGCC
 E E E E D E E D E D L E E L E V L E R K P A A G L S A A A V 70
 GCGCGCGCC GCGCGCGCC TCGTGGACTT CAGCAGGAC TCGTGGCCCC CCGCGCCCGC CGGGCGCTG CCGCGCCCGC CCGCTGGCCG TCCTGAGAGG
 P P A A A P L L D F S S D S V P P A P R G P L P A A P P A A P E R 104
 CAGCATCCT GGAAGCAG CCGCGCGG CCGCGGCT CCCTGCGCC GCTGGCGCA GTCCTGCCCC CCAAGCTCC AGAGGAGGAC GAGCCTCCGG
 Q P S W E R S P A A P A P S L P P A A A V L P S K L P E D D E P P 137
 CGAGCCCGC GCTCCGCG CGAGCCCGG CGAGCCCGT GCGGAGGCC GCGGGGCC CTTCCAGCC GCGCGCGCC AAGGCGAGG GCTCCGCGTC
 A R P P P P A G A S P L A E P A A P P S T P A A P K R R G S G 170
 AGTGAIGAG ACCCTTTTG CTCCTCCGCTG TGAICTGAG CCTGCTGATC CTTCCCTGCG AGAAAAAT ATGGATTGA TGGAGCAGCC AGGTAACACT
 S V D E T L F A L P A A S E P V I P S S A E K I M D L M E Q P G N T 204
 GTTGGCTG GTCAGAGCA TTCCCAICI GTCCGCTG AAAGTCTGCT CTCCTCTCTT ICICIAIC ICICICIAAC TGTTCTTTT AAAGAACATG
 V S S G Q E D F P S V L L E T A A S L P S L S P L S T V [S] F K E H 237
 GATACCTGG TAACCTATCA GCAGTGTCAI CCTCAGAGG AACAAATGAA GAACTHTAA ATGAGCTTC TAAAGCTG CCAGAGAGG CAACAAATCC
 G Y L G N L S A V S S S E G T I E E T L N E A S K E L P E R A T N 270

Obr. 2A1

ATTTGTAAT AGAGATTTAG CAGAATTTTC AGAATTAGAA TATTACAAA TGGATCATC TTTTAAAGCC TCCCAAAAG GAGATCAGC CATATTAGTA
 P F V N R D L A E F S E L E Y S E M G S S F K G S P K G E S A I L V 304

GAAACACTA AGGAAGAAT AATTIGAGG AGTAAAGACA AAGAGGATTT AGTTGTAGT GCAGCCCTC ACAGTCCACA AGAATCACCT GTGGTAAAG
 E N T K E E V I V R S K D K E D L V C S A A L H S P Q E S P V G K 337

AAGACAGACT TGTGTCTCCA GAAAGACAA TGGACATTTT IAATCAAATG CAGATGTCAG TAGTACACC TGTAGGGAA GAGTATCCAG ACTTTAAGCC
 E D R V V S P E K T M D I F N E M Q M S V V A P V R E E Y A D F K 370

ATTTCAACAA GCATGGGAG TGAAGATAC TTAAGAGGA AGTAGGATG TCTGGCTGC TAGAGTAAI GTGGAANGTA AAGTGGACAG AAAATGCTTG
 P F E Q A W E V K D T Y E G S R D V L A A R A N V E S K V D R K C I 404

GAGATAGCC TGGAGCAAAA AAGTCTTGGG AAGGATAGT AAGCCAGAAA IGAGGATGCT TCTTTCCCA GTACCCAGA ACCTGTGAG GACAGCTCCA
 E D S L E Q K S L G K D S E G R N E D A S F P S T P E P V K D S S 437

GACATATAT TACCTGTGCT TCCTTTACT CAGCAACCCA AAGCACCACA GCAACACTT TCCCTTGTI AGAAGATCAT ACTICAGAAA ATAAACAGA
 R A Y I T C A S F T S A T E S T T A N T F P L L E D H T S E N K T 470

TCAAAAAAA ATAGAAGAAA GGAAGGCCA AATTATAACA GAGAAGACTA GCCCAAAAC GTCAAAATCTT TCCCTGTAG CAGTACAGGA TCTCAGGCA
 D E K K I E E R K A Q I I I E K T S P K T S N P F L V A V Q D S E A 504

GATTAIGTTA CAACAGATAC CTTATCAAG GIGACTGAGG CAGCAGTGC AAACATGCC TGAAGTCTG CAGGATTTI AGTICAGGAA GCAIGTGA
 D Y V T T D T L S K V T E A A V S N M P E G L T P D L V Q E A C E 537

GTCAACTGAA TGAAGCCACA GTTACAAAGA TTGCTTATGA AACAAAAGTG GACTTGGTCC AAACATCAGA AGCTATACAA GAATCACTTT ACCCCACAGC
 S E L N E A T G T K I A Y E T K V D L V Q T S E A I Q E S L Y P T 570

ACAGCTTGG CCAATCATTTG AGGAAGCIGA AGCAACTCCG TCACCAGTTT TCCCTGATAT TGTATGGAA GCACCATTA AATTCTCTCT ICCAAGCGCT
 A Q L C P S F E E A E A T P S P V L P D I V M E A P L N S L L P S A 604

Obr. 2A2

GGTCTCTG IAGTGCAGCC CAGTGTATCC CCACITGGAG CACCICCTCC AGTIAGTTAT GACAGTATAA AGCTTCAGCC TGAACAACCC CCACCATATG
G A S V V Q P S V S P L E A P P P V S Y D [S] I K L E P E N P P Y 637

AAGAGCCAT GAATGTAGCA CTAAAGCTT TGGGAACAAA GGAAGGAATA AAGAGCCCTG AAAGTITTTAA IGCACCTGTT CAGGAACACAG AAGCTCCITTA
E E A M N V A L K A L G T K E G I K E P E S F N A A V Q E T E A P 670

IATATCCATT GCGTGTGATT IAATTAAAGA AACAAAGCTC ICCACITAGC CAAGTCCAGA TTTCICTAAT TATTGAGAAA TAGCAAAATT CGAGAAGTCC
Y I S I A C D L I K E T K L S T E P S P D F S N Y S E I A K F E K S 704

GTGCCCCAAC ACGCTGAGCT AGTGGAGCAT TCCITCAGCTG AATCTGAACC AGTIGACTTA TTIAGTGAIG ATTCGATCC TGAAGTCCCA CAAACACAAG
V P E H A E L V E D S S P E S E P V D L F S D D S I P E V P Q T Q 737

AGGAGGCTGT GATGCTCATG AAGGAGAGTC TCACITGAGT GTCIGAGACA GTAGCCAGC ACAAGACGGA GAGACTTAGT GCCTCACCCTC AGGAGCTAGG
E E A V M L M K E S L T E V S E T V A Q H K E E R L S A S P Q E L 770

AAAGCCATAT TTAGAGTCTT TTCAGCCCAA TTACATAGT ACAAGAGATG CTGCATCTAA TGACATCCCA ACATTGACCA AAAAGGAGAA AATTTCTTTG
G K P Y L E S F Q P N L H [S] T K D A A S N D I P T L T K K E K I S L 804

CAAATGGAAG AGTTTAATAC IGCAATTTAT ICAAAATGATG ACTTACTTTC TICTAAGGAA GACAAAATATA AAGAAAGTGA AACATTTTCA GATTCATCTC
Q M E E F N T A I Y S N D D L L [S] S K E D K I K E S E T F S D S S 837

CGATTGAGAT AATAGATGAA TTCCCCAGCT TGTGAGTGGC TAAAGATGAT TCTCCTAAAT TAGCCAAGGA GTACACATGAT CTAGAAGTAT CCGACAAAAG
P I E I I D E F P T F V [S] A K D D [S] P K L A K E Y T D L E V [S] D K 870

TGAATTGCT AATATCCAAA CCGGGGCAGA TTCAATTGCTT TGCTTAGAAT TGCCTGTGTA CCTTCTTTC AAGAAATAT ATCCTAAAGA IGAAGTACAT
S E I A N I Q S G A D S L P C L E L P C D L [S] F K N I Y P K D E V H 904

GTTTCAGATG AATTCCTCGA AAATAGTCC AGTGTATCTA AGGCATCCAT ATCGCTTCA AATGTCICTG CTTTGGAAACC TCAGACAGAA ATGGGCAGCA
V S D E F S E N R S S V S K A S I S P S N V S A L E P Q T E M G S 937

2A3

Obr.

TAGTTAAATC CAAATCAGCTT ACCAAGAAG CAGAGAAAA ACTTCCTTCT GACACAGAGA AAGAGACAG ATCCCTGTC A CCGTATGTG CAGCAGAGCT
 I V K S K S L T K E A E K K L P S D I E K E D R S L S A V L S A E 970

GAGTAAAACT ICAGTTGTG ACCTCCTCTA CTGGAGAGAC ATTAAGAAGA CTTGAGTGGT GTTTGGTGGC AGCTTATTC TCGTCTGTC TCTGACAGTC
 L S K T S V V D L L Y W R D I K K T G V V F G A S L F L L L S L T V 1004

TTCAGCATG TCAGTGTAC GGCCTACAT GCCTTGGCCC TGCCTCCGT GACTATCAGC TTAGGATAT ATAAGGCCGT GATCCAGGCT ATCCAGAAAT
 F S I V S V T A Y I A L A L L S V T I S F R I Y K G V I Q A I Q K 1037

CAGATGAAGG CCACCCATC AGGGCATATT TAGAATCTGA AGTTGCTATA TCAGAGAAAT TGGTTCAGAA ATACAGTAAI TCTGCTCTTG GTCAITGTA
 S D E G H P F R A Y L E S E V A I S E E L V Q K Y S N S A L G H V 1070

CAGCACAATA AAAGAAGCTGA GCGCGTTTT CTTAGTTGAT GATTIAGTTG ATCCCTGAA GTTTGGCAGT TGAIGTGG IGTTIACHTA IGTGGTGGC
 N S T I K E L R R L F L V D D L V D S L K F A V L M W V F T Y V G A 1104

TTGTTCAATG GTCTGACACT ACTGATTTA GCCTCTGATC CACTCTTCTG TATTCCTGTT ATTATGAAC GGCATCAGGT GCAGATAGAT CATTATCTAG
 L F N G L T L L I L A L I S L F S I P V I Y E R H Q V Q I D H Y L 1137

GACTTGCAAA CAAGAGTGT AAGGATGCCA TGGCCAAAAT CCAAGCAAAA ATCCCTGGAT TGAAGCCAA ACCAGATTGA AAAAGCCCA AACAGAGT
 G L A N K S V K D A M A K I Q A K I P G L K R K A D * 1163

CATCTTTAAA GGGGACTC ACTTGATTAC GGGGTGGGA GGGTCAGGG TCAGCCCTTG GTGGCCGTC GGTTCAGCT CTTATTTTT AGCAGTGCAC
 TGTTCAGGA AAAATTACCT GTCTTGACTT CCTGTGTTTA TCATCTTAAG TATTGTAAGC TCGTGTAT GGAICTCAIT GTAGTCACAC TTGCTTCC
 CAATGAGCC CCTGGTGAAT AAAGGACTCG GCGAAAGCTG TCCATTGTAT CTGCTGAGG GTAGCTAGC TGTATGCAGA GAGTTGTA AAGGCAAAAT
 CTGGGGCAG GGAAGCCCT TTTACAGTG TACTGTGTT GGTACAGTA AAACGATCC AGATTTTCT GAAATGAAT GTTTAGATGA GAGCATACTA
 CTAAAGCAGA GTCCAAACT CTGCTTTAT GGTGTTCT AGGTGTTCT TGAATTTACT GTTATTTCC CAATTAAGT AAATATAGAC CTAATCTATA
 TATAGTGT CACAAGCTT AGATCTTTAA CCTTGCAGCT GCGCCACAGT GCTTGCCTC TGAGTCAITG GTTATGCCGT GTAGTCCCA GCACATAAAC
 TAGCAGACAGA AATGTATTG TAGGAGTCT ACCTACCACC TGTTTTCAAG AAAATATAGA ACTCCAACA AAATATAGAA TGTCAATTTA AAGACTTACT
 GTATGTATAG TTAATTTGT CACAGACTI GAAATCTAT GAGTCAAT TCAATGTTCC AAATGTTCC AGTATCAAA CATGTTATG CAAGAATCA
 TAAATGAG ACTTATACCA TTGTGGTTTA AGCCGTACTG AATTATCTGT GGAATGCTT GGAACCTGTA AAAGCAAGT ATCAATAAAG CTTATAGACT
 TAAAAAAA AAAAAAAA

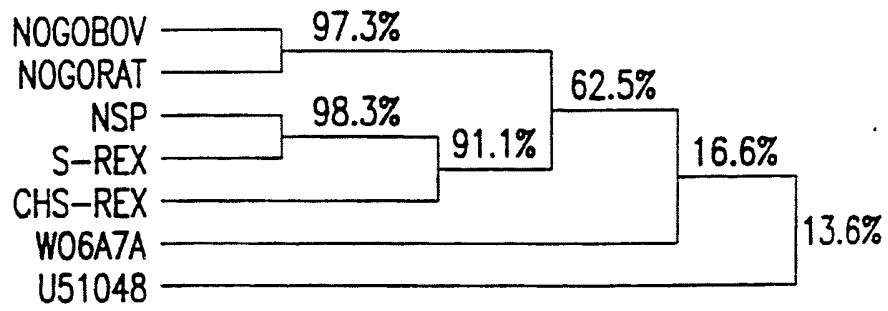
2A4

Obr.

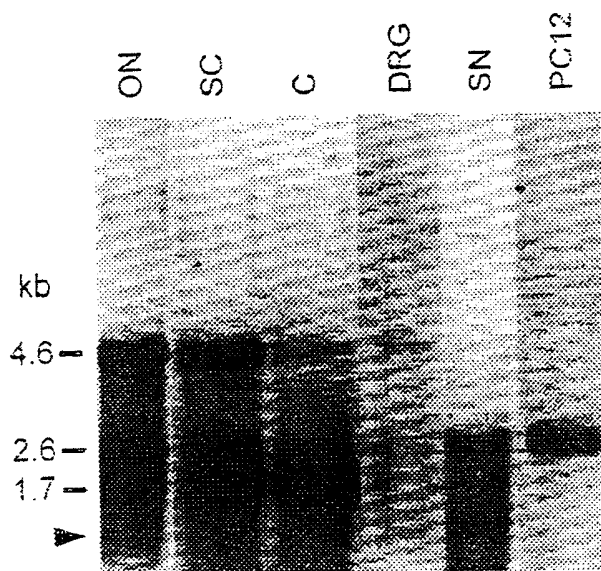
peptid 1:	EYLGDLPAVLPT	peptide 4:	KXFEXVWEV
(bovinní)	EYLGDLPAVLPT	(bovine)	KPFERVWEV
(kryší)	gYLGnLsAVsssE	(rat)	KPFEQaWEV
peptid 2:	EIAEIQDG ESL	peptide 5:	VVDLLYWRDIK
(bovinní)	EIAAdIQDGagSL	(bovine)	VVDLLYWRDIK
(kryší)	EIANIQsGadSL	(rat)	VVDLLYWRDIK
peptid 3:	KXYLESIQPSLGITK	peptide 6:	KAVAAEASMREEYADF
(bovinní)	KPYLESfQPSLGITK	(bovine)	KgVAAEASMgEEYADF
(kryší)	KPYLESfQPnLhsTK	(rat)	mQmsvvApvREEYADF

Obr. 2B

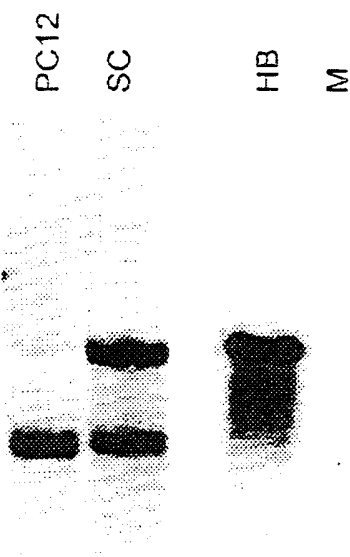
CHS-REX	1	10	20	30	40	50
U51048	1	NLLYWRDIKQ	TGIVFGS	LL	LLFSLTQFSV	VSVWAYLALA
NOGOBOV	1	NLLWRNSRK	TLLVFGIT	LL	LLDVMVHSV	ISVISMVGT
NOGORAT	1	DLLTWRDIKQ	TGMVFGAS	LL	LLSLTQFSI	VSVJAYJALA
NSP	1	DLLYWRDIKQ	TGMVFGAS	LL	LLSLTQFSI	VSVJAYJALA
S-REX	1	DLLYWRDIKQ	TGIVFGS	LL	LLFSLTQFSV	VSVWAYLALA
W06A7A	1	DVYWRDAKK	SAILVSLA	LL	LLFVJAKYPL	LTWVYSL
CHS-REX	51	YKSVLQAMQK	TDEGHPFKAY	LD	DMNLSQD	QIQKYTDCLQ
U51048	51	LQFWSIMKJ	DENKQILRF	Y	PHPKIEIPR	EETLMAGKA
NOGOBOV	51	YKGMJQAIQK	SDEGHPFRAY	LE	SEVAISEE	LQKYSNSAL
NOGORAT	51	YKGMJQAIQK	SDEGHPFRAY	LE	SEVAISEE	LQKYSNSAL
NSP	51	YKSVLQAMQK	TDEGHPFRAY	LE	LEITLSQE	QIQKYTDCLQ
S-REX	51	YKSVLQAMQK	TDEGHPFRAY	LE	LEITLSQE	QIQKYTDCLQ
W06A7A	51	FKKVEAQIKK	TDSEHPFSET	LA	QDLTLPQE	KVHAQADVFV
CHS-REX	101	RRFLVQDLV	DSLKFVAVLMW	LL	TYVGALFN	GLTLLIMAV
U51048	101	MIELLVEKW	EDSLKFLVLL	CG	INLLGDCF	NGLTILIFGM
NOGOBOV	101	RRFLVDDL	DSLKFVAVLMW	V	FITYVGALFN	GLTLLIALI
NOGORAT	101	RRFLVDDL	DSLKFVAVLMW	V	FITYVGALFN	GLTLLIALI
NSP	101	RRFLVDDL	DSLKFVAVLMW	LL	TYVGALFN	GLTLLIMAV
S-REX	101	RRFLVDDL	DSLKFVAVLMW	LL	TYVGALFN	GLTLLIMAV
W06A7A	101	KKLMVESPL	ESIKFGLVLM	S	ITYJASWES	GFTLJLGLL
CHS-REX	151	KYQAQIDQYL	GLVRTHJNTV	VAK	IQAKIPG	AK
U51048	151	RHQAQIDHYL	GLANKNVKDA	MAK	IQAKIPG	LK
NOGOBOV	151	RHQAQIDHYL	GLANKSVKDA	MAK	IQAKIPG	LK
NOGORAT	151	KHQAQIDQYL	GLVRTHJNAV	VAK	IQAKIPG	AK
NSP	151	KHQAQIDQYL	GLVRTHJNTV	VAK	IQAKIPG	AK
S-REX	151	SNOEAIIPHIL	ATISGHILKNV	QNT	IDEKLPF	LRSAPVAAEE
W06A7A	151					



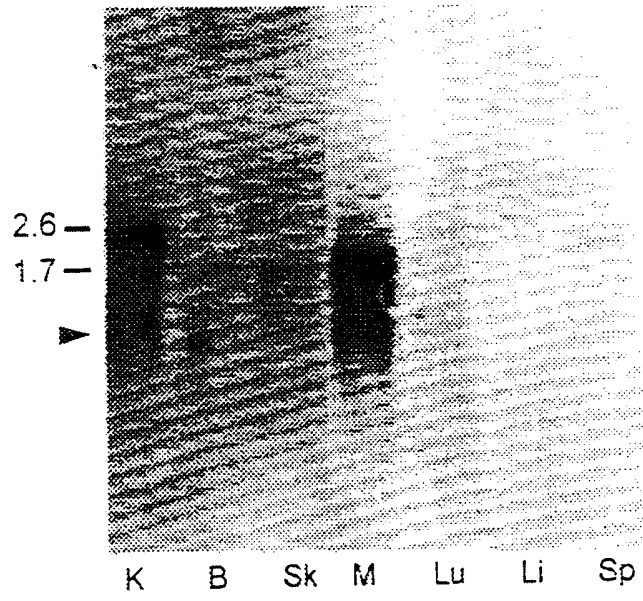
obr. 3B



Obr. č. 4A

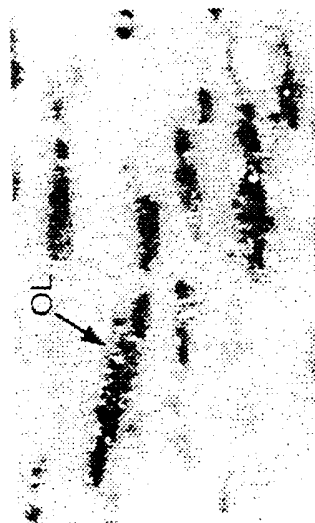


Obr. 4B



Obr. 4C

Obr. 5A



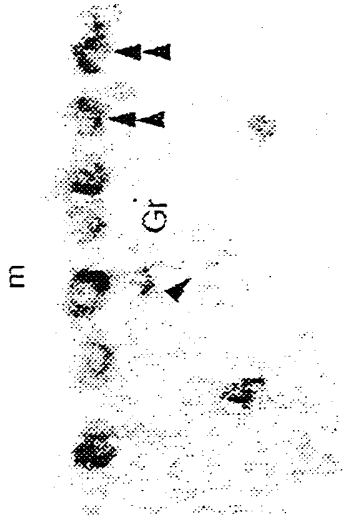
Obr. 5B



Obr. 5C



Obr. 5D



Obr. 5E



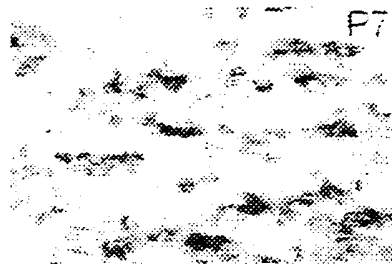
Obr. 5F



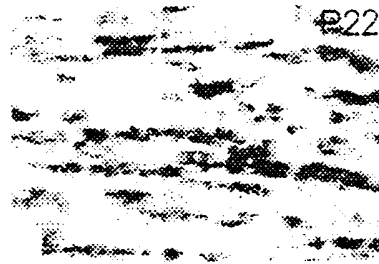
Obr. 6A



Obr. 6B



Obr. 6C



Obr. 6D

nogo P22
sense

pip P0
sense

pip P3

Obr. 6E

Obr. 6F

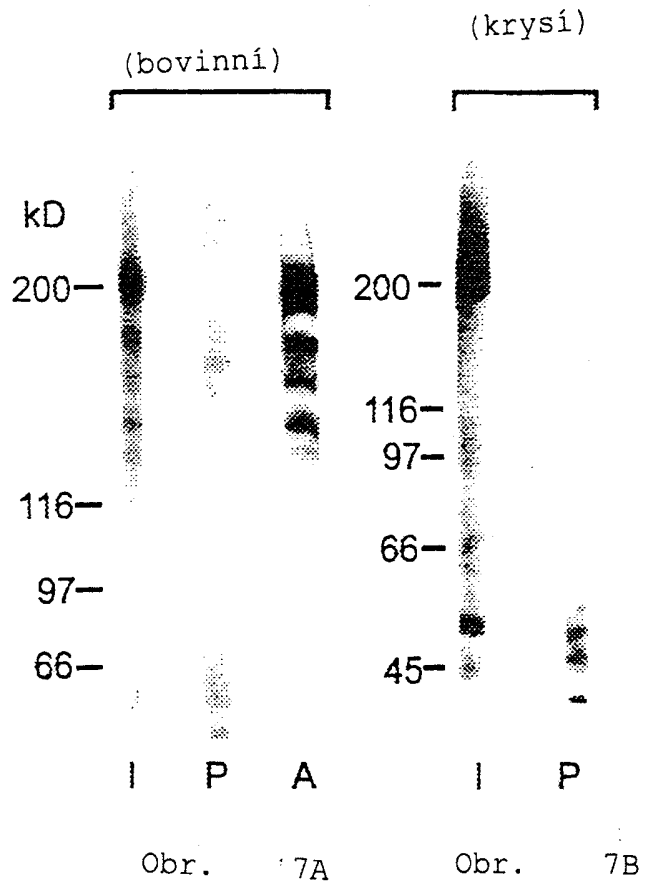
Obr. 6G

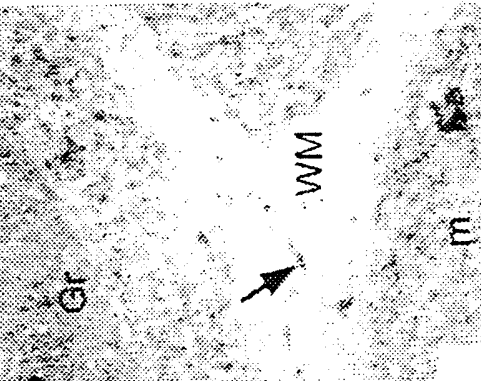


Obr. 6H

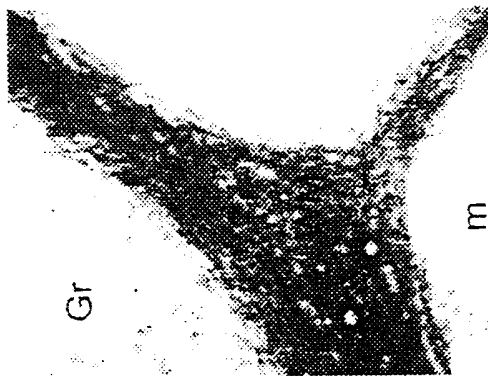


Obr. 6I

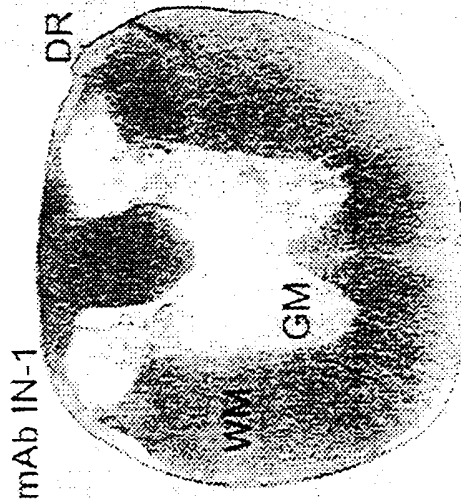




Obr. 8C



Obr. 8B

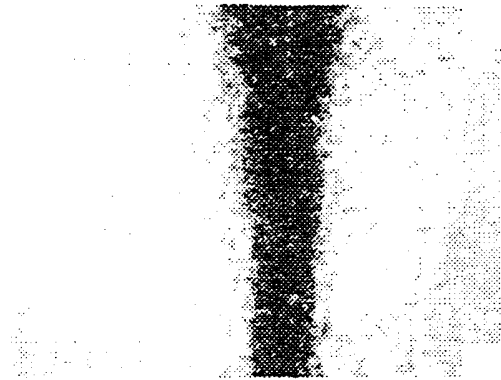


Obr. 8A

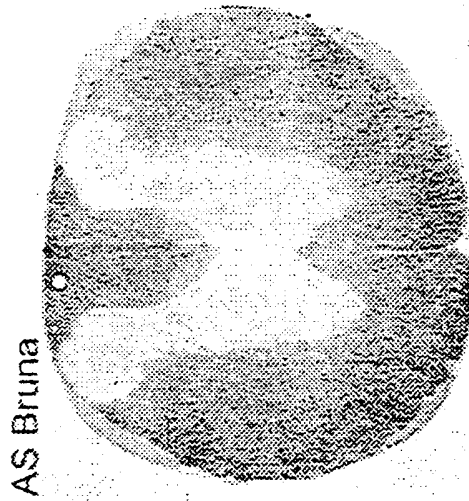
mAb IN-1



Obr. 8F



Obr. 8E



Obr. 8D



AS 472

8I

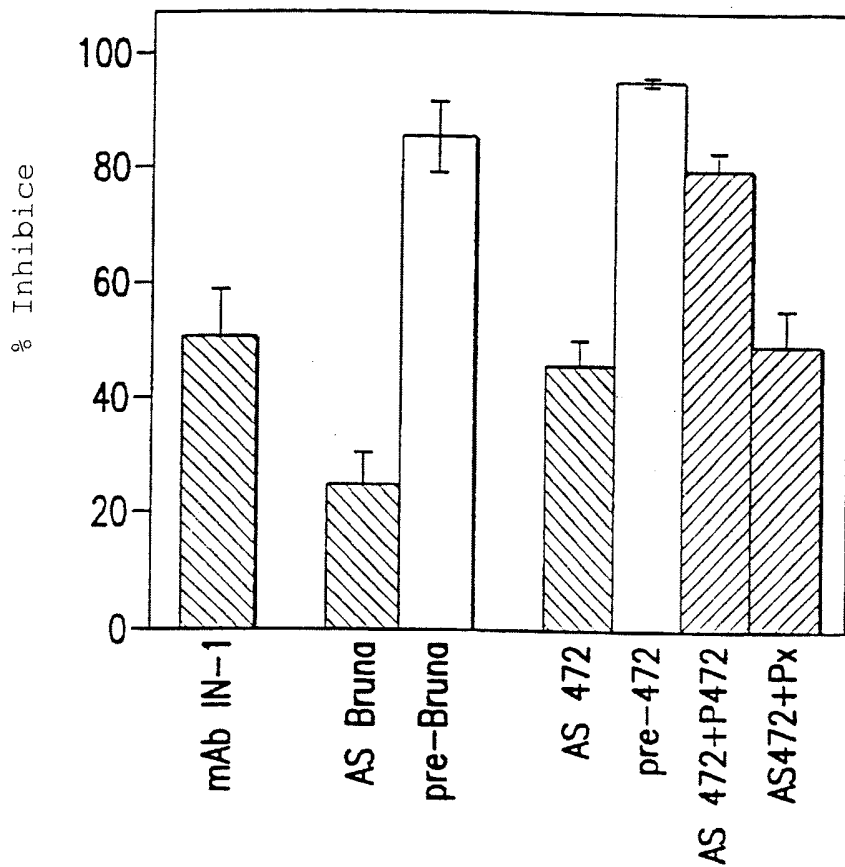
Obr.

8H

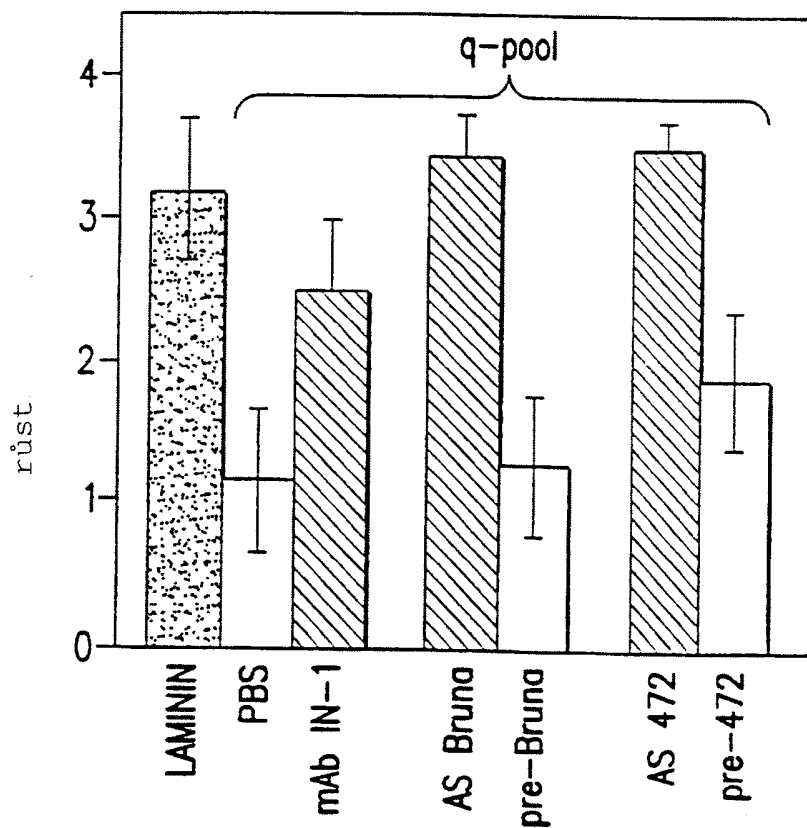
Obr.

8G

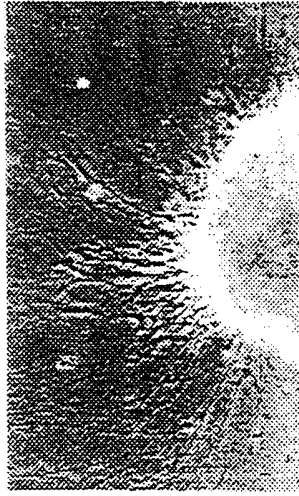
Obr.



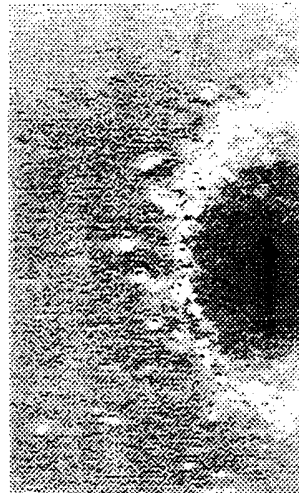
Obr. 9A



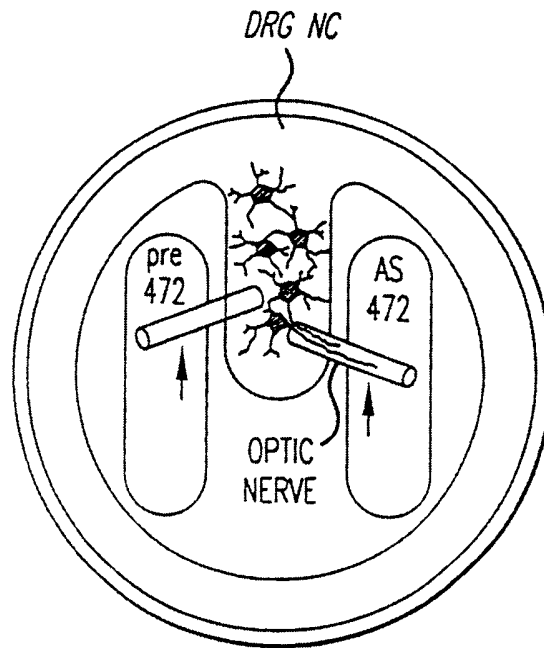
Obr. 9B



Obr. 9D



Obr. 9C

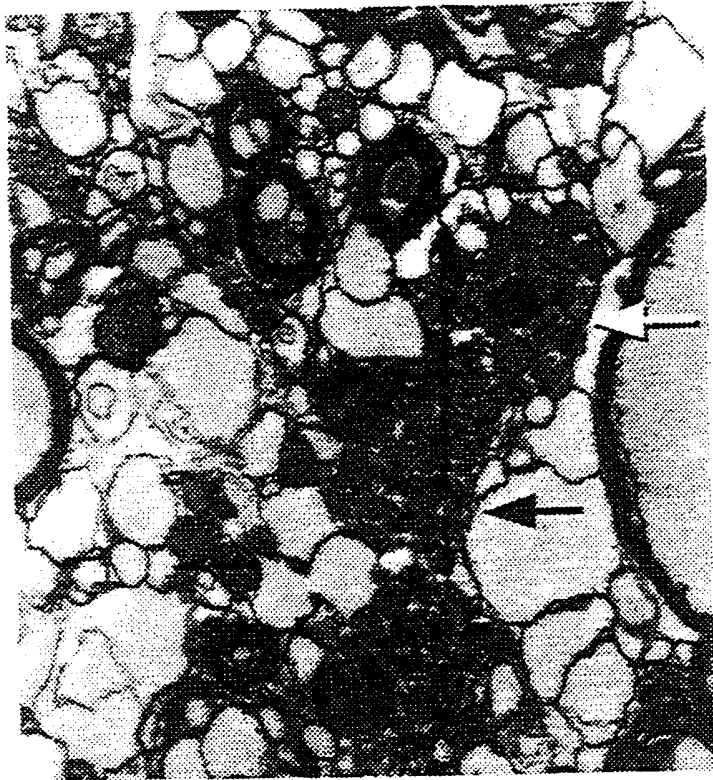


Obr. 10A

kultura	pre-472	AS 472
1	-	++
2	-	+++
3	+	+++
4	+	-
5	-	+++
6	+	+++
7	++	++
8	+	++
9	+	++
10	-	+++

AXON /NERV --=0;+=1-20;+=20-50;+=50->300

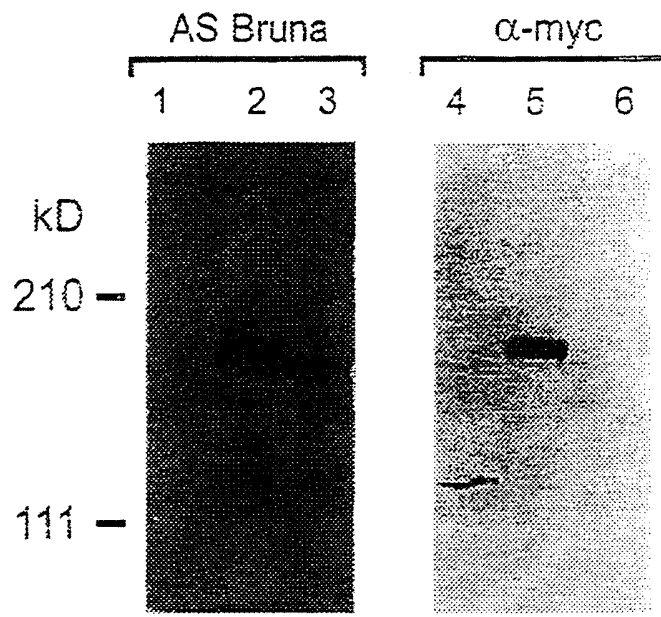
Obr. 10B



Obr. 10C

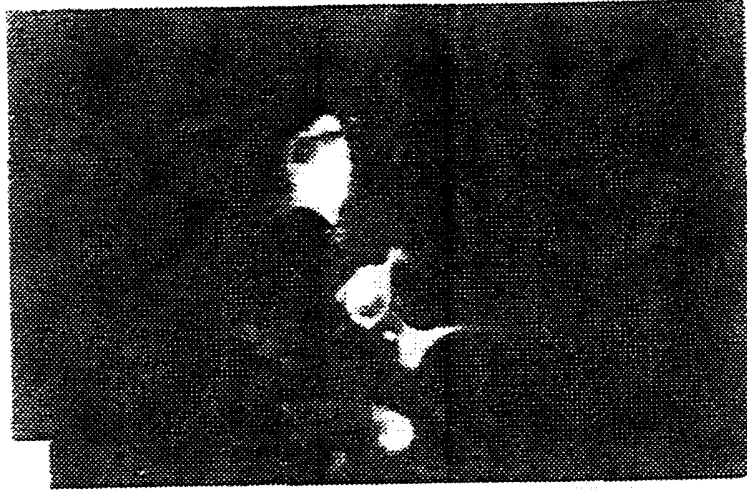


Obr. 10D



Obr.

11A



Obr. 11B



Obr. 11C

10	20	30	40	50	60
CTATCTCCTC	TCTCAGCCGC	TGCTTTTAAA	GAACGTGAAT	ACCTTGGTGA	TTTACCAGCA
70	80	90	100	110	120
GTA CTGCCCA	CTGAAGGAAC	ACTTCCAGCA	ACTTCAAATG	AAGCTTCTAA	AGCATTCTCA
130	140	150	160	170	180
GAGAAGGCAA	AAAATCCATT	TGTAGAGAGA	AATTTAACAG	AATTTTCAGA	ATTGGAATAT
190	200	210	220	230	240
TCAGAAATGG	AATCATCATT	CAGTGGCTCT	CAAAAGGCAG	AACCTGCCGT	AACAGTAGCG
250	260	270	280	290	300
AATCCTAGGG	ACGAAATAGT	TGTGAGGAGT	AGAGATAAAG	AAGAGGACTT	AGTTAGTCTT
310	320	330	340	350	360
AACATCCTTC	ATACTCAGCA	GGAGTTATCT	ACAGTCCTTA	CGAAATCAGT	TGAAGAAGAA
370	380	390	400	410	420
GATAGAGTTC	TGCTCCAGA	AAAAACAAG	GACAGTTTTA	AGGAAAAGGG	AGTTGCAGCA
430	440	450	460	470	480
GAAGCTTCTA	TGGGGGAGGA	ATATGCAGAC	TTCAAACCAT	TTGAGCGAGT	ATGGGAAGTG
490	500	510	520	530	540
AAAGATACTT	ACAAGCAAGA	TAGTGATGTT	TTGATTGCTG	GAGGTAATAT	AGAGAGCAAA
550	560	570	580	590	600
TTGGAAGGTA	AAGTGATAA	GAAACACITTT	TCAGATAGCC	TTGAACAAAC	AAATCGTGAA
610	620	630	640	650	660
AAAGATAGTG	AAAGCAGTAA	TGATGACACT	TCATTTCCCA	GTACACCAGA	AGCTGTAAGA
670	680	690	700	710	720
GGTGGTTCCG	GAGCGTACAT	CACGTGTGCT	CCCTTTAACC	CAACAACCTGA	GAATGTTTCA
730	740	750	760	770	780
ACAAACATTT	TTCCCTTGTT	GGAAGATCAT	ACTTCGGAAA	ATAAGACAGA	TGAAAAAAG
790	800	810	820	830	840
ATAGAAAAAA	AAAGGCACAA	ATTGTAACAG	AGAAGAATGC	AAGTGCAAG	ACATCAAACC
850	860	870	880	890	900
CTTTCCTTAT	GGCAGCACAG	GAGTCTAAGA	CAGATTACGT	TACAACAGAT	CATGTGTCAA
910	920	930	940	950	960
AGGTGACCGA	GGAAGTAGTG	GCAAACATGC	CTGAAGGTCT	AACCCAGAT	TTGGTTCAGG
970	980	990	1000	1010	1020
AAGCATGTGA	AAGTGAATTG	AATGAAGCTA	CTGGTACAAA	AATTGCCTTT	GAAACAAAAA
1030	1040	1050	1060	1070	1080
TGGACCTGGT	TCAAACCTCA	GAAGCTGTGC	AGGAGTCACT	TTACCCTGTA	ACACAGCTTT
1090	1100	1110	1120	1130	1140
GCCCATCTTT	TGAAGAATCT	GAAGCTACTC	CGTCACCGGT	TTGCCTGAC	ATTGTCATGG
1150	1160	1170	1180	1190	1200
AAGCACCATT	AAATTCTGTA	GTTCTAGTG	CTGGTGCTTC	TGCAGTGCAG	CTCAGTTCAT
1210	1220	1230	1240	1250	1260

Obr. 12A

CACCATTAGA AACTCTTCTC TCAGTTAATT ATGAAAGCAT AAAGTTTGAG CCTGAAAATC
 1270 1280 1290 1300 1310 1320
 CCCCACCATA TGAGGAGGCC ATGAATGTAT CACTAAAAAA AGAATCAGGA ATGAATGAAG
 1330 1340 1350 1360 1370 1380
 AAATCACAGA GCCTGAAGGT ATTAGTGTAG CTGTTTCAGGA AACAGAAGCT CCTTATATAT
 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 CTATTGCATG TGATTTAATT AAAGAAACAA AGATCTCTAC TGAACCGACT CCAGATTTCT
 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 CTAGTTATTC AGAAATAGCA GAAGTTGCAC AGCCAGTGCC CGAGCATTCT GAGCTAGTTG
 1510 1520 1530 1540 1550 1560
 AAGATTCCTC CCCCATTCT GAACCAGTTG ACTTATTTAG TGATGATTCA ATACCCGAAG
 1570 1580 1590 1600 1610 1620
 TTCCACAAAA ACAAGATGAA GCTGTAATAC TTGTGAAAGA AAACCTCACT GAAATTTTCA
 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 CTGAGTCAAT GACAGGACAT GACAATAAGG GAAAACCTCAG TGCTTCACCA TCACCTGAGG
 1690 1700 1710 1720 1730 1740
 GAGGAAAACC GTATTTGGAG TCTTTTCAGC CCAGTTTAGG CATCACAAAA GATACCTTAG
 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 CACCTGATGA AGTTTCAGCA TTGACCCAAA AGGAGAAAAT CCCTTTGCAG ATGGAGGAGC
 1810 1820 1830 1840 1850 1860
 TCAATACTGC AGTTTATTCA AGTGATGGCT TATTCATTGC TCAGGAAGCA AACCTAAGAG
 1870 1880 1890 1900 1910 1920
 AAAGTGAAC ATTTTCAGAT TCATCTCCGA TTGAGATTAT AGATGAGTTC CCGACCTTTG
 1930 1940 1950 1960 1970 1980
 TCAGTTCTAA AGCAGATTCT TCTCCTACAT TAGCCAGGGA ATACACTGAC CTAGAAGTAG
 1990 2000 2010 2020 2030 2040
 CCCACAAAAG TGAAATTGCT GACATCCAGG ATGGAGCTGG GTCATTGGCT TGTGCAGGAT
 2050 2060 2070 2080 2090 2100
 TGCCCCATGA CCTTTCTTTC AAGAGTATAC AACCTAAAGA GGAAGTTTCA GTCCCAGATG
 2110 2120 2130 2140 2150 2160
 AGTTCTCCAA AGATAGGGGT GATGTTTCAA AGGTGCCCGT ACTGCCTCCA GATGTTTCTG
 2170 2180 2190 2200 2210 2220
 CTTTGGATGC TCAAGCAGAG ATAGGCAGCA TAGAAAAACC CAAAGTTCTT GTGAAAGAAG
 2230 2240 2250 2260 2270 2280
 CCGAGAGAAA ACTTCTTCT GATACAGAAA AAGAGCGAAG ATCTCCATCT GCTATATTTT
 2290 2300 2310 2320 2330 2340
 CAGCAGAGCT GAGTAAACT TCAGTTGTTG ACCTCCTCTA CTGGAGAGAC ATTAAGAAGA
 2350 2360 2370 2380 2390 2400
 CTGGAGTGGT GTTTGGTGCC AGCTTGTTC TGCTGCTCTC GCTGACAGTA TTCAGCATTG
 2410 2420 2430 2440 2450 2460

TGAGTGAAC	GGCCTACATT	GCCTTGGCCC	TGCTCTCTGT	GACTIONCAGC	TTTAGGATAT
2470	2480	2490	2500	2510	2520
ATAAGGGTGT	GATCCAGGCT	ATCCAGAAAT	CTGATGAAGG	CCACCCATTC	AGGGCATATT
2530	2540	2550	2560	2570	2580
TGGAATCTGA	AGTTGCTATA	TCTGAGGAGT	TGGTTCAGAA	GTACAGCAAT	TCTGCTCTTG
2590	2600	2610	2620	2630	2640
GTCATGTTAA	CTGCACAATA	AAAGAACTCA	GACGCCTCTT	CTTAGTTGAT	GATTTAGTTG
2650	2660	2670	2680	2690	2700
ATTCTCTGAA	GTTTGCAGTG	TTGATGTGGG	TATTTACCTA	TGTTGGTGCC	TTGTTCAATG
2710	2720	2730	2740	2750	2760
GTCTGACACT	ACTAATTTTG	GCTCTGATTT	CACTCTTCAG	TGTTCCGTGT	ATTTATGAAC
2770	2780	2790	2800	2810	2820
GGCATCAGGC	GCAAATAGAT	CATTATCTGG	GACTTGCAAA	TAAGAATGTT	AAAGATGCTA
2830	2840	2850	2860	2870	2880
TGGCTAAAAT	CCAAGCAAAA	ATCCCTGGAT	TGAAGCGTAA	AGCTGAATGA	GAAAGCCTGA
2890	2900	2910	2920	2930	2940
AAGAGTTAAC	AATAGAGGAG	TTTATCTTTA	AAGGGGATAT	TCATTTGATT	CCATTGGGGA
2950	2960	2970	2980	2990	3000
GGGTCAGGGA	AGAACAAAGC	CTTGACATTG	CAGTGCAGTT	TCACAGATCT	TTATTTTTAG
3010	3020	3030	3040	3050	3060
CAACGCAGTG	TCTGAGGAAA	AATGACCTGT	CTTGACTGCC	CTGTGTTTAT	CATCTTAAGT
3070	3080	3090	3100	3110	3120
ATTGTAAGCT	GCTATGTATG	GATTTAAATC	GTAATCATAT	TTGTTTTTCC	TGTATGAGGC
3130	3140	3150	3160	3170	3180
ACTGGTGAAT	AAACAAAGAT	CTGAGAAAGC	TGTATATTAC	ACTTTGTCCG	AGGTAGTCTT
3190	3200	3210	3220	3230	3240
GCTGTATTTG	GGGAATTGCA	AAGAAAGTGG	AGCTGACAGA	AATAACCCTT	TTCACAGTTT
3250	3260	3270	3280	3290	3300
GTGCACTGTG	TACGGTCTGT	GTAGGTTGAT	GCAGATTTTC	TGAAATGAAA	TGTTTAGACG
3310	3320	3330	3340	3350	3360
AGATCATGCC	ACCAAGGCAG	GAGTGAAAAA	GCTTGCCTTT	CCTGGTATGT	TCTAGGTGTA
3370	3380	3390	3400	3410	3420
TTGTGAAATT	TACTGTTGTA	TTAATTGCCA	ATATAAGTAA	ATATAGATTA	TATATATCTA
3430	3440	3450	3460	3470	3480
TATATAGTGT	TTCACGAAGC	TTAGCCCTTT	ACCTTCCCAG	CTGCCCCACA	GTGCTTGATA
3490	3500	3510	3520	3530	3540
CTTCTGTCAT	GGGTTTTATG	TGTGTAGTCC	CAAAGCACAT	AAGCTAGGGA	GAAACGTACT
3550	3560	3570	3580	3590	3600
TCTAGGCGCA	CTACCATCTG	TTTTCAACAC	GAACCGACGC	CATGCAAACA	GAACCTCTCA
3610	3620	3630	3640	3650	3660
ACATAAACTT	CACTGCACAG	ACTTACTGTA	GTTAATTTTA	TCACAAACTC	TGGACTGAAT
3670	3680	3690	3700	3710	3720

CTAATGCTTC CAAAATGTT TGCAAATATC AACATTGTT ATGTAAGAAA ATATAAATGA
3730 3740 3750 3760 3770 3780
CGATTTATAC AATTGTGGTT TAAGCTGTAT TGAACATAAT CTGTGGAATG CATTGTGAAC
3790 3800 3810 3820 3830 3840
TGTAAGCA AAGTATCAAT AAAGCTTATA GACTTAAAAA AAAAAAAAAA AAA.....

Obr. 12D

1 CAG GCT TAG TCT GGG GAA GCG GGT GTT TCA TGT CTC AGG GAG
 Q A - S G E A G V S C L R E

43 AAT TTT GCA GTT TAC AGC GTT TCT GTT GGT ATG CAT AAT TTG
 N F A V Y S V S V G M H N L

85 TAA TTG CTG CTG GAG GGC AGA TCG TGG CAA GAA START
ATG GAC GGA
 - L L L E G R S W Q E M D G

127 CAG AAG AAA CAT TGG AAG GAC AAG GTT GTT GAC CTC CTC TAC
 Q K K H W K D K V V D L L Y

169 TGG AGA GAC ATT AAG AAG ACT GGA GTG GTG TTT GGT GCC AGC
 W R D I K K T G V V F G A S

211 TTA TTC CTG CTG CTG TCT CTG ACA GTG TTC AGC ATT GTC AGT
 L F L L L S L T V F S I V S

253 GTA ACG GCC TAC ATT GCC TTG GCC CTG CTC TCG GTG ACT ATC
 V T A Y I A L A L L S V T I

295 AGC TTT AGG ATA TAT AAG GGC GTG ATC CAG GCT ATC CAG AAA
 S F R I Y K G V I Q A I Q K

337 TCA GAT GAA GGC CAC CCA TTC AGG GCA TAT TTA GAA TCT GAA
 S D E G H P F R A Y L E S E

379 GTT GCT ATA TCA GAG GAA TTG GTT CAG AAA TAC AGT AAT TCT
 V A I S E E L V Q K Y S N S

421 GCT CTT GGT CAT GTG AAC AGC ACA ATA AAA GAA CTG AGG CCG
 A L G H V N S T I K E L R R

463 CTT TTC TTA GTT GAT GAT TTA GTT GAT TCC CTG AAG TTT GCA
 L F L V D D L V D S L K F A

505 GTG TTG ATG TGG GTG TTT ACT TAT GTT GGT GCC TTG TTC AAT
 V L M W V F T Y V G A L F N

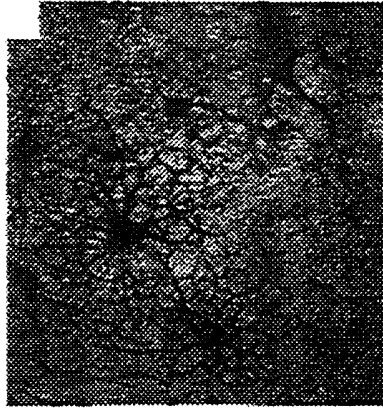
547 GGT CTG ACA CTA CTG ATT TTA GCT CTG ATC TCA CTC TTC AGT
 G L T L L I L A L I S L F S

589 ATT CCT GTT ATT TAT GAA CGG CAT CAG GTG CAG ATA GAT CAT
 I P V I Y E R H Q V Q I D H
 631 TAT CTA GGA CTT GCA AAC AAG AGT GTT AAG GAT GCC ATG GCC
 Y L G L A N K S V K D A M A
 673 AAA ATC CAA GCA AAA ATC CCT GGA TTG AAG CGC AAA GCA GAT
 K I Q A K I P G L K R K A D
 715 STOP
 TGA AAA AGC CCC AAA CAG AAG TTC ATC TTT AAA GGG GAC ACT
 - K S P K Q K F I F K G D T
 757 CAC TTG ATT ACG GGG GTG GGA GGT CAG GGG TGA GCC CTT GGT
 H L I T G V G G Q G - A L G
 799 GGC CGT GCG GTT TCA GCT CTT TAT TTT TAG CAG TGC ACT GTT
 G R A V S A L Y F - Q C T V
 841 TGA GGA AAA ATT ACC TGT CTT GAC TTC CTG TGT TTA TCA TCT
 - G K I T C L D F L C L S S
 883 TAA GTA TTG TAA GCT GCT GTG TAT GGA TCT CAT TGT AGT CAC
 - V L - A A V Y G S H C S H
 925 ACT TGT CTT CCC CAA TGA GGC GCC TGG TGA ATA AAG GAC TCG
 T C L P Q - G A W - I K D S
 967 GGC AAA GCT GTG CAT TGT ATC TGC TGC AGG GTA GTC TAG CTG
 G K A V H C I C C R V V - L
 1009 TAT GCA GAG AGT TGT AAA GAA GGC AAA TCT GGG GGC AGG GAA
 Y A E S C K E G K S G G R E
 1051 AAC CCT TTT CAC AGT GTA CTG TGT TTG GTC AGT GTA AAA CTG
 N P F H S V L C L V S V K L
 1093 ATG CAG ATT TTT CTG AAA TGA AAT GTT TAG ATG AGA GCA TAC
 M Q I F L K - N V - M R A Y
 1135 TAC TAA AGC AGA GTG GAA AAC TCT GTC TTT ATG GTG TGT TCT
 Y - S R V E N S V F M V C S

1177 AGG TGT ATT GTG AAT TTA CTG TTA TAT TGC CAA TAT AAG TAA
 R C I V N L L L Y C Q Y K -
 1219 ATA TAG ACC TAA TCT ATA TAT AGT GTT TCA CAA AGC TTA GAT
 I - T - S I Y S V S Q S L D
 1261 CTT TAA CCT TGC AGC TGC CCC ACA GTG CTT GAC CTC TGA GTC
 L - P C S C P T V L D L - V
 1303 ATT GGT TAT GCA GTG TAG TCC CAA GCA CAT AAA CTA GGA AGA
 I G Y A V - S Q A H K L G R
 1345 GAA ATG TAT TTG TAG GAG TGC TAC CTA CCA CCT GTT TTC AAG
 E M Y L - E C Y L P P V F K
 1387 AAA ATA TAG AAC TCC AAC AAA AAT ATA GAA TGT CAT TTC AAA
 K I - N S N K N I E C H F K
 1429 GAC TTA CTG TAT GTA TAG TTA ATT TTG TCA CAG ACT CTG AAA
 D L L Y V - L I L S Q T L K
 1471 TTC TAT GGA CTG AAT TTC ATG CTT CCA AAT GTT TGC AGT TAT
 F Y G L N F M L P N V C S Y
 1513 CAA ACA TTG TTA TGC AAG AAA TCA TAA AAT GAA GAC TTA TAC
 Q T L L C K K S - N E D L Y
 1555 CAT TGT GGT TTA AG
 H C G L

Obr. 14C

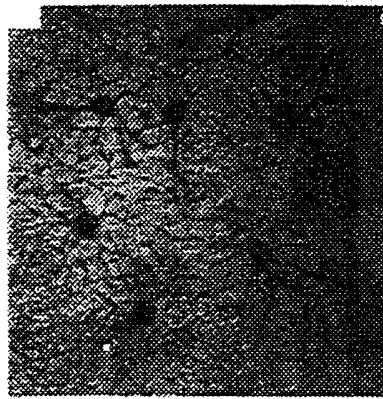
Obr. 15A



Obr. 15B

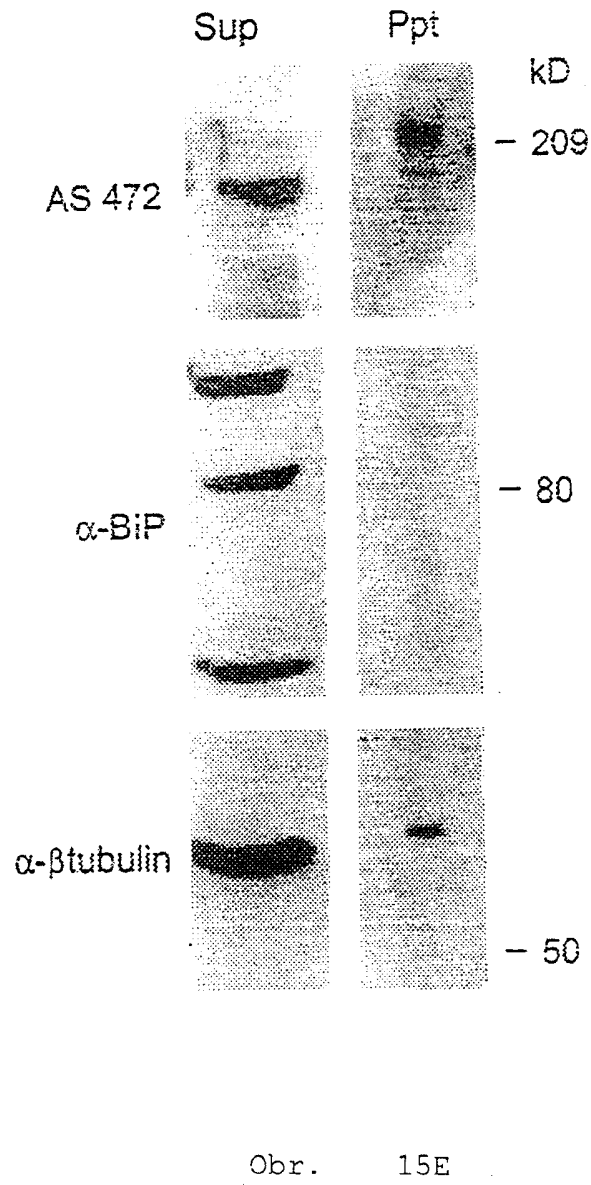


Obr. 15C

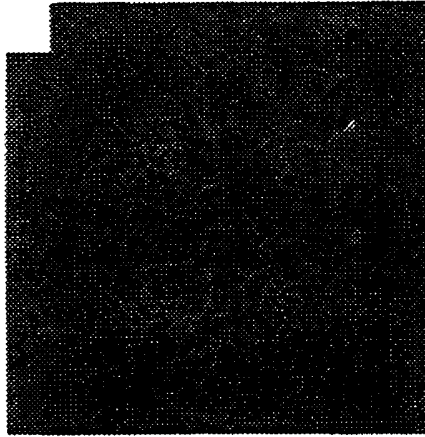


Obr. 15D

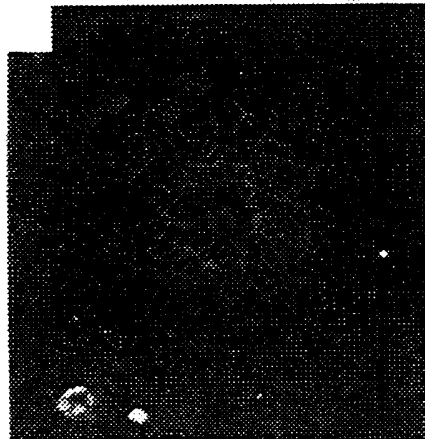




Obr. 16A



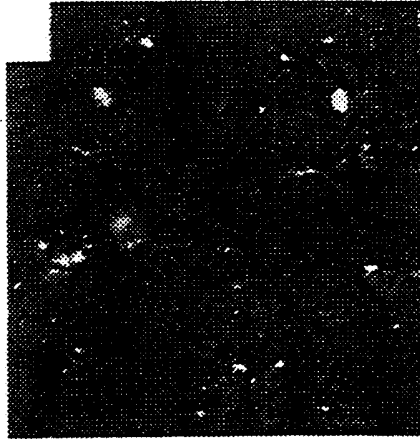
Obr. 16B



Obr. 16C

Obr. 16D

Obr. 16E

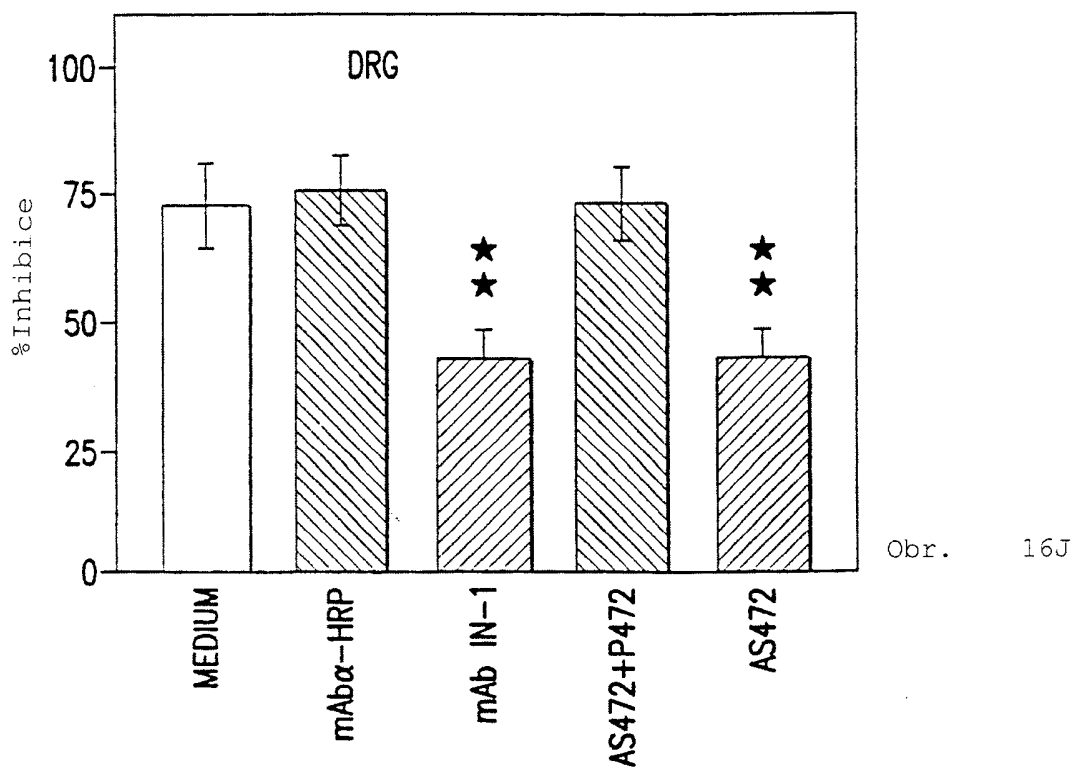
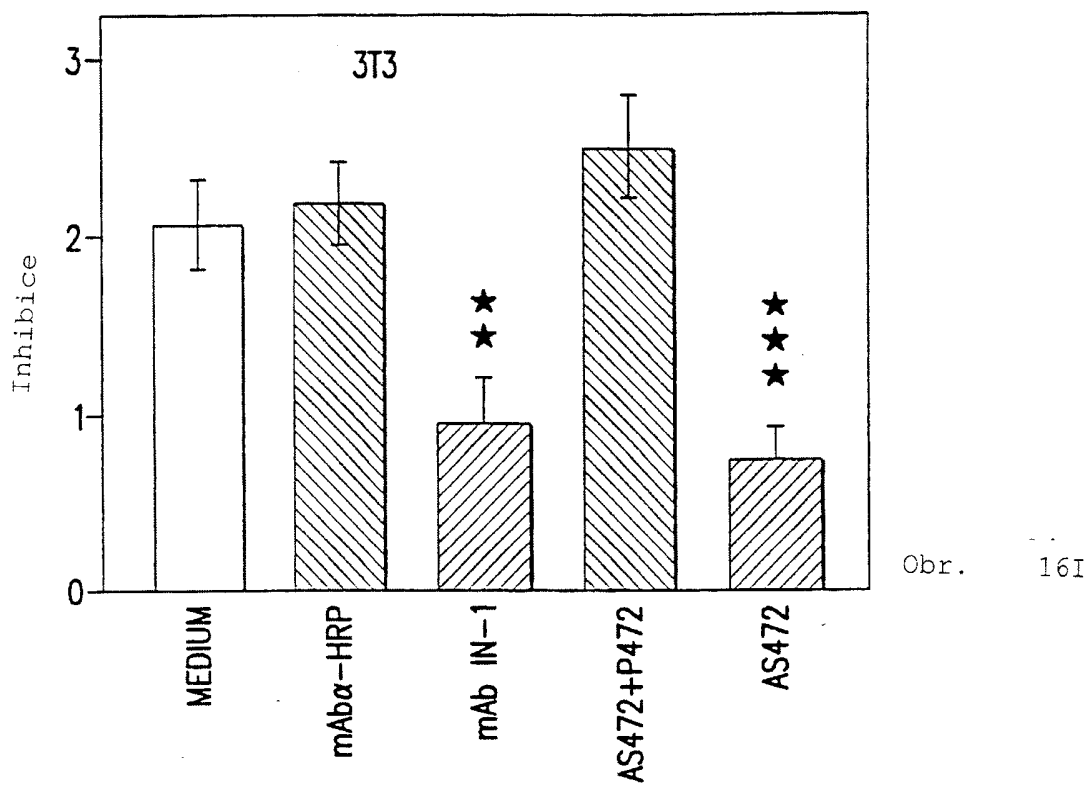


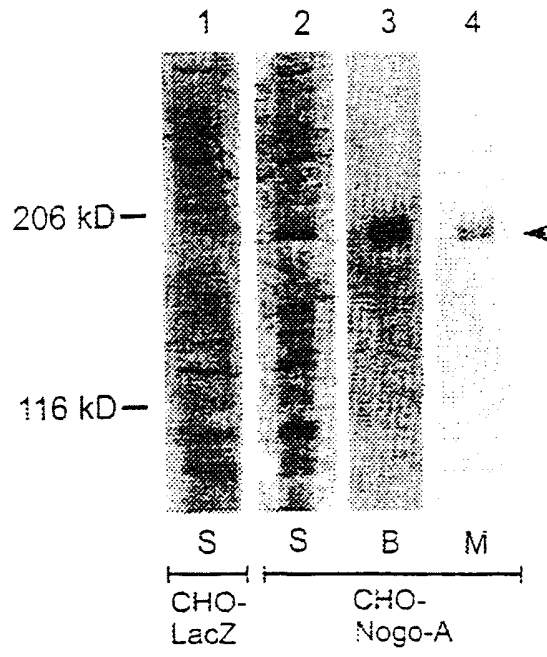
Obr. 16F



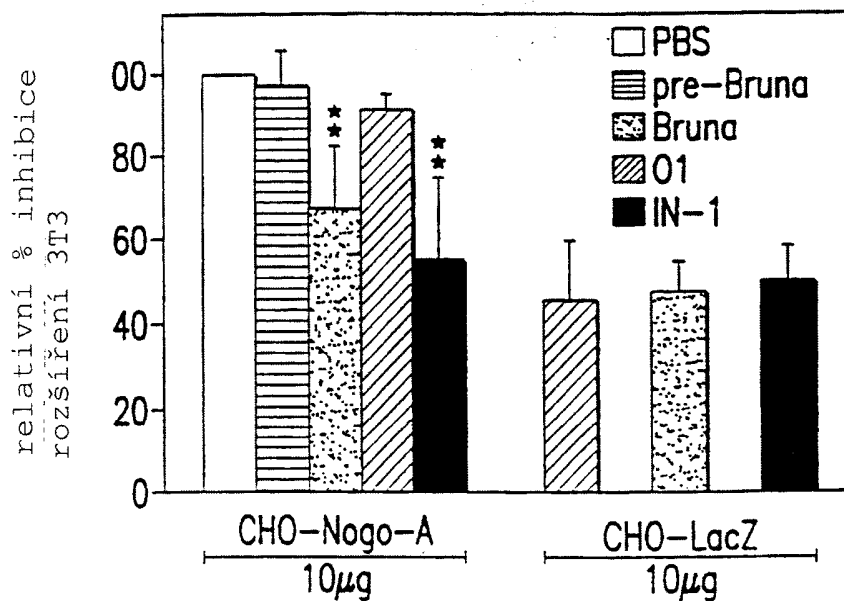
Obr. 16G

Obr. 16H

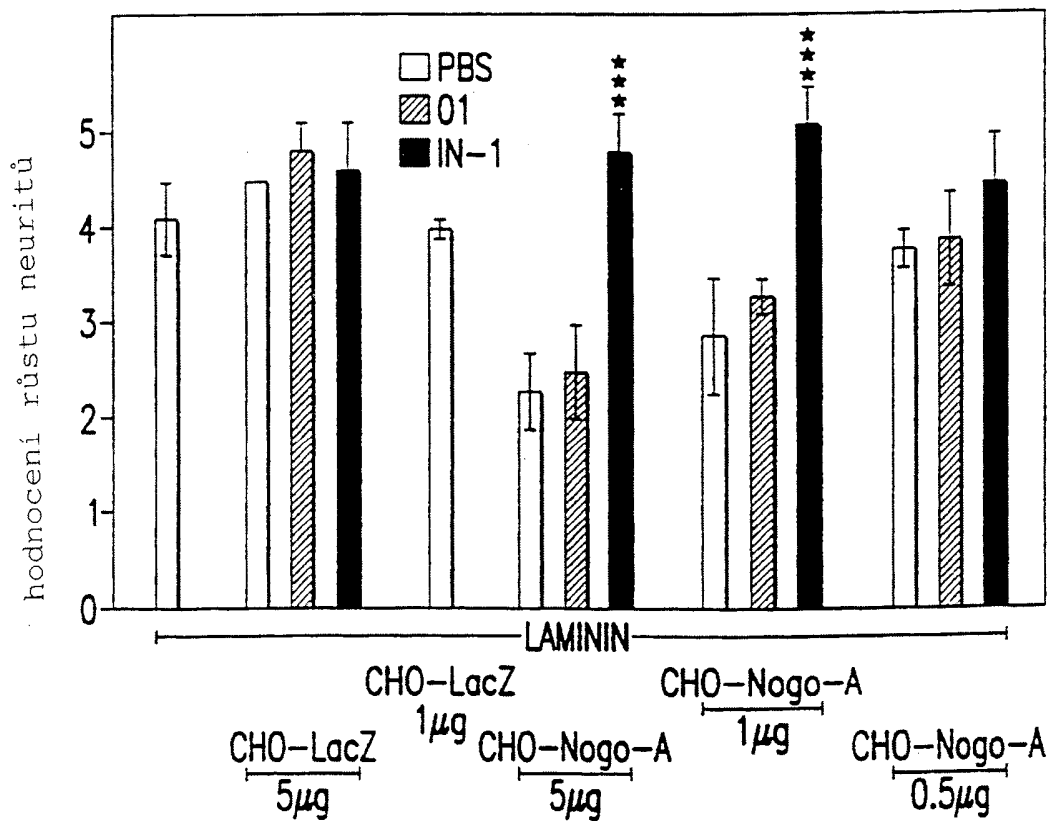




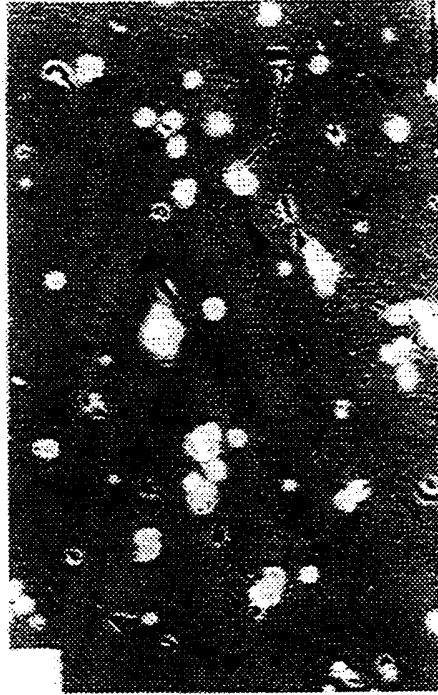
Obr. 17A



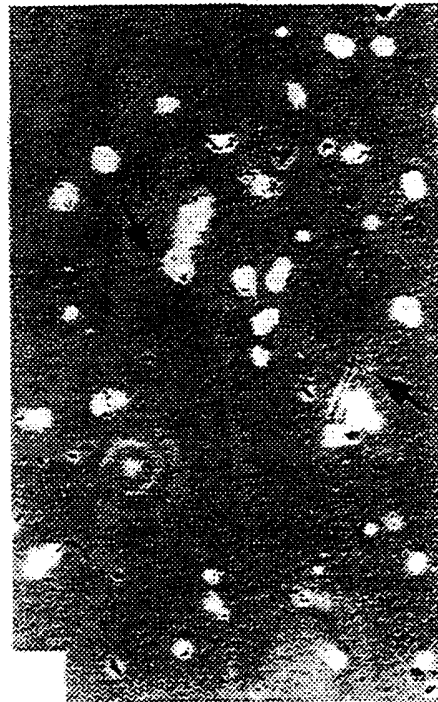
Obr. 17B



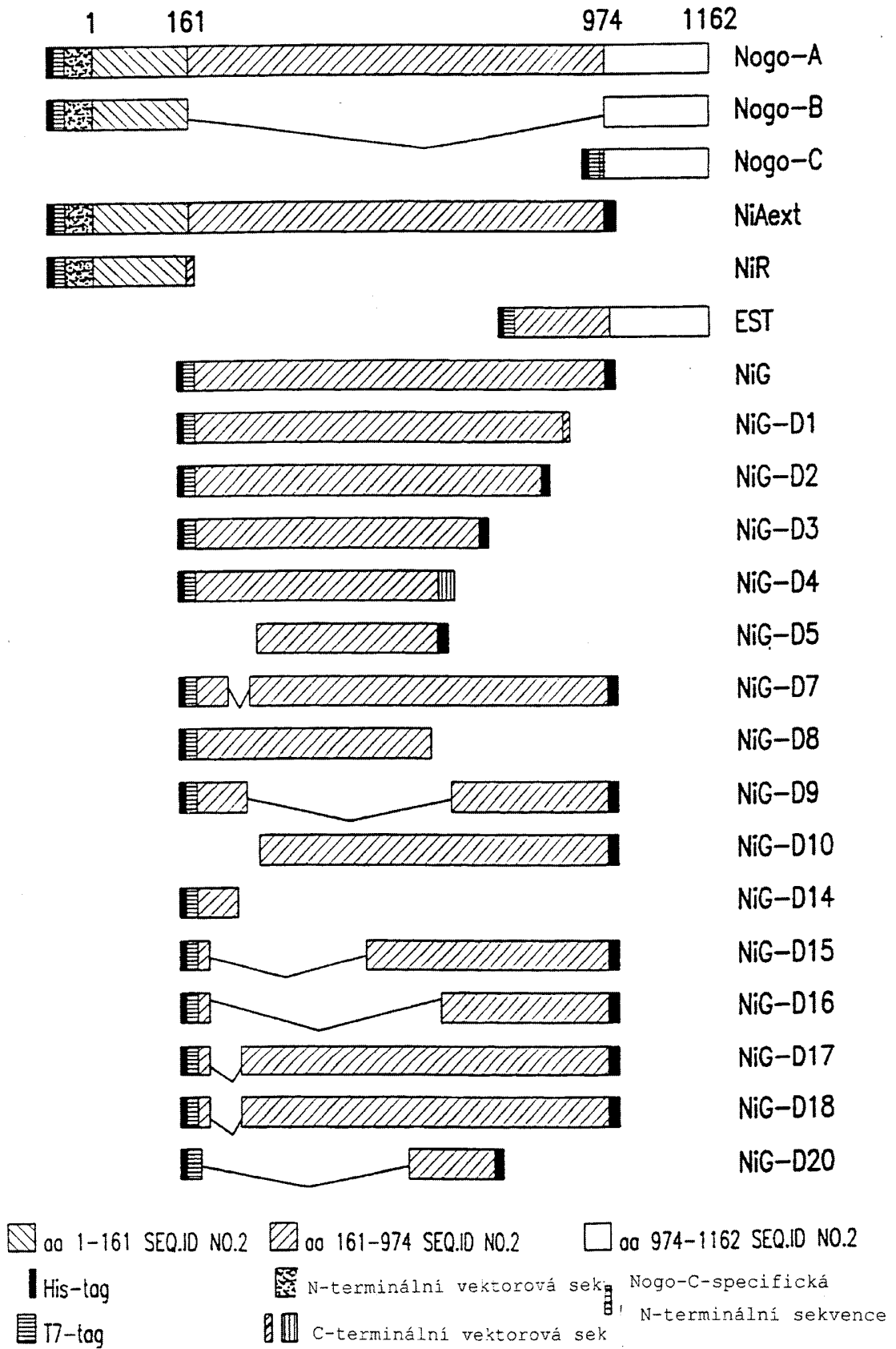
Obr. 17C



Obr. 17E



Obr. 17D



Obr. 18

Konec dokumentu