

Винахід відноситься до неврології, нейробіології і молекулярної біології. Більш конкретно, винахід відноситься до молекул і способів для лікування неврологічних захворювань, порушень і пошкоджень, таких як пошкодження спинного мозку.

Аксони і дендрити тягнуться від нейронів. Дистальний кінець довгастого аксону або нейтриту включає в себе спеціалізовану ділянку, відому як конус зростання. Конуси зростання чутливі до локальних умов середовища і направляють зростання аксонів у бік клітини-мішені нейрону. Конуси зростання відповідають на навколишні сигнали, наприклад, на адгезію поверхні, фактори зростання, нейротрансмітери і електричні поля. Конуси зростання в основному просуваються з швидкістю від одного до двох міліметрів на добу. Конус зростання досліджує ділянку попереду себе і по обидві сторони за допомогою витягнень, що класифікуються як ламелоподії і філоподії. Коли витягнення контактує з несприятливою поверхнею, воно відстороняється. Коли витягнення контактує зі сприятливою поверхнею зростання, воно продовжує довшати і направляє конус зростання в даному напрямі. Коли конус зростання досягає відповідної клітини-мішені, створюється синаптичне з'єднання.

Функція нервової клітини підлягає впливу контакту між нейронами та іншими клітинами в їх безпосередньому оточенні [Rutishauser, et al., 1988, *Physiol. Rev.* 68:819]. Дані клітини включають в себе спеціалізовані гліальні клітини, олігодендроцити в центральній нервовій системі (ЦНС), і шваннівські клітини в периферичній нервовій системі (ПНС), які укладають нейрональний аксон в мієлінову оболонку [Lemke, 1992, in *An Introduction to Molecular Neurobiology*, Z. Hall, Ed., p. 281, Sinauer].

Нейронам ЦНС властива здатність регенерувати після пошкодження, але вона придушується інгібіторними білками, присутніми в мієліні [Brittis et al., 2001, *Neuron* 30:11-14; Jones et al, 2002, *J. Neurosci.* 22:2792-2803; Grimpe et al, 2002, *J. Neurosci.* 22:3144-3160].

Охарактеризовані деякі інгібіторні білки мієліну, що знаходяться в олігодендрогліоцитах. Відомі приклади інгібіторних білків мієліну включають в себе NogoA [Chen et al., *Nature*, 2000, 403, 434-439; Grandpre et al., *Nature* 2000, 403, 439-444], асоційований з мієліном глікопротеїн (MAG) [McKerracher et al., 1994, *Neuron* 13:805-811; Mukhopadhyay et al., 1994, *Neuron* 13:757-767] і олігодендрогліоцитарний глікопротеїн (OM-gp), [Mikol et al., 1988, *J. Cell. Biol.* 106:1273-1279]. Як було показано окремо, кожний з цих білків є лігандом нейронального NgR1 [Wang et al., *Nature* 2002, 417, 941-944; Grandpre et al., *Nature* 2000, 403, 439-444; Chen et al., *Nature*, 2000, 403, 434-439; Domeniconi et al., *Neuron* 2002, опубліковане он-лайн 28 червня 2002р.].

Рецептор Nogo I (NgR1) являє собою GPI-заякорений мембранний білок, який містить 8 багатих лейцином повторів [Fournier et al., 2001, *Nature* 409:341-346]. Після взаємодії з інгібіторними білками (наприклад, NogoA, MAG і OM-gp), комплекс NgR1 передає сигнали, які приводять до колапсу конусу зростання та інгібування розростання нейриту.

Є незадоволена потреба в молекулах і способах для інгібування опосередкованого NgR1 колапсу конусу зростання і одержаного в результаті інгібування розростання нейриту.

Авторами винаходу зроблені різні відкриття, що стосуються поліпептиду, позначеного «Sp35» (позначення авторів винаходу). Альтернативні позначення Sp35 включають в себе «LINGO» і «LINGO-1». Відкриття авторів винаходу включають в себе наступне. Sp35 зв'язується з NgR1. Sp35 зв'язується сам з собою в гомотипичній взаємодії. Білок злиття Sp35-Fc індукуює або сприяє розростанню паростків гранулярних нейронів. Білок злиття Sp35-Fc сприяє виживанню нейронів в моделі пошкодження шляхом гемісекції руброспинального тракту і в моделі розтину очного нерва. Інфіковані Sp35-ретровірусом первинні клітини кори при доставці їх щурам з пошкодженням спинного мозку забезпечують підвищене виживання нейронів, посилення забарвлення тубуліну β III аксонів і підвищений вміст мієліну.

Винахід, частково оснований на даних відкриттях, відноситься до виділеної нуклеїнової кислоти, що містить нуклеотидну послідовність, що кодує поліпептид, в якому (a) поліпептид включає в себе (i) LRR-домен Sp35, (ii) основну ділянку Sp35, розташовану з C-кінця відносно LRR-домену, і (iii) імуноглобуліновий (Ig) домен Sp35, розташований з C-кінця відносно основної ділянки; і (b) поліпептид не має трансмембранного домену. LRR-Домен Sp35 може містити C-кінцевий LRR (LRRCT), N-кінцевий LRR (LRRNT) або обидва варіанти. У деяких варіантах здійснення винаходу поліпептид Sp35, що кодується, не має цитоплазматичного домену. У деяких варіантах здійснення поліпептид Sp35, що кодується, включає в себе амінокислотні залишки 34-532 SEQ ID NO: 2 і не має амінокислотних залишків 533-614.

Винахід також відноситься до нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, де поліпептид включає в себе Ig-домен Sp35 і не має LRR-домену Sp35, основної ділянки Sp35, трансмембранного домену і цитоплазматичного домену.

Винахід також відноситься до нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, де поліпептид включає в себе LRR-домен Sp35 і не має Ig-домену Sp35, основної ділянки Sp35, трансмембранного домену і цитоплазматичного домену.

Винахід також відноситься до нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид, який не має функціонального цитоплазматичного домену, але що включає в себе всі інші домени Sp35. Наприклад, поліпептид, що кодується, може включати в себе амінокислоти 1-576 SEQ ID NO: 2 (перед процесингом сигнальної послідовності).

У деяких варіантах здійснення винаходу поліпептид, що кодується, являє собою поліпептид злиття, який містить фрагмент, що не відноситься до Sp35. Фрагмент, що не відноситься до Sp35, може являти собою, наприклад, фрагмент Ig, фрагмент сироваткового альбуміну, фрагмент спрямованої дії, репортерний фрагмент, або фрагмент, що полегшує очищення. Переважний фрагмент, що не відноситься до Sp35, являє собою фрагмент Ig, наприклад, фрагмент Fc.

Нуклеотидна послідовність може бути функціонально пов'язана з послідовністю контролю експресії, наприклад, з експресуючим вектором. Винахід також відноситься до клітини хазяїна, трансформованої вектором, який експресує поліпептид Sp35 за винаходом.

Винахід також відноситься до поліпептиду Sp35, що кодується будь-якою з описаних вище нуклеїнових кислот.

Винахід також відноситься до поліпептиду Sp35, кон'югованого з полімером, наприклад, з поліалкіленгліколем, з цукровим полімером, і з поліпептидом. Переважним полімером є поліалкіленгліколь,

наприклад, поліетиленгліколь (ПЕГ). Поліпептид може кон'югуватись з 1, 2, 3 або 4 полімерами. Переважно, загальна молекулярна маса кон'югованих полімерів складає від 20000Да до 40000Да на поліпептид Sp35.

Винахід також включає в себе спосіб інгібування трансдукції сигналу, здійснюваної за допомогою NgR1. Спосіб охоплює контакт NgR1 з ефективною кількістю поліпептиду Sp35. Переважні поліпептиди для застосування за даним способом включають в себе наступне:

(a) поліпептид Sp35, де (a) поліпептид включає в себе (i) LRR-домен Sp35, (ii) основну ділянку Sp35, розташовану з С-кінця відносно LRR-домену, і (iii) імуноглобуліновий (Ig) домен Sp35, розташований з С-кінця відносно основної ділянки; і (b) поліпептид не має трансмембранного домену; і

(b) поліпептид Sp35, який включає в себе Ig-домен Sp35 і не містить LRR-домену Sp35, основної ділянки Sp35, трансмембранного домену і цитоплазматичного домену.

Винахід також відноситься до способу зниження інгібування аксонального зростання нейрону центральної нервової системи (ЦНС). Спосіб охоплює контакт даного нейрону з ефективною кількістю поліпептиду, такого як поліпептид Sp35, антитіло проти Sp35 або антигензв'язувальний фрагмент антитіла проти Sp35.

Винахід також включає в себе спосіб інгібування колапсу конусу зростання нейрону ЦНС. Спосіб охоплює контакт даного нейрону з ефективною кількістю поліпептиду, такого як поліпептид Sp35, антитіло проти Sp35 або антигензв'язувальний фрагмент антитіла проти Sp35.

Винахід також відноситься до способу лікування захворювання, порушення або пошкодження ЦНС у ссавця. Спосіб охоплює введення ссавцеві терапевтично ефективної кількості поліпептиду, такого як поліпептид Sp35, антитіло проти Sp35 або антигензв'язувальний фрагмент антитіла проти Sp35. У деяких варіантах здійснення винаходу захворювання, порушення або пошкодження ЦНС являє собою пошкодження спинного мозку. Поліпептид Sp35 може вводиться місцево. У деяких здійсненнях способу поліпептид Sp35 вперше вводиться протягом 48 годин з моменту пошкодження спинного мозку. Для місцевого введення терапевтично ефективна кількість поліпептиду переважно складає від 10мг/кг до 10мг/кг. Для системного введення терапевтично ефективна кількість поліпептиду переважно складає від 1мг/кг до 20мг/кг.

Винахід також відноситься до способу генної терапії *ex vivo* для лікування захворювання, порушення або пошкодження ЦНС у ссавця. Спосіб охоплює (a) надання культивованої клітини хазяїна, яка експресує рекомбінантний поліпептид Sp35; і (b) введення вказаної клітини хазяїна ссавцеві в ділянку захворювання, порушення або пошкодження ЦНС, наприклад, пошкодження спинного мозку. Культивована клітина хазяїна може походити з підлягаючого лікуванню ссавця. У даному способі генної терапії *ex vivo* рекомбінантний поліпептид Sp35 може являти собою повнорозмірний поліпептид Sp35.

Винахід також відноситься до способу стимуляції мієлінізації в ділянці захворювання, порушення або пошкодження ЦНС. Спосіб охоплює контакт ділянки захворювання, порушення або пошкодження ЦНС з ефективною кількістю поліпептиду Sp35, наприклад, поліпептиду, що містить LRR-домен Sp35 і не має Ig-домену Sp35, основної ділянки Sp35, трансмембранного домену і цитоплазматичного домену.

Винахід також відноситься до способу генної терапії *in vivo* для лікування захворювання, порушення або пошкодження ЦНС за допомогою генної терапії *in vivo*. Спосіб включає в себе стадії введення ссавцеві в ділянку захворювання, порушення або пошкодження, або поблизу нього вірусного вектора, що містить нуклеотидну послідовність, яка кодує поліпептид Sp35, так що поліпептид Sp35 експресується з нуклеотидної послідовності ссавця в кількості, достатній для зниження інгібування аксонального витягнення нейронів, в ділянці пошкодження або поблизу неї. Вірусний вектор, наприклад, може являти собою аденовірусний вектор, лентівірусний вектор, вектор на основі вірусу Епштейна-Барр, паповавірусний вектор, вектор на основі вірусу коров'ячої віспи і вектор на основі вірусу простого герпесу. Захворювання, порушення або пошкодження, наприклад, може являти собою пошкодження спинного мозку або пошкодження очного нерва. Вірусний вектор може вводиться, наприклад, шляхом місцевого введення, внутрішньоочного введення, парентерального введення, інтратекального введення, субдурального введення і підшкірного введення.

Винахід також відноситься до способу стимуляції виживання нейрону при І ризику його загибелі. Спосіб включає в себе контакт нейрону з ефективною кількістю поліпептиду Sp35. Поліпептид Sp35 може являти собою розчинну форму Sp35, наприклад, білок злиття Sp35-Fc. Нейрон також може знаходитись *in vitro* або *in vivo*, наприклад, в організмі ссавця з нейродегенеративним захворюванням, порушенням або пошкодженням, наприклад, з розсіяним склерозом, ALS, хворобою Гентінгтона, хворобою Альцгеймера, хворобою Паркінсона, діабетичною невропатією, інсультом, травматичними пошкодженнями головного мозку і пошкодженням спинного мозку. У деяких варіантах здійснення винаходу поліпептид Sp35 вводять посереднім чином: шляхом (a) надання культивованої клітини хазяїна, яка експресує рекомбінантний поліпептид Sp35; і шляхом (b) введення даної клітини хазяїна ссавцеві в ділянці нейронів. У деяких варіантах здійснення винаходу поліпептид вводять посереднім чином за допомогою генної терапії *in vivo*. У такому варіанті здійснення спосіб включає в себе введення в ділянку нейрону або поблизу нього вірусного вектора, що включає в себе нуклеотидну послідовність, яка кодує поліпептид Sp35, так що поліпептид Sp35 експресується з нуклеотидної послідовності в організмі ссавця в кількості, достатній для стимуляції виживання нейрону.

Термін «повнорозмірний людський поліпептид Sp35», що використовується тут, означає поліпептид, амінокислотна послідовність якого являє собою амінокислоти 34-614 SEQ ID NO: 2.

Термін «гетерологічна група», що використовується тут, означає амінокислотну послідовність, не присутню в повнорозмірному поліпептиді Sp35.

Термін «рецептор пого 1», що використовується тут, означає поліпептид, послідовність якого доступна під інвентарним номером Genbank AAG53612.

Термін «поліпептидний антагоніст Sp35», що використовується тут, означає поліпептид Sp35, який блокує, інгібує або перешкоджає біологічній активності Sp35, що зустрічається в природі.

Термін «основна ділянка Sp35», що використовується тут, означає наступний амінокислотний мотив:

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

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

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

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

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

Верхній рядок амінокислот (жирним шрифтом; SEQ ID NO: 4) є переважною послідовністю основної ділянки Sp35, з наведеними нижче варіантами, в яких показані необов'язкові заміни (SEQ ID NO: 5, 6, 7 і 8).

Термін «білок злиття Sp35», що використовується тут, означає білок злиття, який включає в себе фрагмент Sp35, злитий з гетерологічним фрагментом.

Термін «Ig-домен Sp35», що використовується тут, означає амінокислоти 433-493 SEQ ID NO: 2, при забезпеченні того, що дана послідовність може містити до п'яти індивідуальних амінокислотних вставок, делецій або консервативних амінокислотних заміни. Наступні заміни (нумерація по SEQ ID NO: 2) введені спеціально: V на M в положенні 6; S на G в положенні 294; V на A в положенні 348; і R на H в положенні 419.

Термін «LRR-домен Sp35», що використовується тут, означає домен, який містить від 10 до 14 послідовностей - багатих лейцином повторів, включаючи LRRNT і LRRCT, перераховані в таблиці 1, при забезпеченні того, що до п'яти амінокислотних вставок, делецій або консервативних амінокислотних заміни можуть відбуватись в сумарних 10-14 багатих лейцином повторях.

Термін «фрагмент Sp35», що використовується тут, означає біологічно активний фрагмент повнорозмірного поліпептиду Sp35.

Термін «поліпептид Sp35», що використовується тут, означає фрагмент Sp35 або білок злиття, який містить фрагмент Sp35.

Крім вказаних інакше випадків, всі технічні або наукові терміни, що використовуються тут, мають значення, що звичайно мається на увазі під цими термінами фахівцем в галузі, до якої відноситься винахід. У разі конфлікту для контролю буде служити дана специфікація, включаючи визначення. Всі вказані тут публікації, патенти та інші посилання включені як посилання.

Хоча способи і матеріали, схожі або еквівалентні описаним тут, можуть використовуватись у втіленні або тестуванні винаходу, переважні способи і матеріали, описані нижче. Матеріали, способи і приклади є тільки ілюстративними і не мають на увазі як такі, що обмежують. Інші характеристики і переваги винаходу будуть зрозумілі з докладного опису і з формули винаходу.

Фіг.1 являє собою нуклеотидну послідовність кДНК повнорозмірного людського Sp35 (SEQ ID NO: 1)

Фіг.2 являє собою амінокислотну послідовність повнорозмірного людського поліпептиду Sp35 (SEQ ID NO: 2).

Фіг.3 являє собою схематичну ілюстрацію доменної структури Sp35 і карти делецій для ідентифікації послідовності(-ей) Sp35, які зв'язуються з NgR1.

Фіг.4 являє собою гістограму, на якій підсумовані дані зі зв'язування SP35 з COS7-клітинами, трансфікованими експресуючим вектором, що кодує шурячий p75, або векторним контролем. Через 48 годин з клітинами інкубували AP-SP35 або AP. Пов'язаний AP виявляли з використанням хромогенного реагенту детекції AP.

Фіг.5 являє собою гістограму, підсумовуючу дані зі зв'язування AP-Omgr і AP-Nogo-66 з клітинами COS7, трансфікованими експресуючим вектором, що кодує NgR1; NgR1 і p75; NgR1, p75, і SP35, або векторним контролем. Через 48 годин з клітинами інкубували AP-Omgr, AP-Nogo-66 або AP. Пов'язаний AP виявляли з використанням хромогенного реагенту для виявлення AP.

Фіг.6 являє собою гістограму, на якій підсумовані дані зі стимуляції інгібіторної активності мієлінових інгібіторів відносно розростання нейриту *in vitro*. Довжину нейриту вимірювали на гранулярних нейронах мозочка 7-добового новонародженого щура, експресуючих DN-Sp35, повнорозмірний Sp35 або контроль, що культивуються на іммобілізованому субстраті з Omgp, мієліном і Nogo-66. Трансфіковані DN-SP35 клітини виявляли знижену реакцію на інгібіторні субстрати. Довжину нейриту обчислювали від 1000 нейронів на групу лікування в двох незалежних експериментах ($p < 0,01$).

Фіг.7 являє собою гістограму, на якій підсумовані дані з обернення інгібіторної активності мієлінових інгібіторів за рахунок SP35-FC. Довжина нейриту на гранулярних нейронах мозочка 7-добового новонародженого щура (1000 нейронів), що культивуються на іммобілізованому субстраті з Omgp, мієліном або Nogo-66, у присутності або за відсутності SP35-FC. SP35-FC знижував інгібування розростання нейритів, викликане Omgp, Nogo-66 і MAG. Довжину нейриту обчислювали від 1000 нейронів на групу лікування в двох незалежних експериментах ($P < 0,01$).

Фіг.8 являє собою графік, в якому підсумовані дані експерименту, що показує, що введений інтратекально Sp35-Fc поліпшує функціональне відновлення після дорзальної гемісекції у щура. Локомоторний коефіцієнт BBB, що вимірюється як функція часу після дорзальної гемісекції у контрольних (IgG) або оброблених Sp35-Fc щурів (8 тварин на групу). Лікування ініціювали під час пошкодження спинного мозку.

Фіг.9 являє собою графік, на якому показані коефіцієнти BBB індивідуальних тварин на четвертий тиждень в експерименті, підсумованому на Фіг.8.

Людський Sp35, що зустрічається в природі, являє собою глікозилований специфічний у відношенні ЦНС білок, що містить 614 амінокислот (Фіг.2; SEQ ID NO: 2). Людський повнорозмірний поліпептид SP35 дикого типу містить LRR-домен, що складається з 14 багатих лейцином повторів (включаючи N- і C-кінцеві частини), Ig-домен, трансмембранну ділянку і цитоплазматичний домен (Фіг.3). Цитоплазматичний домен містить канонічну ділянку фосфорилування тирозину. Крім того, білок Sp35, що зустрічається в природі, містить сигнальну послідовність, коротку основну ділянку між LRRCT і Ig-доменом і трансмембранну ділянку між Ig-доменом і цитоплазматичним доменом (Фіг.3). Людський ген Sp35 містить стартові кодони альтернативної трансляції, так що шість додаткових амінокислот, тобто MQVSKR (SEQ ID NO: 9), можуть бути присутніми або бути відсутніми на N-кінці сигнальної послідовності Sp35. У таблиці 1 перераховані Sp35-домени та інші ділянки за номерами амінокислотних залишків, на основі послідовності, показаної на Фіг.2 (SEQ ID NO: 2).

Домен або ділянка	Початковий залишок	Кінцевий залишок
Сигнальна послідовність	1	33
LRRNT	34	64
LRR	66	89
LRR	90	113
LRR	114	137
LRR	138	161
LRR	162	185
LRR	186	209
LRR	210	233
LRR	234	257
LRR	258	281
LRR	282	305
LRR	306	329
LRR	330	353
LRRCT	363	416
Основна	417	424
Ig	433	493
З'єднувальна послідовність	494	551
Трансмембранний	552	576
Цитоплазматичний	577	614

Розподіл в тканинах і експресія Sp35 під час розвитку досліджені у людей і щурів. Біологію Sp35 досліджували в експериментальній моделі на тваринах (щурах). Експресія щурячого SP35 локалізована в нейронах ЦНС і олігодендроцитах головного мозку, що визначено шляхом нозерн-блотингу та імуногістохімічного забарвлення. Рівень експресії мРНК Sp35 регулюється в процесі розвитку, з коротким піком після народження, тобто приблизно, на першу добу після народження. У моделі пошкодження шляхом розтину спинного мозку Sp35 регулюється позитивно в ділянці пошкодження, як це визначено за допомогою ОТ-ПЛР.

Авторами винаходу відкрито, що повнорозмірний Sp35 дикого типу зв'язується з NgR1. Розчинні похідні Sp35 функціонують як поліпептиди-антагоністи Sp35 шляхом зв'язування з NgR1 і блокування, інгібування або протидії його функції, перешкоджаючи таким чином опосередкованому NgR1 інгібуванню аксонального витягнення, яке звичайно має місце в нейронах ЦНС. Це переважно в ситуаціях, де аксональне витягнення або розростання нейриту необхідне в головному мозку або спинному мозку. Пошкодження спинного мозку, яке включає в себе часткове або повне роздроблення або розрив, є прикладом ситуації, коли необхідне це витягнення аксонів, але в нормі інгібується шляхом дії шляху Nogo. Приклади захворювань або порушень, в яких буде переважним аксональне витягнення і/або розростання нейритів в головному мозку, включають в себе інсульт, розсіяний склероз та інші нейродегенеративні захворювання або порушення.

У способах згідно з даним винаходом поліпептид Sp35 або блокує Sp35 антитіло (або антигензв'язувальний фрагмент антитіла) може вводиться безпосередньо у вигляді раніше утвореного поліпептиду або за допомогою вектора на основі нуклеїнової кислоти, для протидії функції NgR1 і забезпечення переважного розростання аксонів.

У деяких варіантах здійснення винаходу розчинний поліпептид-антагоніст Sp35 вводять способом лікування, який охоплює (1) трансформацію або трансфекцію клітини хазяїна, що імплантується нуклеїновою кислотою, наприклад, вектором, який експресує поліпептид Sp35; і (2) імплантацію трансформованої клітини хазяїна ссавцеві, в ділянку захворювання, порушення або пошкодження. Наприклад, трансформована клітина хазяїна може імплантуватися в ділянку пошкодження спинного мозку. У деяких варіантах здійснення винаходу клітину хазяїна, що імплантується, вилучають з ссавця, тимчасово культивують, трансформують або трансфікують виділеною нуклеїновою кислотою, кодує розчинний поліпептид Sp35, та імплантують зворотно тому ж ссавцеві, з якого її вилучили. Клітина може бути вилучена з тієї ж ділянки, куди вона імплантується, але це необов'язково. Такі здійснення, іноді названі генною терапією *ex vivo*, можуть надавати тривалу подачу поліпептиду Sp35, локалізовану в ділянці дії, протягом обмеженого періоду часу.

Винахід відноситься до олігопептидів, які можуть використовуватись як модулятори взаємодії Sp35 з NgR1 і гомотипічних взаємодій Sp35. Олігопептиди включають в себе наступний амінокислотний мотив:

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

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

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

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

Верхній рядок амінокислот (жирним; SEQ ID NO: 10) являє собою переважну послідовність, з варіантами, що містять необов'язкові заміни, показані нижче (за SEQ ID NO: 11, 12 і 13).

Різні типові поліпептиди Sp35, антитіла проти Sp35 і фрагменти антитіл, і способи і матеріали для одержання даних молекул для втілення даного винаходу описані нижче.

Білки злиття і кон'юговані поліпептиди

Деякі здійснення винаходу включають в себе застосування поліпептиду Sp35, наприклад, поліпептиду-антагоністу Sp35, в якому фрагмент Sp35 злитий з гетерологічним поліпептидним фрагментом з утворенням білка злиття Sp35. Білки злиття Sp35 можуть використовуватись для досягнення різних цілей, наприклад, для підвищення часу півжиття в сироватці, поліпшення біологічної доступності, направлення на конкретний орган або клітинний тип дії *in vivo*, поліпшення ефективності рекомбінантної експресії,

підвищеної секреції клітиною хазяїна, спрощення очищення, і більш високої авідності. В залежності від цілі(-ей), що досягається(-ються), гетерологічний фрагмент може бути інертним або біологічно активним. Також можна вибирати, чи буде він стабільно злитий з фрагментом Sp35, або ж зможе відщеплюватись *in vitro* або *in vivo*. Гетерологічні фрагменти для досягнення різних цілей відомі в даній галузі.

Як альтернатива експресії білка злиття Sp35 вибраний гетерологічний фрагмент може бути заздалегідь утворений і хімічно кон'югований з фрагментом Sp35. У більшості випадків вибраний гетерологічний фрагмент діє однаково, злитий він або кон'югований з фрагментом Sp35. Тому в наступному обговоренні гетерологічних амінокислотних послідовностей, якщо не відмічено інакше, потрібно розуміти, що гетерологічна послідовність може об'єднуватись з фрагментом Sp35 у вигляді білка злиття або хімічного кон'югату.

Фармакологічно активні поліпептиди, такі як Sp35, часто характеризуються швидким кліренсом *in vivo*, що приводить до необхідності великих доз для досягнення терапевтично ефективних концентрацій в організмі. Крім того, поліпептиди, менші, ніж приблизно 60kDa, потенційно проходять гломерулярну фільтрацію, що іноді веде до нефротоксичності. Злиття або кон'югація відносно малих поліпептидів, таких як фрагменти Sp35, може бути використане для зниження або запобігання ризику такої нефротоксичності. Відомі різні гетерологічні амінокислотні послідовності, тобто поліпептидні фрагменти або «носії» для збільшення стабільності терапевтичних поліпептидів *in vivo*, тобто їх періоду півжиття в сироватці.

Внаслідок його тривалого періоду півжиття, широкого поширення *in vivo*, відсутності ферментативної або імунологічної функції, по суті повнорозмірний людський сироватковий альбумін (HSA) або фрагмент HSA є переважним гетерологічним фрагментом. Шляхом застосування способів і матеріалів, таких як описані у [Yeh et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:1904-1908 і Syed et al., 1997, Blood 89:3243-3252], HSA може бути використаний для утворення білка злиття Sp35 або кон'югату, який виявляє фармакологічну активність за рахунок фрагменту Sp35, при цьому характеризуючись значно підвищеною, наприклад, в 10-100 разів, стабільністю *in vivo*. Переважно, С-кінець HSA злитий з N-кінцем фрагменту Sp35. Оскільки HSA являє собою в природі секретований білок, сигнальна послідовність HSA може використовуватись для досягнення секреції білка злиття Sp35 в клітинне культуральне середовище, коли білок злиття продукується в еукаріотичній експресуючій системі, наприклад, що відноситься до ссавця.

У деяких варіантах здійснення винаходу використовується поліпептид Sp35, в якому фрагмент Sp35 злитий з Fc-ділянкою, тобто С-кінцевою частиною константної ділянки важкого ланцюга Ig. Потенційні переваги злиття Sp35-Fc охоплюють розчинність, стабільність *in vivo*, і мультивалентність, наприклад, димеризацію. Fc-ділянка, що використовується, може являти собою Fc-ділянку IgA, IgD або IgG Fc (шарнір-CH2-CH3). Альтернативно, вона може являти собою Fc-ділянку IgE або IgM (шарнір-CH2-CH3-CH4). Fc-ділянка IgG є переважною, наприклад, Fc-ділянка IgG1 або Fc-ділянка IgG4. Матеріали і способи для конструювання і експресії ДНК, що кодує білки злиття з Fc, відомі в даній галузі і можуть застосовуватись для одержання білків злиття Sp35 без зайвого експериментування. Деякі варіанти здійснення винаходу відносяться до білка злиття Sp35, такого як описаний у [Caron et al., патенти США № 5428130 і 5565335].

Сигнальна послідовність являє собою полінуклеотид, який кодує амінокислотну послідовність, що ініціює транспорт білка через мембрану ендоплазматичного ретикулу. Сигнальні послідовності, які можуть бути використані для конструювання імунофузину, включають в себе сигнальні послідовності легкого ланцюга антитіла, наприклад, антитіла 14.18 [Gillies et al., 1989, J. Immunol. Meth., 125:191-202], сигнальні послідовності важкого ланцюга антитіла, наприклад, сигнальна послідовність важкого ланцюга антитіла MOPC141 [Sakano et al., 1980, Nature 286:5774]. Альтернативно, можуть бути використані інші сигнальні послідовності. [Див., наприклад, Watson, 1984, Nucleic Acids Research 12:5145]. Сигнальний пептид звичайно відщеплюється в просвіті ендоплазматичного ретикулу пептидазами сигнального пептиду. Це приводить до секреції білка-імунофузину, що містить Fc-ділянку і фрагмент Sp35.

У деяких варіантах здійснення послідовність ДНК кодує ділянку протеолітичного розщеплення між касетою секреції і фрагментом Sp35. Ділянка розщеплення надає протеолітичне розщеплення білка злиття, що кодується, таким чином, Fc-домен відділяється від білка-мішені. Відповідні ділянки протеолітичного розщеплення включають в себе амінокислотні послідовності, розпізнавані протеолітичними ферментами, такими як трипсин, плазмін, тромбін, фактор Ха або ентерокиназа К.

Касета секреції може входити до складу реплікованого експресуючого вектора. Відповідні вектори включають в себе лінійні нуклеїнові кислоти, плазмідні, фагемідні, космідні і тому подібні. Типовим експресуючим вектором є pDC, в якому транскрипція ДНК імунофузину вміщена під контроль енансера і промотора людського цитомегаловірусу. [Див., наприклад, Lo et al, 1991, Biochim. Biophys. Acta 1088:712; і Lo et al., 1998, Protein Engineering 11:495-500]. Відповідна клітина хазяїна може трансформуватись або трансфюкуватись ДНК, що кодує поліпептид Sp35, і застосовується для експресії і секреції поліпептиду Sp35. Переважні клітини хазяїна включають в себе іморталізовані гібридомні клітини, міеломні клітини, клітини 293, клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO), клітини Hela і клітини COS.

Повністю інтактні Fc-ділянки дикого типу виявляють ефektorні функції, які звичайно не є необхідними і не потрібні для білка злиття з Fc згідно з винаходом. Тому деякі ділянки зв'язування переважно видаляються з Fc-ділянки під час конструювання касети секреції. Наприклад, оскільки спільна експресія з легким ланцюгом не є необхідною, ділянку зв'язування білка, зв'язуючого важкий ланцюг, Bp [Hendershot et al., 1987, Immunol. Today 8:111-114], видаляють з CH2-домену Fc-ділянки IgE, так що дана ділянка не заважає ефективній секреції імунофузину. Схожим чином, залишки цистеїну, присутні в Fc-ділянках, які відповідають за зв'язування легкого ланцюга імуноглобуліну, потрібно видаляти або замінити іншою амінокислотою, так що дані цистеїнові залишки не заважають належній просторовій упаковці Fc-ділянки при його продукції у вигляді імунофузину. Потрібно піддавати делеції послідовності трансмембранних доменів, такі як присутні в IgM.

Переважною є Fc-ділянка IgG1. Альтернативно, Fc-ділянку інших підкласів імуноглобуліну гамма (гамма-2, гамма-3 і гамма-4) можна використати в касеті секреції. Fc-ділянка IgG1 імуноглобуліну гамма-1, що переважно використовується в касеті секреції, включає в себе шарнірну ділянку (щонайменше її частину), CH2-ділянку і CH3-ділянку. У деяких варіантах здійснення Fc-ділянка імуноглобуліну гамма-1 являє собою Fc з делецією CH2, яка включає в себе частину шарнірної ділянки і CH3-ділянку, але не CH2-

ділянку. Fc з делецією CH2 описана [Gillies et al., 1990, Hum. Antibod. Hybridomas, 1: 47]. У деяких варіантах здійснення застосовують Fc-ділянки IgA, IgD, IgE або IgM.

Білки злиття Sp35-Fc можуть конструюватись в декількох різних конфігураціях. В одній конфігурації С-кінець фрагменту Sp35 зливають безпосередньо з N-кінцем фрагменту Fc. У злегка відмінній конфігурації короткий поліпептид, наприклад, 2-10 амінокислот, вводять до складу білка злиття між N-кінцем фрагменту Sp35 і С-кінцем фрагменту Fc. Такий лінкер надає конформаційну гнучкість, що в деяких випадках може збільшувати біологічну активність. Якщо у фрагменті Fc залишається достатня частина шарнірної ділянки, білок злиття Sp35-Fc буде димеризуватись, утворюючи таким чином дивалентну молекулу. Гомогенна популяція мономерних білків злиття Fc дає моноспецифічні, бівалентні димери. Суміш двох мономерних білків злиття Fc, де кожний має свою специфічність, дає біспецифічні, бівалентні димери.

Будь-яке число перехресних лінкерів, що містять відповідні групи, здатні взаємодіяти з аміногрупою, і групи, здатні взаємодіяти з групою тіолу, може бути використано для зв'язування Sp35 з сироватковим альбуміном. Приклади відповідних лінкерів включають в себе групи, здатні взаємодіяти з аміногрупою, перехресні лінкери, які вбудовують здатний взаємодіяти з групою тіолу малеїмід, наприклад, SMCC, AMAS, BMPS, MBS, EMCS, SMPB, SMPH, KMUS, і GMBS. Інші відповідні лінкери вбудовують здатну взаємодіяти з тіолом галогенацетатну групу, наприклад, SBAP, SIA, SIAB. Лінкери, які надають захищений або незахищений тіол для взаємодії з сульфгідрильними групами з продукцією зв'язку, що відновлюється, включають в себе SPDP, SMPT, SATA і SATP. Такі реагенти комерційно доступні (наприклад, Pierce Chemicals).

Кон'югація не повинна ввести в дію N-кінець поліпептиду Sp35 або тіоловий фрагмент сироваткового альбуміну. Наприклад, білки злиття Sp35-альбумін можуть бути одержані з використанням способів генної інженерії, де фрагмент Sp35 злитий з геном сироваткового альбуміну на його N-кінці, С-кінці або на обох кінцях.

Поліпептиди Sp35 можуть бути злиті з гетерологічними пептидами для полегшення очищення фрагменту Sp35. Наприклад, гістидинова мітка може бути злита з поліпептидом Sp35 для ослаблення очищення з використанням комерційно доступних хроматографічних середовищ.

У деяких здійсненнях винаходу конструкція злиття Sp35 використовується для посилення продукції фрагменту Sp35 в бактеріях. У таких конструкціях бактеріальний білок, звичайно експресований і/або секретований на високому рівні, використовується як N-кінцевий партнер злиття поліпептиду Sp35. [Див., наприклад, Smith et al., 1988 Gene 67:31; Hopp et al., 1988, Biotechnology 6:1204; La Vallie et al., 1993, Biotechnology 11:187].

У деяких варіантах здійснення винаходу конструкція злиття включає в себе фрагмент Sp35 і другий зв'язувальний людський NgR1 фрагмент, наприклад, фрагмент глікопротеїну мієліну олігодендрогліоцитів (OMgr), фрагмент асоційованого з мієліном глікопротеїну (MAG) або фрагмент Nogo66. Переваги таких конструкцій включають в себе посилену спорідненість зв'язування NgR1.

Повнорозмірна амінокислотна послідовність OMgr відома в даній галузі (інвентарний номер Genbank P23515). Конкретні приклади білків злиття Sp35-OMgr включають наступне:

Sp35 (а.к. 34-532)+Fc IgG1+OMgr (амінокислотні залишки 25-400); і

Sp35 (а.к. 34-532)+HSA+OMgr (амінокислотні залишки 25-400).

Повнорозмірна амінокислотна послідовність MAG відома в даній галузі (інвентарний номер Genbank A61084). Конкретні приклади білків злиття Sp35-MAG включають наступне:

Sp35 (а.к. 34-532)+Fc IgG1+MAG (амінокислотні залишки 12-500); і

Sp35 (а.к. 34-532)+HSA+MAG (амінокислотні залишки 12-500).

Повнорозмірна амінокислотна послідовність Nogo відома в даній галузі (інвентарний номер Genbank NogoA AY102279). Конкретні приклади білків злиття Sp35-Nogo включають в себе наступне:

Sp35 (а.к. 34-532)+Fc IgG1+Nogo66 (амінокислотні залишки NogoA 1056-1122);

Sp35 (а.к. 34-532)+HSA+Nogo66 (амінокислотні залишки NogoA 1056-1122);

Sp35 (а.к. 34-532)+Fc IgG1+аміно-Nogo (амінокислотні залишки NogoA 1-949); і

Sp35 (а.к. 34-532)+HSA+аміно-Nogo (амінокислотні залишки NogoA 1-949).

Шляхом злиття фрагменту Sp35 з N- і С-кінцями відповідного для злиття партнера можуть бути одержані бівалентні або тетравалентні форми поліпептиду Sp35. Наприклад, група Sp35 може бути злита з N- і С-кінцями Ig-фрагменту, з продукцією бівалентного мономерного поліпептиду, що містить два фрагменти Sp35. Після димеризації двох з цих мономерів за рахунок фрагменту Ig одержують тетравалентну форму білка Sp35. Такі мультивалентні форми можуть бути одержані для досягнення підвищеної спорідненості зв'язування з мішенню. Мультивалентні форми Sp35 також можуть бути одержані шляхом розміщення фрагментів Sp35 в тандемі, з утворенням конкатамерів, які можуть бути використані окремо або в злитті з партнерами злиття, такими як Ig або HSA.

Кон'юговані полімери (які відрізняються від поліпептидів)

Деякі варіанти здійснення включають в себе поліпептид Sp35, в якому один або декілька полімерів кон'юговані (ковалентно пов'язані) з поліпептидом Sp35. Приклади полімерів, відповідних для такої кон'югації, включають в себе поліпептиди (що обговорюються вище), сахаридні полімери і ланцюги поліалкіленгліколей. Звичайно, але не обов'язково, полімер кон'югують з поліпептидом Sp35 з метою поліпшення однієї або декількох з наступних характеристик: розчинність, стабільність або біодоступність.

Переважаючим класом полімеру для кон'югування з поліпептидом Sp35 є поліалкіленгліколь. Поліетиленгліколь (ПЕГ) є особливо переважним. Фрагменти ПЕГ, наприклад, 1, 2, 3, 4 або 5 полімерів ПЕГ, можуть бути кон'юговані з кожним поліпептидом Sp35 для підвищення часу півжиття в сироватці у порівнянні з окремим поліпептидом Sp35. Фрагменти ПЕГ не є антигенними і, по суті, інертні біологічно. Фрагменти ПЕГ, що використовуються при втіленні винаходу, можуть бути розгалуженими або нерозгалуженими.

Число фрагментів ПЕГ, приєднаних до поліпептиду Sp35, і молекулярна маса індивідуальних ланцюгів ПЕГ може варіювати. Загалом, чим вище молекулярна маса полімеру, тим менше полімерних ланцюгів приєднують до поліпептиду. Переважно, щоб загальна маса полімеру, приєданого до поліпептиду Sp35, складала від 20кДа до 40кДа. Таким чином, якщо приєднується один полімерний ланцюг, переважна

молекулярна маса ланцюга становить 20-40кДа. Якщо приєднані два ланцюги, переважна молекулярна маса кожного ланцюга становить 10-20кДа. Якщо приєднані три ланцюги, переважна молекулярна маса становить 7-14кДа.

Полімер, наприклад, ПЕГ, може бути приєднаний до поліпептиду Sp35 за допомогою будь-якої відповідної експонованої реакційноздатної групи поліпептиду. Експонована(-і) реакційноздатна(-і) група(-и) може(можуть) являти собою, наприклад, N-кінцеву аміногрупу або епсилон-аміногрупу внутрішнього залишку лізину або обидві такі групи. Активованій полімер може взаємодіяти і ковалентно зв'язуватись з будь-якою вільною аміногрупою поліпептиду Sp35. Вільні карбоксильні групи, відповідним чином активовані карбонільні групи, гідроксил, гуаніділ, імідазол, окислені вуглеводні фрагменти і меркаптогрупи Sp35 (якщо вони доступні) також можуть використовуватись як реакційноздатні групи для приєднання полімеру.

Переважно, в реакції кон'югації використовується приблизно 1,0-10моль активованого полімеру на моль поліпептиду, в залежності від концентрації поліпептиду. Звичайно вибране відношення являє собою баланс між максималізацією взаємодії при мінімізації побічних реакцій (часто неспецифічних), які можуть ослаблювати необхідну фармакологічну активність фрагменту Sp35. Переважно, щоб зберігалось щонайменше 50% біологічної активності (що демонструється, наприклад, в будь-якому з описаних тут і відомих в даній галузі аналізів) поліпептиду Sp35, і більш переважно, якщо зберігається приблизно 100% активності.

Полімер може бути кон'югований з поліпептидом Sp35 з використанням загальноприйнятої хімії. Наприклад, фрагмент поліалкіленгліколю може бути приєднаний до епсилон-аміногрупи лізину поліпептиду Sp35. Зв'язування з бічним ланцюгом лізину можна провести з використанням активного складного ефіру N-гідроксилсукциніміду (NHS) у вигляді сукцинімідилсукцинату ПЕГ (СС-ПЕГ) і сукцинімідилпропіонату ПЕГ (СПА-ПЕГ). Відповідні поліалкіленгліколеві фрагменти включають в себе, наприклад, карбоксиметил-NHS, норлейцин-NHS, SC-PEG, тресилат, альдегід, епоксид, карбонілімідазол і PNP-карбонат. Дані реагенти комерційно доступні. Додаткові взаємодіючі з аміногрупою лінкери ПЕГ можуть бути заміщені сукцинімідильним фрагментом. Вони включають в себе, наприклад, ізотіоціанати, нітрофенілкарбонати, епоксиди і бензотриазолкарбонати. Переважно, вибирають умови для максимізації вибіркової і виходу взаємодії. Така оптимізація умов взаємодії доступна звичайному фахівцю в даній галузі.

Модифікацію ПЕГ можна провести в будь-якій з реакцій модифікації ПЕГ, відомих в даній галузі. [Див., наприклад, Focus on Growth Factors, 3: 4-10, 1992; опубліковані заявки на видачу Європейського патенту EP 0154316 і EP 0401384]. Модифікація ПЕГ може проводитись з використанням реакції ацилювання або реакції алкілювання з реакційноздатною молекулою поліетиленгліколю (або аналогічним реакційноздатним водорозчинним полімером).

Модифікація ПЕГ шляхом ацилювання в основному охоплює взаємодію активного складного ефірного похідного поліетиленгліколю. Будь-яка реакційноздатна молекула ПЕГ може використовуватись при модифікації ПЕГ. Переважний активований складний ефір ПЕГ естерифікується до N-гідроксисукциніміду (NHS). Термін «ацилювання», що використовується тут, включає без обмеження наступні типи зв'язків між терапевтичним білком і водорозчинним полімером, таким як ПЕГ: амідний, карбаматний, уретановий і тому подібні. [Див., Biosconjugate Chem. 5: 133-140, 1994]. Потрібно вибирати параметри взаємодії, щоб уникнути умов температури, розчинників і рН, які будуть ушкоджувати або інактивувати поліпептид Sp35.

Переважно, з'єднувальний зв'язок є амідним. Переважно, щонайменше, 95% одержаного внаслідок продукту модифіковано одним, двома або трьома фрагментами ПЕГ. Однак, можуть утворюватись деякі види молекул з більш високою мірою модифікації ПЕГ в кількостях, що залежать від конкретних умов взаємодії, що використовуються. Очищені модифіковані ПЕГ види молекул можуть бути відділені від суміші, зокрема, від видів молекул, які не прореагували, загальноприйнятими способами очищення, включаючи, наприклад, діаліз, висолювання, ультрафільтрацію, іонообмінну хроматографію, хроматографію шляхом гель-фільтрації і електрофорез.

Модифікація ПЕГ шляхом алкілювання в основному включає в себе взаємодію кінцевого альдегідного похідного ПЕГ з Sp35 у присутності відновлювального засобу. Крім того, можна маніпулювати умови взаємодії для переважної модифікації ПЕГ тільки на N-кінцевій аміногрупі Sp35 (тобто, модифікованим одним ПЕГ білком). У випадку модифікації одним ПЕГ або декількома ПЕГ фрагменти ПЕГ переважно приєднуються до білка за допомогою групи -CH₂-NH-. З конкретним посиланням на групу -CH₂-, даний тип зв'язку відомий як «алкільний» зв'язок.

У дериватизації шляхом відновного алкілювання для одержання модифікованого однією молекулою ПЕГ продукту використовується різна реакційна здатність різних типів первинних аміногруп (лізинових у порівнянні з N-кінцевою), доступних для дериватизації. Взаємодію проводять при рН, яка забезпечує перевагу відмінності за рK_a між епсилон-аміногрупами залишків лізину і N-кінцевої аміногрупи білка. За рахунок такої селективної дериватизації контролюється приєднання водорозчинного полімеру, який містить реакційноздатну групу, таку як альдегід, до білка: кон'югація з полімером має місце переважно з N-кінця білка, і не відбувається значної модифікації інших реакційноздатних груп, таких як аміногрупи бічних ланцюгів лізину.

Полімерні молекули, що використовуються в підходах ацилювання і алкілювання, вибирають з водорозчинних полімерів. Вибрані полімери потрібно модифікувати так, що вони будуть мати одиничну реакційноздатну групу, таку як активний складний ефір для ацилювання або альдегід для алкілювання, переважно, так що міра полімеризації може контролюватись, відповідно до даних способів. Типовий реакційноздатний альдегід ПЕГ являє собою пропіоновий альдегід поліетиленгліколю, який стабільний у воді, або його моно-C₁-C₁₀-алкокси- або арилокси-похідні [див., патент США №5252714]. Полімер може бути розгалужений або нерозгалужений. Для реакції ацилювання вибраний(-і) полімер(-и) повинен(-ні) мати єдину реакційноздатну складноефірну групу. Для відновного алкілювання вибраний(-і) полімер(-и) повинен(-ні) мати єдину реакційноздатну альдегідну групу. Загалом, водорозчинні полімери не вибирають із глікозильних залишків, що зустрічаються в природі, оскільки їх зручніше одержати в системах рекомбінантної експресії ссавців.

Спосіб одержання модифікованого ПЕГ Sp35, в основному, охоплює стадії (а) взаємодії білка або поліпептиду Sp35 з поліетиленгліколем (таким як реакційноздатний складний ефір або альдегідне похідне

ПЕГ) в умовах, в яких молекула стає приєднаною до однієї або декількох груп ПЕГ, і (b) одержання продукту(-ів) взаємодії. Загалом, оптимальні умови взаємодії для реакцій ацилювання визначаються від випадку до випадку на основі відомих параметрів і необхідного результату. Наприклад, чим більше відношення ПЕГ:білок, тим більше процентна частка модифікованого ПЕГ продукту.

Відновне алкілювання з продукцією, по суті, однорідної популяції молекул монополімер/3p35, в основному, охоплює стадії: (a) взаємодія білка Sp35 або поліпептиду з реакційноздатною молекулою ПЕГ в умовах відновного алкілювання, при рН, відповідному для реп-піт вибіркової модифікації N-кінцевої аміногрупи Sp35; і (b) одержання продукту(-ів) взаємодії.

Для одержання, по суті, однорідної популяції молекул монополімер/Sp35, умови реакції відновного алкілювання є тими, які дозволяють селективне приєднання водорозчинного полімерного фрагменту до N-кінця Sp35. Такі умови взаємодії, в основному, забезпечують відмінність pK_a між аміногрупами бічного ланцюга лізину і N-кінцевої аміногрупи. Для цілей даного винаходу переважний рН знаходиться в інтервалі 3-9, переважно, 3-6.

Поліпептиди Sp35 можуть включати в себе мітку, наприклад, фрагмент, який може згодом вивільнятися шляхом протеолізу. Таким чином, лізиновий фрагмент може вибірково модифікуватися спочатку шляхом взаємодії з His-міткою, модифікованою низькомолекулярним лінкером, таким як реагент Траута (Pierce), який буде реагувати з лізином і N-кінцем, і потім шляхом вивільнення His-мітки. Після цього поліпептид буде містити вільну SH-групу, яка буде вибірково модифікуватися ПЕГ, що містить здібну до взаємодії з тіолом групу, таку як maleimідна група, вінілсульфонова група, галогенацетатна група або вільний або захищений SH.

Реагент Траута може замінюватись будь-яким лінкером, який буде створювати специфічну ділянку для приєднання ПЕГ. Наприклад, реагент Траута може замінюватись SPDP, SMPT, SATA або SATP (Pierce). Схожим чином можна проводити взаємодію білка зі здатним до взаємодії з аміногрупою лінкером, який вбудовує maleimід (наприклад, SMCC, AMAS, BMPS, MBS, EMCS, SMPB, SMPH, KMUS або GMBBS), галогенацетатну групу (SBAP, SIA, SIAB) або вінілсульфову групу, і проводити взаємодію одержаного внаслідок продукту з ПЕГ, який містить вільну SH.

У деяких варіантах здійснення фрагмент поліалкіленгліколю приєднують до групи цистеїну поліпептиду Sp35. Приєднання може здійснюватись, наприклад, з використанням maleimідної групи, вінілсульфонової групи, галогенацетатної групи або тіольної групи.

Поліпептид Sp35 необов'язково кон'югують з фрагментом поліетиленгліколю за допомогою лабільного зв'язку. Лабільний зв'язок можна відщеплювати, наприклад, шляхом біохімічного гідролізу, протеолізу або розщеплення сульфгідрильного зв'язку. Наприклад, зв'язок може відщеплюватись в умовах *in vivo* (фізіологічних).

Взаємодії можуть проводитись будь-яким відповідним способом, що використовується для взаємодії біологічно активних матеріалів з інертними полімерами, переважно, при рН, що приблизно дорівнює 5-8, наприклад, рН 5, 6, 7 або 8, якщо реакційноздатні групи знаходяться на альфа-аміногрупі з N-кінця. Загалом, в способі використовується одержання активованого полімеру і подальша взаємодія білка з активованим полімером для продукції розчинного білка, відповідного для одержання препарату.

Вектори

Винахід відноситься до векторів, що включають в себе нуклеїнову кислоту, що кодує поліпептид Sp35. Вибір вектора і послідовностей контролю експресії, з якими функціонально пов'язані нуклеїнові кислоти згідно з винаходом, залежить від необхідних функціональних властивостей, наприклад, експресії білка і підлягаючої трансформації клітини хазяїна.

Елементи контролю експресії, які можуть використовуватись для регуляції експресії функціонально пов'язаної кодуючої послідовності, відомі в даній галузі. Необмежувальні приклади включають в себе промотори, що індукуються, конститутивні промотори, сигнали секреції та інші регуляторні елементи. Коли використовується промотор, що індукуються, він може контролюватись, наприклад, шляхом зміни статусу поживних речовин або зміни температури в середовищі клітини хазяїна.

Вектор може включати в себе прокаріотичний реплікон, тобто, послідовність ДНК, що володіє здатністю направляти автономну реплікацію і підтримувати молекулу рекомбінантної ДНК в бактеріальній клітині хазяїна поза хромосомою. Такі реплікони добре відомі в даній галузі. Крім того, вектори, що містять прокаріотичний реплікон, також можуть включати в себе ген, експресія якого забезпечує детектований маркер, такий як стійкість до лікарського засобу. Приклади генів бактеріальної стійкості до лікарських засобів включають в себе гени, що забезпечують стійкість до ампіциліну або тетрацикліну.

Вектори, які включають в себе прокаріотичний реплікон, також можуть включати в себе прокаріотичний промотор або промотор, що відноситься до бактеріофагу, для управління експресією кодуючих генних послідовностей в бактеріальній клітині хазяїна. Промоторні послідовності, сумісні з бактеріальними хазяїнами, звичайно надаються в плазмідних векторах, що містять зручні ділянки рестрикції для вбудовування сегмента ДНК, що підлягає експресії. Прикладами таких плазмідних векторів є pUC8, pUC9, pBR322 і pBR329 (BioRad), pPL і pKK223 (Pharmacia). Будь-який відповідний прокаріотичний хазяїн може використовуватись для експресії молекули рекомбінантної ДНК, що кодує білок за винаходом.

Вектори для експресії в еукаріотичних клітинах відомі в даній галузі і комерційно доступні. Звичайно такі вектори містять відповідні ділянки рестрикції для вбудовування необхідного сегмента ДНК. Типові вектори включають в себе pSVL і pKSV-10 (Pharmacia), pBPV-1, pML2d (International Biotechnologies), pTDT1 (ATCC 31255), ретровірусний експресуючий вектор pMIG, аденовірусний човниковий вектор pDC315 і вектори AAV.

Вектори для експресії в еукаріотичних клітинах можуть містити маркер селекції, наприклад, гени стійкості до лікарських засобів. Прикладом такого гена є ген неоміцинфосфотрансферази (neo) [Southern et al., 1982, J. Mol. Anal. Genet. 1:327-341].

Для експресії антитіл або фрагментів антитіл ДНК, що кодує часткові або повнорозмірні легкі і важкі ланцюги, вбудовують в експресуючі вектори, такі як плазміди, ретровіруси, косміди, YAC, епісоми, що походять з EBV, і тому подібне. Експресуючий вектор і послідовності контролю експресії вибирають так, що вони сумісні з клітиною хазяїна, що використовується для експресії. Ген легкого ланцюга антитіла і ген важкого ланцюга антитіла можуть вбудовуватись в окремих векторах. У деяких здійсненнях обидва гени

вбудовують в один і той же експресуючий вектор.

Придатним вектором є той, який кодує функціонально повноцінну послідовність людського імуноглобуліну C_H або C_L . Переважно, ділянки рестрикції конструюють так, що будь-яка послідовність V_H або V_L може легко вбудовуватись і експресуватись. У таких векторах звичайно відбувається сплайсинг між донорною ділянкою сплайсингу у вбудованій J-ділянці і акцепторною ділянкою сплайсингу, попередньою людській C-ділянці, і також в ділянках сплайсингу, які зустрічаються всередині людських C_H -екзонів. Поліаденілування і термінація транскрипції відбувається в нативних хромосомних ділянках нижче кодуючої ділянки. Рекombінантний експресуючий вектор може також кодувати сигнальний пептид, який полегшує секрецію ланцюга антитіла з клітини хазяїна.

Переважають регуляторні послідовності для експресії в клітині хазяїна-ссавця включають в себе вірусні елементи, які направляють високі рівні експресії білка в клітинах ссавців, наприклад, промотори і енхансери, що походять з ретровірусних LTR, з цитомегаловірусу (CMV) (наприклад, промотор/енхансер CMV), з мавпячого вірусу 40 (SV40) (наприклад, промотор/енхансер SV40), з аденовірусу (наприклад, великий пізній промотор аденовірусу (AdMLP)), з вірусу полііоми, і сильні промотори ссавців, такі як промотор нативного імуноглобуліну і актину. Для подальшого опису вірусних регуляторних елементів і їх послідовностей [див., наприклад, Stinski, патент США №5168062; Bell, патент США №4510245; i Schaffner, патент США №4968615].

Рекombінантні експресуючі вектори можуть нести послідовності, які регулюють реплікацію вектора в клітинах хазяїна (наприклад, точки початку реплікації) і підлягаючі селекції маркерні гени. Підлягаючий селекції маркерний ген сприяє селекції клітин хазяїна, в які був введений вектор [див., наприклад, Axel, патенти США № 4399216; 4634665 і 5179017]. Наприклад, звичайно підлягаючий селекції маркерний ген надає стійкість клітині хазяїна, в яку був [введений вектор, до лікарських засобів, таких як G418, гідроміцин або метотрексат. Переважні вибіркові маркерні гени включають в себе ген дигідрофолатредуктази (DHFR) (для застосування в dhfr⁻ клітинах хазяїна з селекцією/ампліфікацією, основою на метотрексаті) і ген neo (для селекції, основаної на G418).

Молекули нуклеїнової кислоти, що кодують поліпептиди Sp35 і антитіла проти Sp35, і вектори, що містять дані молекули нуклеїнової кислоти, можуть застосовуватись для трансформації відповідної клітини хазяїна. Трансформація може здійснюватись будь-яким відповідним способом. Способи введення екзогенної ДНК в клітини ссавців добре відомі в даній галузі і включають в себе опосередковану декстраном трансфекцію, преципітацію фосфатом кальцію, опосередковану полібреном трансфекцію, злиття протопласту, електропорацію, інкапсуляцію полінуклеотиду(-ів) в ліпосоми, і пряму мікроін'єкцію ДНК в ядра. Крім того, молекули нуклеїнової кислоти можуть вводитись в клітини ссавців вірусними векторами.

Трансформація клітин хазяїна може виконуватись загальноприйнятими способами, відповідними для вектора, що використовується, і клітини хазяїна. Для трансформації прокаріотичних клітин хазяїна можуть застосовуватись електропорація і способи обробки сіллю [Cohen et al., 1972, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2110-2114]. Для трансформації клітин хребетних може використовуватись електропорація, способи обробки солями і катіонними ліпідами. [Див., наприклад, Graham et al., 1973, Virology 52:456-467; Wigler et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:1373-1376].

Клітинні лінії ссавців, доступні як хазяїни для експресії, відомі в даній галузі і включають в себе багато імуорталізованих клітинних ліній з American Type Culture Collection (ATCC). Вони включають в себе, серед інших, клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO), NSO, клітини SP2, клітини HeLa, клітини нирки сирійського хом'ячка (BHK), клітини нирки мавпи (COS), клітини людської гепатоцелюлярної карциноми (наприклад, Hep G2), клітини A549 і деяку кількість інших клітинних ліній.

Експресія поліпептидів з продукуючих клітинних ліній може бути посилена з використанням відомих способів. Наприклад, система глутамінсинтази (GS) звичайно використовується для посилення експресії в конкретних умовах. [Див., наприклад, Європейський патент № 0216846, 0256055 і 0323997 і заявку на видачу Європейського патенту №89303964.4].

Клітини хазяїна

Клітини хазяїна можуть бути прокаріотичними або еукаріотичними. Переважні еукаріотичні клітини хазяїна включають в себе як необмежувальні приклади клітини дріжджів і ссавців, наприклад, клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO) (інвентарний № ATCC CCL61), клітини ембріона миші Swiss з NIH NIH-3T3 (інвентарний № ATCC CRL1658), і клітини нирки сирійського хом'ячка (BHK). Інші відповідні еукаріотичні клітини хазяїна включають в себе клітини комах і рослинні клітини. Типовими прокаріотичними клітинами хазяїна є E. coli і Streptomyces.

Препарати

Композиції, що містять поліпептиди Sp35, антитіла проти Sp35, або антигензв'язувальні фрагменти антитіл проти Sp35 можуть містити відповідні фармацевтично прийнятні носії. Наприклад, вони можуть містити наповнювачі і/або допоміжні речовини, які полегшують переробку активних сполук в препарати, створені для доставки в ділянку дії. Відповідні препарати для парентерального введення включають в себе водні розчини активних сполук у водорозчинній формі, наприклад, розчини водорозчинних солей. Крім того, можуть вводитись суспензії активних сполук у вигляді відповідних масляних суспензій для ін'єкції. Відповідні ліпофільні розчинники або носії включають в себе жирні олії, наприклад, кунжутну олію, або синтетичні складні ефіри жирних кислот, наприклад, етилолеат або тригліцериди. Водні суспензії для ін'єкцій можуть містити речовини, які підвищують в'язкість суспензії, і включають в себе, наприклад, карбоксиметилцелюлозу натрію, сорбіт і декстран. Необов'язково, суспензія може також містити стабілізатори. Ліпосоми також можуть використовуватись для інкапсуляції молекул за винаходом для доставки в клітини або інтерстиціальні простори. Типові фармацевтично прийнятні носії являють собою фізіологічно сумісні розчинники, дисперсійні середовища, покриття, антибактеріальні і протигрибкові засоби, ізотонічні і уповільнюючі всмоктування засоби, воду, сольовий розчин, фосфатно-сольовий буфер, декстрозу, гліцерин, етанол і тому подібне. У деяких варіантах здійснення композиція включає в себе ізотонічні засоби, наприклад, цукор, поліспирти, такий як манніт, сорбіт або хлорид натрію. У деяких варіантах здійснення композиції включають в себе фармацевтично прийнятні речовини, такі як зволожувальні засоби, або малі кількості додаткових речовин, таких як змочувальні або емульгуючі засоби,

консерванти або буфери, які посилюють час зберігання або ефективність активних інгредієнтів.

Композиції за винаходом можуть бути в різних формах, включаючи, наприклад, ріди (наприклад, розчини для ін'єкцій та інфузій), дисперсії, суспензії, напівтверді і тверді дозовані форми. Переважна форма залежить від способу введення і терапевтичних застосувань.

Композиція може бути одержана у вигляді розчину, мікроемульсії, дисперсії, ліпосоми, або іншої впорядкованої структури, придатної для високої концентрації лікарського засобу. Стерильні ін'єктовані розчини можуть бути одержані шляхом введення активного інгредієнту в необхідній кількості у відповідному розчині з одним інгредієнтом або комбінацією інгредієнтів, перерахованих вище, як це потрібно, з подальшою стерилізацією фільтруванням. Загалом, дисперсії одержують шляхом включення активного інгредієнта до складу стерильного носія, який містить основне середовище дисперсії та інші необхідні інгредієнти з перерахованих вище. У випадку стерильних порошків для одержання стерильних розчинів для ін'єкції переважні способи одержання являють собою сушіння у вакуумі і сушіння виморожуванням, з одержанням внаслідок порошку активного інгредієнту і будь-якого додаткового необхідного інгредієнту із заздалегідь стерилізованого фільтруванням розчину. Належна текучість розчину може підтримуватись, наприклад, застосуванням такого покриття, як лецитином, підтримуванням необхідного розміру частинок у випадку дисперсії і застосуванням поверхнево-активних речовин. Тривале всмоктування ін'єктованих композицій може проводитись шляхом введення в композицію засобу, який уповільнює всмоктування, наприклад, солей моностеарату і желатину.

Активний інгредієнт можна вмістити в препарат або пристрій з вивільненням, що контролюється. Приклади таких препаратів і пристроїв включають в себе імплантати, трансдермальні пластири і системи доставки за допомогою мікрокапсул. Можуть використовуватись деградуючі в біологічних умовах, біологічно сумісні полімери, наприклад, етиленвінілацетат, поліангідриди, полігліколева кислота, колаген, поліортоєфіри і полімолочна кислота. Способи одержання таких препаратів і пристроїв відомі в даній галузі. [Див., наприклад, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978].

Препарати-депо для ін'єкцій можуть бути одержані шляхом утворення мікроінкапсульованих матриксів лікарського засобу в деградуючих в біологічних умовах полімерах, таких як полілактид-полігліколід. В залежності від відношення лікарський засіб-полімер і природи полімеру, що використовується, швидкість вивільнення лікарського засобу може контролюватись. Інші типові деградуючі в біологічних умовах являють собою поліортоєфіри і поліангідриди. Препарати-депо для ін'єкцій також можуть бути одержані шляхом захоплення лікарського засобу в ліпосоми або мікроемульсії.

Додаткові активні сполуки можуть включатись до складу композицій. У деяких варіантах здійснення поліпептид Sp35, антитіло проти Sp35 або його фрагмент вводиться спільно з антитілом проти NgR1 або з його антигензв'язувальними фрагментами, або з розчинними поліпептидами NgR1 або з білками злиття з NgR1.

Режими дозування можуть настраюватись для забезпечення оптимальної необхідної відповіді. Наприклад, може вводитись єдиний болюс, декілька окремих доз можуть вводитись з плином часу, або доза може пропорційно знижуватись або підвищуватись, за вказівками необхідності терапевтичної ситуації. Переважно складати парентеральні композиції в одиничних дозованих формах для простоти введення і однорідності дозування. [Див., наприклад, Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., Easton, PA 1980)].

У доповнення до активної речовини рідка дозована форма може містити інертні інгредієнти, такі як вода, етиловий спирт, етилкарбонат, етилацетат, бензиловий спирт, бензилбензоат, пропіл енгліколь, 1,3-бутиленгліколь, диметилформамід, олії, гліцерин, тетрагідрофуриловий спирт, поліетиленгліколи і сорбітанові ефіри жирних кислот. Генна терапія Поліпептид Sp35 може продукуватись у ссавці *in vivo*, наприклад, у пацієнта-людини, з використанням підходу генної терапії для лікування захворювання ЦНС, порушення або пошкодження, при якому буде терапевтично переважним зниження інгібування витягнення аксонів. Це включає в себе введення відповідної кодуючої поліпептид Sp35 нуклеїнової кислоти, функціонально пов'язаної з відповідними послідовностями контролю експресії. Переважно, дані послідовності включені у вірусний вектор. Відповідні для такої генної терапії вірусні вектори включають в себе аденовірусні вектори, лентивірусні вектори, бакуловірусні вектори, вектори на основі вірусу Епштейна-Барр, паповавірусні вектори, вектори на основі вірусу коров'ячої віспи, вектори на основі вірусу простого герпесу і вектори на основі аденоасоційованого вірусу (AAV). Вірусні вектори можуть бути вірусними векторами, дефіцитними за реплікацію. Переважний аденовірусний вектор має делецію в своєму гені E1 або гені E3. При використанні аденовірусного вектора ссавця переважно не піддають впливу нуклеїнової кислоти, що кодує ген маркера селекції.

Приклади

Винахід далі ілюструється наступними експериментальними прикладами. Приклади надаються тільки для ілюстративних цілей, і жодним чином не призначені для обмеження об'єму або змісту винаходу.

Приклад 1: Профіль експресії Sp35

Експресію Sp35 в тканинах людини оцінювали шляхом нозерн-блот-аналізу. Численні блоти тканин, що містять 12 основних тканин людини або 14 тканин людської ЦНС, гібридизували протягом ночі при 68°C з міченим P³² зондом на Sp35 (нуклеотиди 150-450 послідовності кДНК Sp35). Блоти промивали 3 рази 2x SSC, 0,5% SDS, потім 3 рази 0,5xSSC, 0,1% SDS. Потім блот експонували на рентгенівську плівку, і візуалізували рівень мПНК авторадіографією.

Sp35 був високо експресований в головному мозку людини, але був відсутній в серці, скелетному м'язі, товстому кишечнику, тимусі, селезінці, нирці, печінці, тонкому кишечнику, плаценті, легені і в лейкоцитах периферичної крові. Sp35 експресувався у всіх тканинах головного мозку, що тестуються, включаючи тканини, виділені з передньої кори, задньої кори, енторинальної ділянки кори, гіпокампу, нюхової луковичі, смугастого тіла, таламусу, мозочку, середнього мозку, моста, довгастого мозку і спинного мозку. Для Sp35 спостерігався градієнт генної експресії по ростральній/спинномозковій осі при найвищих рівнях в корі мозку і найменших в спинному мозку.

Імуногістохімічне (IHC) забарвлення використали для визначення того, чи експресується Sp35 в

конкретних клітинах головного мозку. Препарати головного мозку щура, фіксовані в 4% параформальдегіді, зрізи спинного мозку або первинні культури гранулярних нейронів інкубували з первинними антитілами проти Sp35, як указано, з подальшим застосуванням вторинних антитіл, кон'югованих з Alexa 480 або 590 (Molecular Probes Inc.). Потім зрізи встановлювали в Vectashield і візуалізували шляхом флуоресцентної мікроскопії. Специфічні антитіла проти Sp35, що використовуються для ІНС, одержували з бібліотеки фагового дисплея Fab з використанням технології MorPhosys.

Sp35 специфічно експресується в нейронах і олігодендроцитах, але не в астроцитах. Це визначали в експериментах, де зрізи тканини головного мозку щура забарвлювали різними засобами, включаючи антитіло проти маркера астроцитів GFAP, антитіло проти маркера олігодендроцитів (O4), і антитіло проти маркера нейронів тубуліну β III, причому всі зрізи також забарвлювали антитілом проти Sp35. Олігодендроцити і нейрони інтенсивно забарвлювались антитілом проти Sp35. Не спостерігалось забарвлення астроцитів.

Як незалежне підтвердження профілю експресії Sp35 автори винаходу проводили напівкількісну ОТ-ПЛР з використанням мРНК, виділеної (набір Ambion) з щурячих первинних клітинних культур очищених астроцитів, олігодендроцитів і гранулярних нейронів мозочку. Використали прямий праймер AAGCCCCAGCAGGTGTTGTGGA (SEQ ID NO: 14) і обернений праймер TACTCGATCTCGATGTTGTGCTTT (SEQ ID NO: 15). Після 26 циклів спостерігали могутній пік в мРНК з нейронів, помітний, але більш слабкий сигнал спостерігали в мРНК олігодендроцитів, і не спостерігали смуги в астроцитах.

Приклад 2. Білок злиття Sp35-Fc

Для дослідження біологічної функції Sp35 одержували конструкцію, в якій позаклітинна частина людського Sp35 (залишки 1-531) злита з шарніром і Fc-ділянкою людського IgG1. Часткову кодуючу послідовність для людського Sp35 одержували шляхом ПЛР з клону 227.2 (Incyte) з використанням прямого праймеру 5'CAGCAGGTCGACGCGGCCGATGCTGGCGGGGGCGT3' (SEQ ID NO: 16) і оберненого праймера 5'CAGCAGGTCGACCTCGCCCGGCTGTTGG3' (SEQ ID NO: 17).

Продукт ПЛР з тупими кінцями субклонували в ділянку SrfI вектора PCR SCRIPT AMP (Stratagene) з одержанням PCR SCRIPT AMP-sp35. Фрагмент Sall виділяли з PCR SCRIPT AMP-sp35 і субклонували у вектор PCRCAMP Ig (похідне вектора Stratagene PCR SCRIPT AMP, в якому послідовність Fc-гамма субклонувана у фрагмент від Sall(5') до NotI(3')), об'єднуючи сигнальну послідовність і послідовність ектодомену Sp35 (кодони 1-531) в одну рамку з послідовностями, що кодують шарнір і Fc-ділянку людського Ig1. Ідентифікували правильні ізоляти, і фрагмент NotI, що містить фрагмент Sp35-Fc, субклонували в одиничну ділянку клонування Not I експресуючого вектора CH274 для 293E, похідного комерційного експресуючого вектора REP4 (Invitrogen). Білок злиття Sp35-Fc, що кодується новим вектором CH274/sp35-Fc, підтверджували шляхом секвенування ДНК, під назвою плазміди GT123.

Стабільні клітинні лінії, експресуючі білок злиття Sp35-Fc, генерували шляхом електропорації клітин хазяїна CHO DG44 з плазмідною GT123. Трансфіковані клітини CHO культивували в альфа-мінус-MEM у присутності 10% діалізованої сироватки і 4мМ глутаміну для відбору на предмет незалежного від нуклеозидів зростання. Через чотирнадцять діб після трансфекції клітини підживлювали свіжим середовищем. Для скринінгу на предмет клітин, експресуючих Sp35-Fc, клітини CHO мітили міченим фікоеритрином (PE) антитілом кози проти людського IgG (Jackson Labs) і піддавали сортуванню шляхом високошвидкісної проточної цитометрії в FACS Mo-Flo (Cytomation). Відбирали клітини, які експресували найвищий рівень Sp35-Ig. Дані клітини розмножали в культурі протягом 7 діб, потім мітили повторно і знову сортували. Клітини, експресуючі найвищий рівень Sp35-Ig, виділяли у вигляді окремих клонів в 96-ямкових планшетах. Дані клони вирощували протягом двох тижнів і потім підживлювали свіжим середовищем за добу до FACS-аналізу для перевірки рівня експресії. Клон, який експресував найвищий рівень Sp35-Fc, розмножали, і створювали банки заморожених клітин. Клітинні лінії адаптували до зростання в суспензійній культурі в безсироватковому середовищі BCM16. Титр Sp35-Fc, продукovanого даними клонами, визначали шляхом вирощування клітинних ліній при, 37 °C протягом 4-5 пасажів, з подальшим вирощуванням клітин до 50% максимальної щільності клітин і їх культивування протягом 10-15 діб при 28°C до зростання щільності життєздатних клітин до 75%. У цей момент збирали культуральне середовище, очищали від клітин і дебрису центрифугуванням, і титрували зразки культуральної надосадової рідини на рівні Sp35-Fc за допомогою вестерн-блот аналізу з використанням антитіла проти людського Ig (Jackson Lab) як зонд.

Білок злиття Sp35-Fc очищали з освітленого культурального середовища таким чином: 9мл 1М HEPES, pH 7,5, додавали до 900мл підготовленого середовища. Середовище завантажували протягом 3год. при 4°C на 3мл білок А-сефарози (Pharmacia) в режимі занурення. Смоли збирали в колонці з внутрішнім діаметром 1,5см, і промивали чотири рази 3мл PBS, два рази 4мл PBS, що містить 800мМ NaCl, і потім знову 3мл PBS. Sp35-Fc елюювали з колонки 25мМ NaH₂PO₄ pH 2,8, 100мМ NaCl фракціями по 1,5мл і нейтралізували додаванням 75мкл 0,5М NaH₂PO₄, pH 8,6. Фракції, що містять піки білка, ідентифікували шляхом вимірювання поглинання при 280нм, об'єднували і піддавали подальшому очищенню на колонці об'ємом 1мл з білком А. Перед завантаженням додавали NaCl до 600мМ і HEPES, pH 7,5, до 50мМ. Колонку двічі промивали 600мкл 10мМ HEPES, pH 7,5, 1М NaCl, і потім 1мл PBS. Sp35-Fc елюювали з колонки 25мМ NaH₂PO₄, pH 2,8, 100мМ NaCl, збираючи фракції об'ємом 0,5мл, і нейтралізували додаванням 25мкл 0,5М NaH₂PO₄, pH 8,6. Фракції, що містять піки білка, ідентифікували шляхом вимірювання поглинання при 280нм і об'єднували. При SDS-PAGE у відновлювальних умовах Sp35-Ig мігрував у вигляді одиничної смуги (>95% чистоти) з різною масою 90кДа. У невідновних умовах білок проходив як димер з приблизною масою 180кДа. Очищений Sp35-Fc розділяли на алікоти і зберігали при -70°C. Фрагмент NotI GT123, який містив амінокислоти Sp35 1-531 і Fc людського IgG1, субклонували в ділянку NotI вектора PV90 для створення DB002.

Приклад 3. Білок злиття His-AP-Sp35

Для дослідження і виділення рецептора Sp35 білок експресували в клітинах COS7 і CHO у вигляді білка злиття з лужною фосфатазою з гістидиновою міткою (His-AP). Плазмідну конструювали таким чином: позаклітинний домен Sp35 (а.к. 34-532) ампліфікували в ПЛР з використанням праймерів (прямого) 5'-AATTAAGAATTTCACGGGCTGCCCCGCCCCGCTGCGAGT-3' (SEQ ID NO: 18), що містить ділянку розщеплення Eco RI (підкреслено), і (оберненого) 5'-

TATATTCTAGATCACTCGCCCGGCTGGTTGGAGATGAAA-3' (SEQ ID NO: 19), що містить ділянку розщеплення Xba I (підкреслено). Продукт ПЛР розщеплювали Xba I, одержані в результаті липкі кінці заповнювали ДНК полімеразою T4 DNA, потім розщеплювали Eco RI і очищали в гелі. Розщеплений продукт лігували в Hind III-заповнений/EcoR I фрагмент His-AP з вектора His-AP-pcDNA 1.1 (Invitrogen). Фрагмент His-AP-Sp35 розщеплювали Hind III і Eco RI, заповнювали кінці, потім лігували в ділянку Not I із заповненими кінцями у вектор pV90. Послідовність ДНК вставки підтверджували шляхом секвенування ДНК.

Клітини COS7 пересівали за добу до трансфекції. ДНК вектора His-AP-Sp35 (8мкг) використали для трансфекції 5x10⁶ клітин з використанням ліпофектаміну (Invitrogen). Підготовлене середовище збирали через 48 год. після трансфекції.

Автори винаходу розробили клітинну лінію CHO, яка експресує білок злиття His-AP-Sp35 з використанням плазмиди pV90. Клітини хазяїна CHO DG44 (2x10⁶ клітин) трансфікували 100мкг плазмиди шляхом електропорації. Клітини культивували в альфа-мінус-MEM у присутності 10% діалізованої сироватки і 4мМ глутаміну для селекції незалежного від нуклеозидів зростання. Через чотирнадцять днів після трансфекції клітини завантажували свіжим середовищем перед скринінгом за допомогою сортування на FACS Mo-Flo (Cytomation). Трансфіковані клітини CHO мітили мишачим моноклональним антитілом 8B6, направленим проти людської плацентарної лужної фосфатази (Sigma). Вторинне антитіло, мічене PE антитіло кози проти мишачих IgG, використали для продукції сигналу, специфічного для трансфікованих клітин. Після мічення PE клітини піддавали сортуванню шляхом високошвидкісної проточної цитометрії і відбирали верхні 5%.

Для продукції підготовленого середовища з His-AP-Sp35 відбирали клітини, які експресують найвищий рівень His-AP-Sp35. Клітинні лінії адаптували до зростання в культурі суспензії в безсироватковому середовищі (BCM16). Титр His-AP-Sp35, продукovanого даними клонами, визначали шляхом вирощування клітинних ліній при 37°C протягом 4-5 пасажів, потім клітини вирощували до 50% від максимальної щільності клітин і культивували їх протягом 10-15 днів при 28°C до підвищення щільності життєздатних клітин до 75%. Відбирали культуральне середовище, очищали його від клітин і дебрису шляхом центрифугування, і титрували зразки культуральної надосадової рідини на предмет рівня His-AP-Sp35 шляхом вестерн-блот-аналізу з використанням антитіла проти людської AP (Jackson Labs) як зонд.

His-AP-Sp35 очищали від підготовленого середовища таким чином: 400мл кондиціонованого середовища від клітин CHO, які експресують His-AP-Sp35, розбавляли 400мл води. Триетаноламін, pH 8,5, додавали до 25мМ з 0,5М маточного розчину, і зразок завантажували протягом 2 годин при 4°C на 6мл аніонообмінної смоли Fractogel-TMAE (EM Industries) в режимі занурення. Смоли збирали в колонку з внутрішнім діаметром 1,5см, і промивали двічі 6мл 10мМ HEPES pH 7,5, 50мМ NaCl. AP-Sp35 елюювали з колонки 10мМ HEPES pH 7,5, 200мМ NaCl у фракціях об'ємом 2мл. Пікові фракції ідентифікували шляхом моніторингу активності AP і за допомогою SDS-PAGE. Фракцію, що пройшла через колонку TMAE, далі розводили 300мл води і завантажували в режимі занурення протягом ночі при 4°C на 6мл смоли TMAE. Смоли збирали і промивали, як описано вище, і елюювали 10мМ HEPES, pH 7,5, 150мМ NaCl. Пікові фракції знову ідентифікували шляхом моніторингу активності AP і за допомогою SDS-PAGE. His-AP-Sp35 з першої колонки був чистим на 50%, а AP-Sp35 з другої колонки був чистим на 90%. У відновних умовах His-AP-Sp35 мігрував на гелях SDS-PAGE як розрізнявальна маса 130кДа. Хоча матеріал 90%-ної чистоти підходив для більшої частини досліджень, для деяких досліджень His-AP-Sp35 далі очищали на агарозній смолі Ni-NTA (Qiagen). NaCl додавали до елюйованих фракцій з колонки TMAE до 800мМ, і 0,5М триетаноламін, pH 8,5, і 1М імідазол, pH 7,0, додавали до 25мМ і 15мМ, відповідно. 4,5мл зразка навантажували на колонку NiNTA об'ємом 400мкл. Колонку промивали тричі 25мМ триетаноламіном, pH 8,5, 800мМ NaCl, 15мМ імідазолом, і елюювали з колонки His-AP-Sp35 200мМ імідазолом pH 7,0, 350мМ NaCl, збираючи фракції об'ємом 200мкл. Пікові фракції, які містять AP, об'єднували і діалізували протягом ночі проти 250 об'ємів 10мМ HEPES, pH 7,5, 200мМ NaCl. MgCl₂ і ZnCl₂ додавали до залишку до 2 і 0,25мМ, відповідно. Кінцевий продукт був більше ніж на 95% чистим, як показано за допомогою SDS-PAGE, і рухався у вигляді одиначної смуги масою приблизно 140кДа у відновних умовах.

Конструкції Sp35 також конструювали у вигляді білків злиття з Fc. Конструкцію Sp-35 LRR-Fc одержували шляхом ПЛР з використанням праймерів (прямого) 5'CTTGACACGGATCCGCGGCCGCGCATGCTGGCGGGGGCGTGAGG3' (SEQ ID NO:20) і (оберненого) 5'GCAGCGGGGCGGGCAGCCCGTGGCCGAGCCTGACAGCACTGAGCC3' (SEQ ID NO: 21). Продукт ПЛР вбудовували в ділянку NotI вектора PV90. Конструкцію Sp35 IG-Fc одержували шляхом ПЛР з використанням праймерів (прямого) 5'CTTGACACGGATCCGCGGCCGCGCATGCTGGCGGGGGCGTGAGG3' (SEQ ID NO:22) і (оберненого) 5'GTCCCGGATGCGGGCGGGCCGAGCCTGACAGCACTGAGCCAG3' (SEQ ID NO: 23). Продукт ПЛР вбудовували в ділянку NotI вектора PV90. Білки експресували в клітинах CHO і очищали з використанням колонки з білок А-сефарозою.

Приклад 4. Зв'язування Sp35 з експресуючими NgR1 клітинами

Для того, щоб показати зв'язування Sp35 з NgR1, використали чотири різних способи. Спочатку автори винаходу виявляли взаємодію в прямому аналізі зв'язування, в якому кон'югат лужна фосфатаза-Sp35 (AP-Sp35) інкубували з експресуючими NgR1 клітинами і оцінювали зв'язування з використанням хромогенного реагенту для виявлення AP. Клітини COS7 з 90%-ною зімкненістю вирощували на чашках для культури тканини діаметром 100мм, і трансфікували їх експресуючими NgR1 плазмідами з використанням реагентів Eugene 6 (Roche). Через 48 годин трансфіковані клітини промивали один раз HBH (збалансований сольовий буфер Хенкса, 1мг/мл BSA, 20мМ HEPES, pH 7,0), і потім інкубували протягом 1,5 год. при 23°C з 4мкг/мл білка злиття AP-Sp35 в HBH. Клітини промивали крижаним буфером HBH 3 рази кожний раз протягом 3хв., потім фіксували 3,7% формальдегідом в 20мМ HEPES, pH 7,0, 150мМ NaCl протягом 15хв., і переносили зворотно в буфер HBH. Ендогенну термолабільну AP інактивували нагріванням протягом 2 годин при 67°C. Пов'язаний AP-Sp35 виявляли шляхом інкубації в нітро-блакитному тетразолі NBT (Roche). AP-Sp35 зв'язувався з клітинами COS7, експресуючими людський рецептор NgR1, але не з контрольними клітинами COS7, трансфікованими тільки вектором. Спостерігали точковий профіль забарвлення NgR1, що відображає те, що тільки частина клітин, вірогідно 50% з них, трансфікувались NgR1.

Для кращого кількісного аналізу зв'язування автори винаходу проводили такий же експеримент, але паралельні зразки клітин обробляли 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,125, 0,06мкг/мл AP-Sp35. Пов'язану AP інкубували з 4-нітрофенілфосфатом, і активність AP оцінювали в пристрої для зчитування 96-ямкових планшетів (Molecular Devices). З цих даних автори винаходу з'ясовували, що EC50 зв'язування AP-Sp35 з людським NgR1 складає приблизно 6нМ.

По-друге, автори винаходу виявляли зв'язування Sp35 з NgR1 підходом ELISA. Планшети для ELISA (Costar) покривали 10мкг/мл розчинних рецепторів NgR1-Fc (sNgR310-Fc, що містить пептид щурячого NgR1 35-310, злиту з шарніром і Fc щурячого IgG1, і sNgR344-Fc, що містить пептид щурячого NgR1 35-344, злитий з щурячим IgG1) в 0,1М NaHCO₃, pH 9,0, протягом 1год. при 37°C. Планшети блокували і промивали 25мМ HEPES, pH 7,0, що містить 0,1% BSA, 0,1% овалбуміну, 0,1% знежиреного сухого молока і 0,001% NaN₃. Білок AP-Sp35, 4мкг/мл, додавали до планшету та інкубували протягом ночі при 4°C. Планшети потім промивали 10мМ Tris, pH 7,5, 150мМ NaCl, і виявляли пов'язану AP з використанням 10мкг/мл хромогенного субстрату 4-нітрофенілфосфату, розчиненого в 0,1М гліцині, 1мМ MgCl₂, 1мМ ZnCl₂, pH 10,5. OD₄₁₀ визначали на пристрої для зчитування результатів ELISA (Molecular Devices), обладнаному програмою Softmax. AP-Sp35 зв'язувався з іммобілізованим sNgR-344-Fc, але не з білком sNgR-310-Fc, вказуючи на те, що для зв'язування Sp35 потрібний більш протяжний варіант молекули NgR1. Автори змогли забезпечити конкурентне інгібування зв'язування AP-Sp35 з sNgR344-Fc з NgR1 на 80% шляхом попередньої інкубації AP Sp35 з 100-кратним надлишком sNgR344-Fc. Не виявляли конкурентного зв'язування при використанні білка злиття IgI їжака і щура як контроль білка злиття з щурячим Ig.

По-третє, автори винаходу виявляли зв'язування Sp35 з NgR1 за допомогою спільної імунопреципітації Sp35 з NgR1. Для даного дослідження зімкнені на 80% клітини COS7, вирощені на чашках для культури тканини діаметром 100мм, трансфікували плазмідами, що кодують Sp35-гемагглютинін (Sp35-HA) і NgR-FLAG, з використанням реагентів Eugene 6 (Roche). Через 48 годин після трансфекції клітини збирали і лізували в 1мл лізуючого буфера (50мМ HEPES, pH 7,5, 150мМ NaCl, 1,5мМ MgCl₂, 1мМ EGTA, 1% Triton X-100 і 10% гліцерин) при 4°C протягом 30хв. Потім лізат центрифугували при 14000хg протягом 15хв., і надосадову рідину збирали та інкубували при 4°C протягом ночі при перемішуванні, з використанням афінного матриксу проти HA (Roche). Зразки промивали 3 рази 1мл лізуючого буфера, потім кип'ятили протягом 3 хвилин в буфері для зразка за Леммлі, піддавали 4-15% SDS-PAGE, і аналізували за допомогою імуноблотингу з антитілом проти FLAG M2 (Sigma). Афінна смола проти мітки HA накопичувала комплекс, що містить Sp35-HA і FLAG-NgR, що було очевидно за рахунок присутності. Цей комплекс не спостерігався в лізатах з контрольних трансфекцій, в яких клітини обробляли тільки плазмідною Sp35-HA або плазмідною FLAG-NgR1, або клітини спільно трансфікували Flag-NgR1 і міченим HA контрольним білком, який не зв'язує NgR1.

Sp35-HA одержували таким чином. Сигнальну послідовність і позаклітинний домен Sp35 (амінокислоти 1-531) ампліфікували шляхом ПЛП з використанням праймерів 5'ATATTCTAGAAATGCTGGCGGGGGCGGTGAG3' (SEQ ID NO: 24) і 5'ATATACTAGTGTCTGTTGCCGCCCGCGTTGG3' (SEQ ID NO: 25), що містять ділянки XbaI і SpeI (підкреслено). Продукт ПЛП розщеплювали крижаним XbaI і SpeI і будували у вектор pCGCHA між ділянками XbaI і SpeI. Послідовність вставки підтверджували за допомогою секвенування ДНК. Конструкція FLAG NgR1 була одержана від д-ра Zhigang He [Nature, Vol 420, Nov 7,2002].

По-четверте, автори винаходу показали, що AP-Sp35 зв'язувався з гранулярними нейронами мозочка щура (CGN), які експресують NgR1. Для даного експерименту зімкнені на 90% клітини CGN, виділені через 8 діб після народження, вирощували на чашках для культури тканини діаметром 100мм. Через 48 годин клітини промивали один раз буфером HBH, і потім інкубували з 4мкг/мл AP-Sp35 в буфері HBH протягом 1,5 годин при 23°C. Потім клітини промивали крижаним HBH 3 рази кожний раз по 3 хвилини, потім фіксували 3,7% формальдегідом в 20мМ HEPES, pH 7,0, і 150мМ NaCl протягом 15хв., і перенесли зворотно в HBH. Ендогенну термолабільну AP інактивували нагріванням протягом 2 годин при 67°C. Пов'язаний AP-Sp35 виявляли шляхом інкубації з нітро-блакитним тетразолієм NBT (Roche). AP-Sp35 зв'язувався з гранулярними нейронами мозочка, виділеними на 8 добу після народження, які експресують NgR1. Зв'язування AP-Sp35 з нейронами інгібувалось обробкою CGN з використанням PIPLC (50диниць/мл), який розщеплює більшість закорених GPI білків з поверхні мембрани. Оскільки NgR1 являє собою GPI-пов'язаний білок, даний результат далі підтримує твердження, що Sp35 зв'язується з NgR1 на клітинах CGN.

Приклад 5. Спільна локалізація Sp35 і NgR1

Для визначення того, чи експресовані Sp35 і NgR1 на одних і тих же нейронах, автори винаходу проводили дослідження зі спільної локалізації. Фіксовані 4% параформальдегідом первинні культури гранулярних нейронів щура p8 інкубували з антитілами проти Sp35 і NgR1 (Santa Cruz), і потім з відповідними міченими Alexa вторинними антитілами (Molecular Probes Inc.). Клітини візуалізували за допомогою конфокальної мікроскопії. Нейрони інтенсивно забарвлювалися антитілами проти Sp35 і NgR1. Обидва білки експресувалися в тілах і аксонах нейронів. Для забезпечення аналізу спільної локалізації для 2 типів антитіл використовувалися по-різному забарвлені зонди. Коли барвники (червона для NgR-позитивних клітин і зелена для Sp35-позитивних клітин) накладалися один на іншій, автори винаходу бачили жовтий колір в межах клітини, що вказувало на спільну локалізацію двох білків в даних нейронах.

Приклад 6. Ділянки зв'язування NgR1 в молекулі Sp35

Автори винаходу використали картування, основане на делеціях, для визначення конкретних доменів Sp35, залучених у взаємодії з NgR1. Наступні конструкції з делеціями одержували з використанням набору для мутагенезу Stratagene Quikchange. Автори перевіряли всі векторні конструкції за допомогою секвенування ДНК модифікованих вставок.

His-AP-Sp35b, який містить домен багатих лейцином повторів Sp35 плюс його основну ділянку (а.к. 34-432), клонували з вектора His-AP-Sp35 (а.к. 34-532) шляхом ПЛП. Використані праймери являли собою 5'CCCAGCAGGTGTTTGTGGACGAGTGATCTAGGGCCGCGGATCCCTG-3' (SEQ ID NO: 26) і 5'-CAGGGATCCGCGGCCCTAGATCACTCGTCCACAAACACCTGCTGGG-3' (SEQ ID NO: 27).

His-AP-Sp35d, який кодує Ig домен Sp35 плюс його основну ділянку (а.к. 417-531), клонували з вектора

His-AP-Sp35a (а.к. 37-531) шляхом ПЛР. Використані праймери являли собою 5'-CGCCGCGCACCCGGGTGAATTCGCGCGCCCGCATCCGGGACCGC-3' (SEQ ID NO: 28) і 5'-GCGGTCCCGGATGCGGGCGCGGAATTCACCCGGGTGCGCG-3' (SEQ ID NO: 29).

His-AP-Sp35e, який кодує тільки Ig-домен (а.к. 425-531), клонували з вектора His-AP-Sp35 (а.к. 34-532) шляхом ПЛР. Використані праймери являли собою 5'-CGCCGCGCACCCGGGTGAATTCGCCCAGCAGGTGTTTGTG-3' (SEQ ID NO: 30) і 5'-GTCCACAAACACCTGCTGGGCGAATTCACCCGGGTGCGCG-3' (SEQ ID NO: 31).

Комерційний набір для мутагенезу і протокол (Stratagene Quikchange) використали для мутації амінокислоти 456 (аргінін на глутамінову кислоту) і амінокислоти 458 (гістидин на валін) Sp35 у векторі His-AP-Sp35 (34-532). Використані праймери являли собою 5'-CATCCTCTGGCTCTACCCGAAAAGGTACTGGTCTCAGCCAAGAGC-3' (SEQ ID NO: 32) і 5'-GCTCTTGGCTGAGACCAGTACCTTTTCGGGTGAGAGCCAG-3' (SEQ ID NO: 33).

Конструкції з делеціями на основі His-AP-Sp35 (Фіг.3) вміщували в експресуючі вектори pV90 і експресували в клітинах 293. Підготовлене середовище збирали, і адукти AP очищали за допомогою послідовних стадій хроматографії на смолі Fractogel TMAE і NiNTA-агарозі. Очищені білки тестували на предмет зв'язування з NgR1, експресованим на клітинах COS7. Всі три конструкції слабо зв'язувались з Sp35. Ці результати вказують на те, що LRR-повтори 1-14 Sp35 (амінокислоти з 34 по 417) і Ig-домен Sp35 (амінокислоти 425-531) вносять внесок в зв'язування Sp35 з NgR1. Ig-домен характеризувався більш високою спорідненістю, ніж домен LRR.

Структурну модель Ig-домену Sp35 генерували з використанням кристалічної структури NCAM як рамку [Rasmussen et al, 2000, Nat. Struct. Biol. 7:389-393]. З цієї моделі автори винаходу спостерігали петлю (номери залишків 454-458, амінокислоти: SPRKH; SEQ ID NO: 34), які можуть залучатись до зв'язування. Для перевірки даної гіпотези автори винаходу конструювали конструкцію Sp35, в якій залишки R в 456 і H в 458 змінювали на E і V, відповідно. Коли дану конструкцію тестували на зв'язування NgR1, автори винаходу виявляли >10-кратне підвищення сигналу. Як альтернативний підхід для тестування внеску даної петельної ділянки в зв'язування, автори винаходу синтезували пептид, відповідний послідовності LSPRKH (SEQ ID NO: 10), який автори циклізували шляхом додавання цистеїнів з N- і C-кінців пептиду. Після зв'язування з NgR1 даний пептид блокується, інгібує або перешкоджає функції NgR1.

Приклад 7. Sp35 індукує розростання паростків CGN р8

Для визначення біологічної функції Sp35 в нейронах автори винаходу інкубували Sp35-Fc з гранулярними нейронами, виділеними через 8 діб після народження, для виявлення того, чи може Sp35 регулювати розростання нейриту. Культуральні слайди Labtek (8 ямок) покривали полі-D-лізином (Sigma) в концентрації 0,1мг/мл до розкопування білка Sp35-Fc (16мкг/ямку білка). Слайди сушили протягом ночі, потім ополіскували і покривали ламініном (Gibco) в концентрації 10мкг/мл. Мозочкові гранулярні нейрони, виділені через 8 діб після народження, дисоціювали і висівали на заздалегідь покриті слайди. Культури на слайдах інкубували при 37°C в 5% CO₂ протягом 24 годин. Потім слайди фіксували в 4% параформальдегіді, що містить 20% сахарозу, і забарвлювали антитілом проти тубуліну β III (Covance TUJ1). Через 24 години CGN характеризувались виразною пучкоподібною морфологією, що підтверджувалось гілкуванням паростків нейронів. Розростання паростків не спостерігалось в необроблених клітинах або контрольних зразках, покритих білком Fc.

Приклад 8. Дія Sp35 на активацію/інактивацію RhoA

Sp35-Fc індукував розростання паростків в постнатальних гранулярних нейронах мозочка. Оскільки, як відомо, сигнальна молекула RhoA залучена до розростання паростків, автори винаходу визначали, чи може Sp35-Fc регулювати функції RhoA в нейронах. Автори винаходу проводили експерименти з активації RhoA таким чином: клітини 293 або клітини COS7 трансфікували експресуючими векторами, що містять комбінації RhoA, Sp35 або NgR1 з використанням реагентів Eugene 6 (Roche). Через 48год. після трансфекції клітини піддавали сироватковому голодуванню протягом ночі, потім лізували в 50мМ Tris, pH 7,5, що містить 1% Triton X-100, 0,5% дезоксихолату натрію, 0,1% SDS, 500мМ NaCl, 10мМ MgCl₂, плюс коктейль інгібіторів протеаз. Клітинні лизати освітлювали шляхом центрифугування при 13000хg і 4°C протягом 5 хвилин, і 95% зразків надосадової рідини інкубували з 20мкг іммобілізованого афінного матриксу, що містить зв'язувальний домен GST-Rho (гранули Rhotekin, Upstate Biotechnology) при 4°C протягом 45 хвилин. Гранули промивали 3 рази промивальним буфером (50мМ Tris, pH 7,5, 1% Triton X-100, 150мМ NaCl, 10мМ MgCl₂, з протеазними інгібіторами). Пов'язаний з GTP Rho елюювали з гранул шляхом нагрівання при 95°C протягом 5хв. в буфері для зразка SDS-PAGE. Пов'язаний і загальний білок Rho виявляли шляхом вестерн-блоту з використанням моноклонального антитіла проти RhoA (Santa Cruz). Клітини COS7 і HEK293, трансфіковані Sp35, індукували активацію RhoA, що підтверджувалось збільшенням кількості RhoA-GTP, виявленої на блоті після трансфекції геном Sp35. Подальше збільшення рівня RhoA-GTP спостерігали після обробки Sp35-Fc. На відміну від збільшення рівня RhoA-GTP після трансфекції одним Sp35, при трансфекції клітин Sp35 і NgR1, RhoA частково інактивувався. Обробка даних клітин Sp35-Fc приводила до подальшої інактивації RhoA.

Автори винаходу підтверджували сигнальну відповідь на Sp35 з використанням аналізу FLIPR (Molecular Devices) для визначення впливу обробки Sp35 на струм Ca⁺⁺. Автори спостерігали значний струм Ca⁺⁺ в клітинах, які експресують Sp35, при обробці Sp35-Fc, але не в контрольних клітинах, оброблених Sp35-Fc. Струм Ca⁺⁺ знижувався, коли клітини, які спільно трансфікували NgR1 і Sp35, обробляли білком злиття Sp35-Fc.

Приклад 9. Взаємодія білка Sp35 з самим собою

Оскільки домени LRR часто беруть участь в гомотипічних взаємодіях, і автори винаходу спостерігали, що додавання розчинного Sp35 до трансфікованих Sp35 клітин спричиняє підвищення RhoA-GTP у порівнянні з тим, що спостерігається при трансфекції одним Sp35, автори тестували зв'язування Sp35 з самим собою. Для проведення даного тесту автори винаходу використали спільну імунопреципітацію. Клітини COS7, зімкнені на 80%, вирощені на чашках для культури тканини діаметром 100мм, трансфікували плазмідами Sp35 HA або Sp35-FLAG, або обома, з використанням реагентів Eugene 6 (Roche). Через сорок вісім годин після трансфекції клітини збирали і лізували в 1мл лізуючого буфера (50мМ HEPES, pH 7,5,

150mM NaCl, 1,5mM MgCl₂, 1mM EGTA, 1% Triton X-100 і 10% гліцерин) при 4°C протягом 30хв. Лізат центрифугували при 14000хg протягом 15хв., і зразки надосадової рідини збирали та інкубували, при 4°C протягом ночі при перемішуванні, з афінним матриксом проти HA (Roche). Потім зразки промивали 3 рази 1мл лізуючого буфера, промивали в буфері Леммлі для зразка, піддавали 4-15% SDS-PAGE, і аналізували шляхом імуноблоту з антитілами проти FLAG. Смола з антитілами проти HA захоплювала комплекс, який містив Sp35-FLAG, що визначено шляхом вестерн-блоту. Це вказувало на пряму взаємодію Sp35 з самим собою. Автори винаходу також обробляли клітини, трансфіковані HA-Sp35, Sp35-Fc, і використали схожий підхід імунопреципітації для того, щоб показати, що HA-Sp35 зв'язується з Sp35-Fc.

Sp35-FLAG одержували таким чином. Позаклітинний домен гена Sp35 (а.к. 1-531) ампліфікували шляхом ПЛР з використанням праймерів 5'AATTAAGCGGCCGCAT6CTGGCGGGGGGCGT3' (SEQ ID NO: 35) і 5'AATTAAGCGGCCGCTTTGTCATGT3' (SEQ ID NO: 36), що містять ділянки NotI (підкреслено). Продукт ПЛР розщеплювали NotI і вбудовували в ділянку NotI вектора pV90. Послідовність ДНК вставки підтверджували шляхом секвенування ДНК.

Приклад 10. Трансплантація трансформованих Sp35 клітин in vivo

Для визначення біологічної функції Sp35 у щурів з пошкодженням спинного мозку автори винаходу інфікували коркові клітини в первинній культурі (змішані культури) ретровірусом, експресуючим повнорозмірний Sp35 або ретровірусним контролем, для доставки в епіцентр пошкодження спинного мозку щура. Вводили 2x10⁶ клітин, і щурів фіксували на 10 добу. Зразки спинного мозку фіксували протягом ночі в 4% параформальдегіді, потім дегідрували в 70% EtOH, і потім в 95% EtOH. Зразки тканини просочували парафіном. Зрізи (товщиною 10 мікрон) використали для імуногістохімічного забарвлення. Щури, які одержували клітини, які експресують Sp35, у порівнянні з контролем характеризувались меншим скороченням аксонів і великим забарвленням тубуліну βIII поблизу епіцентру. У щурів з пошкодженням, Sp35, що одержували, спостерігали підвищене виживання нейронів.

Ретровірусну конструкцію Sp35 одержували таким чином: ген Sp35 ампліфікували шляхом ПЛР з використанням праймерів 5'-GATTACTCGAGATGCTGGCGGGGGGCGTGAGG-3' (SEQ ID NO: 37), що містить ділянку XhoI (підкреслено), і 5'CGCGGGAATTCTCATATCATCTTCATGTTGAAGT-3' (SEQ ID NO: 38), що містить ділянку EcoRI (підкреслено). Продукт ПЛР розщеплювали XhoI і EcoRI, потім лігували в ретровірусний вектор pMIG (який містить IRES-GFP), який раніше розщеплювали XhoI і EcoRI. Новий вектор називали pMMC078. Всі ізоляти pMMC078 містили незаплановані точкові мутації, так що два ізоляти pMMC078 лігували разом. pMMC078.6 розщеплювали XhoI і Accl, і pMMC078.7 розщеплювали XhoI і Accl. Ці два фрагменти лігували разом з одержанням кінцевої правильної плазмиди pMMC089. Послідовність ДНК вставки підтверджували шляхом секвенування ДНК. Ретровірус Sp35 одержували, як описано. Клітини 293G пересівали за добу до трансфекції. 8мкг Sp35-ретровірусної ДНК використали для трансфекції 5x10⁶ клітин із застосуванням ліпофектаміну (Invitrogen). Підготовлене середовище збирали через 92 години після трансфекції. Підготовлене середовище центрифугували при 5000хg протягом 10 хвилин, і надосадову рідину використали як маточний розчин ретровірусу Sp35. Даний маточний розчин зберігали при 4°C протягом 1 тижня або при -80°C протягом 6 місяців.

Приклад 11. Модель пошкодження спинного мозку на тваринах

Всі хірургічні процедури проводять з використанням асептичного способу. Протягом 1 тижня до будь-якої хірургічної маніпуляції тварин привчають до рук. Перед і після операції для профілактики вводять ампіцилін 100мг/кг п./ш. для зниження ризику інфекційного пошкодження сечового міхура.

Тварин піддають анестезії з використанням мідазоламу в дозі 2,5мг/кг в./чер. в поєднанні з 2-3% ізофлураном в O₂ для глибокого наркозу, який оцінюють пощипуванням пальця. Протягом операції і відновлення від неї тварин тримають на подушці, що нагрівається, з циркулюючою водою. Очну змазку використовують для запобігання висиханню ока, і атропін в дозі 0,05мг/кг п./ш. вводять для зниження надмірного слиновиділення. На шкірі роблять маленький розріз, і відводять м'яз, щоб відкрити хребці. Проводять дорзальну ламінектомію на рівні хребця L6 (і L7, якщо необхідне приміщення ітратекального катетера, див. нижче), L6/L7, і прилеглі остисті паростки міцно фіксують в спінальній рамці (David Kopf Instruments). Проводять дорзальну гемісекцію на рівні L6 тонкими ножицями для іридектомії, повністю перериваючи головний дорзомедіальний і малий дорзолатеральний компоненти кортикоспінального тракту (CST). Після операції ділянку ламінектомії покривають захисним матеріалом, таким як Durafilm, і зшивають належні м'язи хромовою ниткою 4,0 для захисту відкритого хребта. Шкіру зшивають і протирають розчином бетадину.

Функціональне відновлення тварин оцінюють з використанням способу коефіцієнта Basso Seattle and Bresnahan (BBB), який звичайно застосовується для оцінки щурів після пошкодження спинного мозку. У даному способі проводиться кількісний аналіз функції задніх кінцівок щурів шляхом докладного аналізу рухливості в суглобах і здатності перенести вагу. Щурів оцінюють через добу після пошкодження спинного мозку, після цього - щотижня.

Безпосередньо після пересічення CST в ділянку пересічення і безпосередньо в каудальному і ростральному напрямі від ділянки пошкодження вводять ін'єкцією аденовірус, експресуючий Sp-35 або GFP, або контрольний вірус (10¹⁰ частинок). Всього 10мкл аденовірусу вводять в 5 різних ділянок (4мкл/ділянку). Для інтратекального введення білка Sp35 в твердій оболонці спинного мозку роблять маленький отвір в 2мм каудально від пошкодження L7, і вбудовують інтратекальний катетер в субарахноїдальний простір в ділянку L7. Катетер повільно і акуратно ведуть вздовж спинного мозку приблизно на 1мм каудальніше пошкодження. Частина катетера, яка лежить поза інтратекальним простором, щільно пришивають до навколишньої тканини. Підготовлений мініосмотичний насос (Alza Corp.), який містить матеріал (білок Sp35 або контрольний білок), що тестується, приєднують до експонованого кінця направляючої канюлі і вміщують в підшкірний простір. Після хірургічного втручання ділянку ламінектомії покривають протективним матеріалом, таким як Durafilm, і зшивають належні м'язи хромовою ниткою 4,0 для захисту відкритого хребта. Шкіру зшивають і протирають розчином бетадину.

Гістологічний аналіз. Операцію з мічення трактів проводять під час операції з індукції пошкодження спинного мозку. Шкіру голови голять і протирають бетадином і 70%-ним спиртом. Тварину вміщують в рамку стереотаксису. Скальп розтинають подовжньо, і зіскоблюють періост зі зведення черепа. У черепі

просвердлюють отвір приблизно 1-2мм в діаметрі, і вставляють скляну мікролітрову голку вертикально в 8 місць моторної кори (координати визначають за атласом мозку щура Paxinos and Watson, 1997). Приблизно 5мкл матеріалу для мічення трактів (наприклад, біотин-декстран-амін, мол. маса 10000) вводять шляхом ін'єкції, і голку залишають на місці ще на п'ять хвилин для забезпечення дифузії розчину. Після видалення голки отвір в черепі заклеюють гелевою піною, і скальп скріплюють, закриваючи ділянку пошкодження. Тваринам дозволяють відновитись і одержати післяопераційний догляд (описаний вище). Через чотири-десять тижнів тварин піддають глибокому наркозу (інактин 100-110мг/кг в.чер.) і перфузують для вивчення гістології, як описано вище. Матеріал для мічення тракту переноситься механізмами антеградного транспорту вниз по кортикоспінальному тракту в напрямі каудального кінця спинного мозку і надає спосіб кількісного аналізу анатомічної цілісності в межах кортикоспінального тракту. Для експериментів з імуногістохімії тварин піддають глибокому наркозу інактином (100-110мг/кг в.чер.) через 2-8 тижні після операції з індукції пошкодження. Грудну порожнину відкривають і виймають серце для забезпечення перфузії. У лівий шлуночок вставляють канюлю, через яку повільно нагнітають 100сс крижаної PBS (в правому шлуночку прорізають отвір для забезпечення виходу рідини). За цим слідує повільне, але рівномірне проколювання 4% параформальдегіду (50-100мл) до явної фіксації очей/вух/пальців. Видаляють спинний мозок, піклуючись про мінімальну зміну ділянки пошкодження, заморожують в ОСТ, роблять різзи і готують їх для імуногістохімії. Також необов'язково збирають інші тканини для подальшого аналізу. Тварини, що одержували аденовірус з Sp35, характеризувались підвищеним гілкуванням аксонів, що визначено забарвленням тубуліну β III в аксонах нейронів.

Приклад 12. Конструкції вірусного вектора Sp-35

Виникаючий з pMIG вірусний вектор Sp-35 одержували таким чином. Повнорозмірну кодуючу Sp35 послідовність ампліфікували шляхом ПЛР з використанням праймера 5'-GATTACTCGAGATGCTGGCGGGGGCGGTGAGG-3' (SEQ ID NO: 37), що містить ділянку XhoI, і праймера 5'-CGCGGGAATTCTCATATCATCTTCATGTTGAAGTTC-3' (SEQ ID NO: 38), що містить ділянку EcoRI. Продукт ПЛР розщеплювали XhoI і EcoRI, потім лігували в ретровірусний вектор pMIG [Cheng et al, 1996, Nat. Biotechnol. 145:576], який розщеплювали XhoI і EcoRI. Даний вектор позначали pMMC078. Всі ізоляти pMMC078 містили точкові мутації, так що два ізоляти pMMC078 лігували разом. Вектор pMMC078.6 розщеплювали XhoI і AccI, і pMMC078.7 розщеплювали XhoI і AccI. Ці два фрагменти лігували з одержанням плазмиди pMMC089.

Виникаючий від pMIG вірусний вектор Sp35-HA одержували таким чином. Фрагмент, що кодує амінокислоти Sp35 326-614, в рамці зчитування з послідовністю HA, одержували з використанням ПЛР з праймером 5'-GCCTTCCGCGCCTCAACTACCTGCGCGTGCTC-3' (SEQ ID NO: 39), що містить ділянку SacII, і 5'-CCGGAATTCTCAAGCGTAATCAGGAACGTCGTAAGGGTATATCATCTTCATGTTGAAGTTGCGGGGCGCGTCCGCG-3' (SEQ ID NO: 40), де pMMC089 служила матрицею. Більш довгий праймер включає в себе кодуючу HA послідовність (курсив) після кодону 614 Sp35 і перед ділянкою EcoR I. Потім продукт ПЛР розщеплювали Sac II і EcoR I, і використали для заміни фрагменту Sac II-EcoR I, що містить кодони 326-614 Sp35 дикого типу, у виникаючому від pMIG ретровірусному векторі.

Бакуловірусний вектор Sp35 HA одержували таким чином. Кодуючу Sp35-HA послідовність з ретровірусного вектора Sp35-HA розщеплювали Xho I і EcoR I, затупляли кінці і клонували за допомогою Bg12-fill-in в ділянку бакуловірусного човникового вектора pBV-CZPG [патенти США № 6190887; і 6338953], заміняючи ген LacZ під промотором CMV.

Аденовірусний вектор Sp35 одержували таким чином. Послідовність Sp35-IRES-GFP з ретровірусу Sp35 розщеплювали Xho I-fill-in і Nhe I, потім клонували в ділянки EcoRI-fill-in/Nhe I аденовірусного човникового вектора pDC315, під мінімальний промотор CMV.

Приклад 13. Модель ремієлінізації на тваринах

У всіх дослідженнях використали щурів-самиць Long Evans. Щурів піддавали наркозу з використанням ізофлурану, і витягували T3/4 і проводили дорзальну геміламінектомію. Потім вводили шляхом ін'єкції хімічний демієлінізуючий засіб, лізолецитин (3мкл 1% лізолецитину в 0,9% сольовому розчині) у правий бік дорзальних стовпів спинного мозку в 0,5-1мм нижче поверхні мозку). До і після операції проводили відповідну знеболюючу обробку.

Через три доби ділянку ін'єкції повторно витягують (під ізофлурановим наркозом з відповідною знеболюючою обробкою), і вводять шляхом ін'єкції в пошкоджений спинний мозок наступні засоби: в ділянку пошкодження вводять аденовірусний вектор, що кодує білок Sp35/контрольний білок. 10^{10} частинок аденовірусу, що кодує Sp35 або контроль GFP в об'ємі 10мкл, вводять шляхом ін'єкції в пошкоджений спинний мозок щура в різні ділянки, числом до 5, в ділянку індукованої лізолецитином демієлінізації і навколо неї. У кожен з 5 ділянок ін'єкції вводять об'єм, що не перевищує 2мкл. Для гістологічного аналізу демієлінізації/ремієлінізації спинного мозку через 2, 3, 4 або 6 тижнів після операції, тварин піддають глибокому наркозу за допомогою інактину (100-110мг/кг в.чер.) і проводять перфузію фіксуючого розчину через серце. Потім виймають спинний мозок і готують до аналізу. Тварини, що одержували лікування Sp35, характеризувались підвищеною мієлінізацією аксону, що визначене ІНС з використанням антитіла проти MBP або швидким луксолом блакитним.

Приклад 14. PHKi Sp35

Для визначення ролі Sp35 у функції мозку автори винаходу вводили лентивірусну PHKi Sp35 в клітини CGN, виділені на 8 добу після народження. Інфіковані PHKi Sp35 клітини мали більш короткі нейрити і більш високу швидкість проліферації, ніж контрольні клітини. Дані результати вказують на роль Sp35 в регуляції активації RhoA.

Послідовності ДНК Sp35 миші і щура порівнювали на предмет пошуку ділянок гомології для застосування кандидатних PHKsh. CH324 конструювали шляхом відпалу олігонуклеотидів LV1-035 і LV1-036 і лігування з pLL3.7, розщепленої HpaI і XhoI. Олігонуклеотиди одержували від MWG. Послідовності являють собою:

LV1-035	(смысловий	олігонуклеотид)
5'TGATCGTCATCCTGCTAGACTTCAAGAGAGTCTAGCAGGATGACGATCTTTTTTC (SEQ ID NO: 41)		

LV1-036 (антисмисловий олігонуклеотид)
 5'TCGAGAAAAAAGATCGTCATCCTGCTAGACTCTTGAAGTCTAGCAGGATG ACGATCA (SEQ ID NO: 42).

Перед продукцією вірусу ДНК з рLL3.7 або кандидатної shPHK в рLL3.7 одночасно трансфікували з мишачою плазмідною, міченою SP35-HA, у відношенні 5 до 1, в клітини CHO в 6-ячковому форматі. Нокдаун аналізували детекцією шляхом вестерн-блоту мітки SP35-HA з трансфікованих лізатів клітин CHO, і шляхом нозерн-блоту загальної ДНК, одержаної з паралельних ямок. Блот зондували фрагментом mSP35 розміром 0,7тис.н.п. Аналізи проводили через 48 годин після трансфекції (дані не показані). Віруси продукували з кращого кандидата на застосування в культурах нейронів щура. Вектор, додаткова методологія і продукція вірусу відповідали описаним в [Robinson et al. "A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference". Nat. Genet. 33, 401-6 (2003)].

Приклад 15. Активация RhoA

Клітини COS7, які одночасно експресують NgR1 і SP35, не характеризувались змінами рівня RhoA/GTP у відповідь на OMgr. Це вказує на те, що утворення комплексу SP35/NgR1 не достатнє для забезпечення трансдукції сигналу за допомогою мієлінового інгібітору.

Автори винаходу досліджували можливість того, що передачу сигналу опосередковує потрібний комплекс SP35/NgR1/p75. Для оцінки взаємодії між SP35, NgR1 і p75 використали два підходи. По-перше, зв'язування оцінювали прямим аналізом зв'язування з використанням кон'югату AP-SP35. Кон'югат AP-SP35 слабо зв'язувався з експресуючими p75 клітинами. AP-P75 зв'язувався з експресуючими NgR1 клітинами. Зв'язування AP-SP35 з NgR1 і p75 вимірювали за допомогою ELISA (Фіг.4). По-друге, зв'язування SP35 з NgR1 і p75 оцінювали за допомогою спільної імунопреципітації з клітин COS7, які одночасно експресують SP35, NgR1 і p75. Антитіло проти NgR1 імунопреципітувало комплекс, що містить SP35 і p75. Антитіло проти SP35 також імунопреципітує комплекс, що містить p75. Дані із взаємодії і спільної імунопреципітації надавали докази прямої взаємодії між SP35, NgR1 і p75. Автори винаходу застосовували конфокальну мікроскопію і антитіла проти SP35, p75 і NgR1 для того, щоб показати, що SP35, NgR1 і p75 спільно локалізуються в тілах клітин і аксонах нейронів p7 CG з щурів.

Далі авторами винаходу показано, що поєднання SP35, NgR1 і p75 достатнє для активності мієлінового інгібітору. Не нейронні клітини COS7 конструювали так, щоб вони експресували всі три компоненти. З використанням даних клітин автори винаходу показали, що рівень RhoA/GTP позитивно регулюється OMgr. Обробка OMgr-Fc підвищувала рівень RhoA/GTP в клітинах, які одночасно експресують SP35/p75/NgR1, у порівнянні з іншими комбінаціями трьох цих компонентів. Автори винаходу підтверджували експресію білків за допомогою вестерн-блоту лізатів клітин COS7. Спорідненість мієлінових інгібіторів, що зв'язуються з NgR1, не підпадала під вплив присутності p75 або p75 і SP35. Об'єднання результатів підтримує модель, згідно з якою потрібний комплекс NgR1, SP35 і p75 потрібний для регуляції RhoA у присутності лігандів NgR1 (Фіг.5).

SP35 містить цитоплазматичний домен, який потенційно прямо або непрямо залучений до передачі сигналу. Для визначення ролі цитоплазматичного домену автори винаходу продукували SP35, укорочений по цитоплазматичному домену (амінокислоти від 34 до 576 SEQ ID NO: 2), для функціонування домінують негативно-негативним чином за допомогою утворення непродуктивного потрібного комплексу, не здібного до передачі. Автори визначили дану молекулу з укороченням по цитоплазматичному домену «DN-SP35» (по dominant negative SP35). Автори винаходу трансфікували повнорозмірним SP35 або DN-SP35 нейрони CG, виділені на 7 добу після народження (p7), і потім аналізували їх відповідь на інгібіторні компоненти мієліну (OMgr, мієлін і Nogo66). Як показано на Фіг.6, трансфіковані DN-SP35 клітини не відповідали на інгібіторні компоненти мієліну і характеризувались більш довгими нейритами у порівнянні з контролем. Клітини, трансфіковані повнорозмірною конструкцією SP35, навпаки, характеризувались підвищеною відповіддю на інгібіторні субстрати, і характеризувались більш короткими нейритами у порівнянні з контролем. Це демонструє, що DN-SP35 діє як конкурентний інгібітор придушення розростання нейритів, викликаних компонентами мієліну. Автори винаходу чекали, що екзогенний, розчинний SP35-FC також зв'яже NgR1 і блокує дію інгібіторних речовин. Як показано на Фіг.7, SP35-FC знижує інгібування розростання нейритів за рахунок OMgr, Nogo66 і MAG.

Приклад 16. Нейропротекторна активність

Рівні кількості щурячих гранулярних нейронів мозочка p6 вміщували в кожну ямку 12-яркового планшета для культури клітин у присутності або за відсутності 50нМ білка sp35-Fc. Дані полі-D-лізінові планшети заздалегідь покривали [дозволяли висохти в них] 10мкг мієліну ЦНС, або 200нг Nogo66, MAG і OMgr або контролем-Fc. Культури нейронів підтримували протягом 1-7 діб при 37°C і 5% CO₂. Нейрони були здоровими і добре росли в контрольних ямках з PBS, з повним витягненням нейритів незалежно від обробки sp35-Fc [визначено за допомогою специфічного нейронального маркера, тубуліну βIII], за оцінкою після 3 діб. За відсутності sp35-Fc нейрони не росли добре в ямках, покритих мієліном, Nogo66, MAG і OMgr. Було мінімальне розростання нейритів [коротких і викривлених], і нейрони виявлялись нездоровими, з округлим тілом клітини і конденсованою ядерною речовиною. Забарвлення DAPI продемонструвало, що число нейронів, які виявляються в даних ямках, було меншим, ніж в контрольних ямках з PBS, що вказувало на втрату нейронів. У присутності sp35-Fc були присутніми довгі нейрити, і нейрони виявлялись здоровими. Забарвлення DAPI демонструвало більше число нейронів в даних ямках у порівнянні з тими, куди не вводили sp35-Fc. Дані підсумовані нижче в таблиці 2.

Таблиця 2

За відсутності sp35-Fc		
висушений субстрат:	OMgr/Nogo/MAG/мієлін	контроль Fc
витягнення нейритів	короткі викривлені	довгі довгасті
морфологія тіла клітини	округла	розпростерта
ядерна речовина	конденсована	прозора
число нейронів в кінці експерименту	знижене	те ж, що в контролі Fc

У присутності sp35-Fc		
висушений субстрат:	OMgp/Nogo/MAG/мієлін	контроль Fc
витагнення нейритів	довгі довгасті	довгі довгасті
морфологія тіла клітини	розпростерта	розпростерта
ядерна речовина	прозора	прозора
число нейронів в кінці експерименту	знижене менше, ніж в контролі FC	те ж, що в контролі Fc

Ці дані вказують на те, що розчинна форма Sp35, наприклад, Sp35-Fc, володіє нейропротекторною активністю.

У спинному мозку щурів з гемітрансекцією (T9, SCT) забарвлення тубуліну β -III зрізів спинного мозку виявляло істотну втрату нейронів в ділянці пошкодження. Рекombінантний вірус, експресуючий sp35, використовували для інфікування тваринних SCT в ділянці пошкодження. Гістологічне забарвлення даних зразків спинного мозку виявляло підвищене число нейронів навколо ділянки пошкодження у порівнянні з контрольною групою, яку інфікували векторним вірусом. Це співвідноситься з експериментальними знахідками *in vitro*, описаними вище, і вказує на подальші нейропротективні властивості, асоційовані з Sp35.

Приклад 17. Sp35 в моделі пошкодження спинного мозку на тваринах

Оскільки Sp35-Fc знижував розростання нейритів, викликане OMgp, Nogo-66 і MAG *in vitro*, автори винаходу чекали, що дана молекула сприяє функціональному відновленню пошкоджень ЦНС *in vivo*. Для підтвердження цього автори вводили Sp35-Fc в спинний мозок підданих гемісекції щурів, тобто, моделі гострої травми ЦНС на тваринах. Як показано на Fig.8 і Fig.9, оброблені Sp35-Fc щури демонстрували значно поліпшене функціональне відновлення у порівнянні з контрольними щурами, обробленими IgG.

Пошкодження спинного мозку і аналіз поведінки проводили таким чином. Всі хірургічні процедури проводили згідно з керівництвом Biogen Institutional Animal Use and Care Committee. Щурів-самців Long Evans (190-210г, Charles River, Wilmington, Массачусетс) піддавали наркозу з використанням 2,5мг/кг мідазоламу в.чер. і 2-3% флуотану в О2. Дорзальну ламінектомію проводили на рівні хребців T6 і T7. Здійснювали дорзальну гемісекцію, повністю перериваючи головний дорзодорсальний і малий дорзодорсальний компоненти кортикоспинального тракту (CST). Негайно після трансекції CST в субарахноїдальний простір вбудовують інтратектальний катетер на рівні T7 і з'єднують його з підготовленим мініосмотичним насосом (Alzet, модель 2004), вбудованим в підшкірний простір. Мініосмотичні насоси доставляли контрольний людський білок ізотипу Hu IgG (5мг/мл, n=5, Pharmingen), PBS (n=3), розчинний білок злиття Hi Sp35-Ig (4,3мг/мл, n=8) з швидкістю 0,25мкл/ч. Після операції ділянку ламінектомії зшивали і скріплювали рану в шкірі. Післяопераційний догляд включав в себе анальгезію (бупренорфін, 0,05мг/кг п.ш.) протягом 3 діб і обробку антибіотиком (ампіцилін 100мг/кг п.ш. два рази на добу) протягом 7 діб після операції. Сечовий міхур спустошували вручну два рази на добу протягом дослідження (28 діб) або до повернення функції (цей момент відмічали). Всі тварини наосліп оцінювали за допомогою системи тестів «відкритого поля» BBB [Basso et al., 1995, J. Neurotrauma 12:1-21; Ono et al., 2003, J. Neurosci. 23:5887-5896]. Щурів оцінювали на добу після трансекції CST (доба 2) і після цього щотижня протягом 4 тижнів з використанням рейтингової шкали локомоції Basso-Beattie-Bresnahan (BBB). Дослідники працювали з різними групами обробки наосліп протягом дослідження.

Приклад 18. Вживаність нейронів і регенерація аксонів в моделі гемісекції руброспинального тракту (RST)

Автори винаходу також досліджували дію обробки Sp35 на регенерацію нейронів в руброспинальному тракті, який безпосередньо бере участь в локомоції.

Дорослих щурів Sprague-Dawley у віці 9 тижнів (200-250г) піддавали анестезії шляхом внутрішньочеревинної ін'єкції кетаміну (80мг/кг) і ксилазину (8мг/кг). З використанням операційного мікроскопа проводили ламінектомію і виявляли сьомий грудний хребець (C7). Після відкриття твердої оболонки проводили правосторонню гемісекцію на рівні спинного мозку C7 з використанням пари пружинних ножиць. Після гемісекції спинного мозку тварини одержували шматок гелевої піни, змішаної з 10мкл 2мкг/мл розчину Sp35-Fc, або з 10мкл 2мкг/мл розчину людського Ig, або з 10мкл PBS, який вміщували зверху ділянки пошкодження. Після операції тварин в кожній групі поділяли для відстеження шляху аксонів і аналізу поведінки. Тваринам, призначеним для відстеження шляху аксонів (n=5 в кожній групі) і аналізу поведінки (n=7 в кожній групі), забезпечували виживання протягом 1 місяця.

Fluoro-Gold (FG, 6% мас/об., Fluorochrome) використали для мічення нейронів RST, аксони яких регенерували, пересікаючи рубець пошкодження, і повторно увійшли в каудальний спинний мозок. За двоє діб до закінчення періоду виживання після пошкодження (1 місяць), тварин піддавали наркозу внутрішньочеревинною ін'єкцією кетаміну (80мг/кг) і ксилазину (8мг/кг). Проводили дорзальну ламінектомію, та ідентифікували сегмент хребта T2. FG в об'ємі 0,5мл вводили вручну в праву частину спинного мозку T2 з використанням шприца Гамільтона. Через двоє діб тварин піддавали анестезії і фіксували летальною дозою кетаміну (150мг/кг) і ксилазину (8мг/кг), і їх перфузували внутрішньосерцево фіз.розчином і далі 400мл фіксуючого розчину, що містить 4% параформальдегіду в 0,1хPBS. Видаляли головний і спинний мозок, фіксували їх після вилучення протягом ночі і потім вміщували в 30% розчин сахарози в фосфатному буфері. З тканин головного і спинного мозку одержували зрізи товщиною 30мм на криостаті і монтували їх в покриті желатином слайди. Число мічених FG нейронів RST на слайді, що відноситься до осередку пошкодження, виражали у вигляді процентної частки від загального числа мічених FG нейронів на контралатеральній інтактній стороні. Дану процентну частку в групах порівнювали статистично з використанням одностороннього дисперсійного аналізу з подальшим розрахунком тесту множинних порівнянь Tukey-Kramer. Як показано в таблиці 3, Sp35-Fc в концентрації 2мкг/мл сприяв виживанню нейронів руброспинального тракту (RST).

Таблиця 3

Обробка	Процент виживання нейронів RST
---------	--------------------------------

	(\pm ст.пом.сер.)
PBS	17,1 \pm 2
Sp35-Fc	31,9 \pm 1,5
Контроль-Fc	14,5 \pm 2,1

Для аналізу поведінки оцінювали застосування передніх кінцівок під час спонтанного дослідження у вертикальному напрямі через місяць після різних способів обробки, як описано [Liu et al., 1999] з невеликими модифікаціями. Щурів вміщували в чистий плексигласовий циліндр (15см в діаметрі і 30см у висоту), де допускали застосування передніх кінцівок для дослідження у вертикальному напрямі протягом 5хв. Проводили підрахунок наступних типів поведінки: (1) незалежне використання лівих (непошкоджених) або правих (непошкоджених) передніх кінцівок для контакту зі стінкою циліндра; і (2) одночасне використання обох передніх кінцівок для контакту зі стінкою циліндра. Поведінку по дослідженню у вертикальному напрямі виражали в плані (1) процентної частки використання лівої (непошкодженої) передньої кінцівки по відношенню до загального числа застосування пошкодженої, непошкодженої і обох кінцівок; (2) процентної частки використання правої (пошкодженої) передньої кінцівки по відношенню до загального числа застосування пошкодженої, непошкодженої і обох кінцівок; і (3) процентної частки використання обох кінцівок по відношенню до загального числа застосування пошкодженої, непошкодженої і обох кінцівок. Відмінності між групами тестували за допомогою одностороннього дисперсійного аналізу з подальшим «post hoc»-аналізом Бонферроні. Оброблені Sp35-Fc тварини характеризувались значно поліпшеною рухливістю передніх кінцівок: 30% використання обох передніх кінцівок у оброблених Sp35-1-Fc тварин у порівнянні з 10% використання обох передніх кінцівок у оброблених контролем-Fc або PBS тварин; 55% використання лівої (непошкодженої) кінцівки у порівнянні з 80% використання у оброблених контролем-Fc або PBS тварин; і 29% використання правої (пошкодженої) кінцівки у порівнянні приблизно з 15% у оброблених контролем-Fc або PBS тварин.

Приклад 19. Sp35-Fc сприяє виживанню клітин ганглію сітківки (RGC) в моделі перетину зорового нерва

Автори винаходу далі підтверджували активність Sp35 з використанням моделі перетину зорового нерва, в якій досліджуються фактори, що впливають на функцію нейронів. У даному дослідженні використовувались молоді статевозрілі самиці щурів Sprague Dawley (SD). Правий зоровий нерв кожної тварини пересікали інтраорбітально в 1,5мм від оптичного диска. Шматочок гелевої губки, просоченої 6% Fluoro-Gold (FG), наносили на щойно пересічену ділянку праворуч позаду від оптичного диска для мічення виживаючих клітин ганглію сітківки (RGC). Тварини, поділені на 6 груп (n=6 в кожній групі), одержували Sp35-Fc, людський IgG1, або просто PBS, шляхом ін'єкції в жовту пляму. Об'єм кожної ін'єкції в жовту пляму становив 4мл, причому дозування кожної ін'єкції дорівнювало 2мг. Ін'єкції в жовту пляму проводили безпосередньо після пересічення зорового нерва.

Всім тваринам забезпечували виживання протягом 1 тижня. За два дні до фіксації тварин пересікали лівий зоровий нерв кожної тварини, і застосовували 6% FG для мічення RGC, що вижили, які служать внутрішнім контролем. Тварин фіксували передозуванням нембуталу, і препарували сітківку в 4% параформальдегіді. Для розділення сітківки на чотири квадранти (верхній, нижній, носовий і висковий) робили чотири радіальних розрізи. Потім сітківку фіксували після препарування в тому ж фіксуючому розчині протягом 1 години, після чого її препарати монтували в слайди з використанням спеціального середовища (Dako). Слайди оцінювали в флуоресцентному мікроскопі з використанням ультрафіолетового фільтра (довжина хвилі збудження=330-380нм). Мічені RGC підраховували по середній лінії кожного квадранта, починаючи з оптичного диска і до периферичного краю сітківки з інтервалами 500мм, з використанням окулярної сітки 200х200мм. Процентну частку тих, що вижили, в результаті кожного виду обробки RGC виражали шляхом порівняння числа RGC, що вижили, в пошкодженому оку з таким в протилежному оку. Всі дані виражали у вигляді середнього значення \pm стандартна помилка середнього. Статистичну значущість оцінювали за допомогою одностороннього дисперсійного аналізу з подальшим «post hoc»-тестом Tukey-Kramer. Відмінності вважали значущими для $p < 0,05$. Оброблені Sp35-Fc тварини характеризувались значущим виживанням нейронів (83%) у порівнянні з тваринами, обробленими контролем-Fc або PBS, які характеризувались виживанням нейронів, що приблизно дорівнює лише 50%.

Інші варіанти здійснення

Інші варіанти здійснення входять в об'єм прикладеної формули винаходу.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> BIOGEN IDEC MA, INC.
MI, SHA
MCCOY, JOHN
PEPINSKY, R. BLAKE
LEE, DANIEL H. S.

<120> БЛОК, ЯКИЙ ЗВ'ЯЗУЄ РЕЦЕПТОР NOGO

<130> A183 PCT

<140> PCT/US04/008323

<141> 2004-03-17

<150> 60/455,756

<151> 2003-03-19

<150> 60/480,241

<151> 2003-06-20

<150> 60/492,057

<151> 2003-08-01

<160> 41

<170> PatentIn Ver. 3.2

<210> 1

<211> 2882

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> модифікована основа

<222> (2361)

<223> а, т, с або g

<220>

<221> модифікована основа

<222> (2366)

<223> а, т, с або g

<220>
<221> МОДИФІКОВАНА ОСНОВА
<222> (2844)
<223> а, т, с або ґ

<220>
<221> МОДИФІКОВАНА ОСНОВА
<222> (2846)
<223> а, т, с або ґ

<220>
<221> МОДИФІКОВАНА ОСНОВА
<222> (2856)
<223> а, т, с або ґ

<220>
<221> МОДИФІКОВАНА ОСНОВА
<222> (2862)
<223> а, т, с або ґ

<220>
<221> МОДИФІКОВАНА ОСНОВА
<222> (2865)
<223> а, т, с або ґ

<400> 1
ggagagacat ggcattgttg accgagccga gcggaccgaa ggccggcccg agatgcaggt 60
gagcaagagg atgctggcgg gggcggtgag gagcatgccc agccccctcc tggcctgctg 120
gcagcccatc ctctgctggt tgctgggctc agtgctgtca ggctcgcca cgggctgccc 180
gccccgctgc gagtgtcccg ccagggaccg cgctgtgctg tgccaccgca agcgctttgt 240
ggcagtcccc gagggcatcc ccaccgagac gcgctgtctg gacctaggca agaaccgcat 300
caaaacgctc aaccaggacg agttcgccag ctcccgcaac ctggaggagc tggagctcaa 360
cgagaacatc gtgagcgccg tggagcccg cgcttcaac aacctcttca acctccggac 420
gctgggtctc gcgagcaacc gectgaagct catcccgcta ggctgttcca ctggcctcag 480
caacctgacc aagctggaca tcagcgagaa caagattgtt atoctactgg actacatgtt 540
tcaggacctg tacaacctca agtcaactga ggttggcgac aatgacctcg tctacatctc 600
tcaccgctcc ttacggcgcc tcaacagcct ggagcagctg acgctggaga aatgcaacct 660
gacctccate cccaccgagg cgctgtccca ctgacggccc tcatgctctt gaggtccggg 720
caacctcaaca tcaatgccac cgggactact ccttcaagag gctctaccga ctcaaggctc 780
tggagatccc cactggccct acttgagcac catgacacccc aactgctctt acggcctcaa 840
cctgacgtcc ctgtccatca cacaactgaa ctgacacgct gtgcccctct ggccgtcccg 900
cacctagtct atctccgctt cctcaacctc tctacacccc catcagcacc attgagggct 960
ccatgttgca tgagctgtc cggtccagga gatccagctg gtggcgggcg agctggccgt 1020
ggtggagccc tatgcttccg cggcctcaac taacctcgcg tgctcaatgt ctctggcaac 1080
pactgaccac actggaggaa tcagtcttcc actcggtggg caacctggag aqactcacc 1140
tggaactcaa cccgctggcc tgcagctgtc ggctcctgtg gggttccggc gccgctggcg 1200
gctcaacttc aaccggcagc agcccaactg cccacgcccg agtttgtcca gggcaaggag 1260
ttcaaggact tccctgatgt ctactgccca actactcaac ctgcccgcgc gcccgcatcc 1320
gggaccgcag gccacgagg tgtttgtgga caggggccaac acggtgcagt ttgtgtgctg 1380
cgcgatggcg acccgccgcc cgcctacttc tgctctcaac cccgaaacac ctggtctcag 1440
ccaagagcaa tggggcgctc acagtcttcc ctgatgcaag ctggagggtc gctacgcca 1500
ggtacaggac aacggcacgt acctgtgcat cgcgcgcaac gcggcgggca acgactccat 1560
gcccgcacca ctgcatgtgc gcagctactc gcccgactgg ccccatcagc ccaacaagac 1620
cttgcctttc atctccaaac agccggcgga gggagaggcc aacagcacc gcgccactgt 1680
gcctttcccc ttgacatca agacctcat catgccacc acctagggtc tcatctcttt 1740
cctggcgctc gtcctcttct gctggtgtct gctgtttctc tggagccggg gcaagggcaa 1800
cacaagacac aacatcgaga tcgagtatgt gcccgaaaag tcggacgcag gcatcagctc 1860
cgccgacgcy ccccgcaagt tcaacatgaa gatgatatga ggccggggcg gggggcaggg 1920
acccccggcg ggccggcgag gggagggggc ctggccgcca cctgctcact ctccagtctt 1980
tcccacctcc tccctacctc tctacacag ttctcttctt cctcccgcc tccgtccctc 2040
gctgcccccc gccagccctc accacctgac ctcttctac caggacctca gaagccaga 2100
ctgggggacc ccacctacac aggggcattg acagactgga gttgaaagcc gacgaaccga 2160
cacgcgcgag agtcaataat tcaataaaaa agttacgaac ttctctgtta acttgggttt 2220
caataattat ggaattttat gaaaacttga aataataaaa agagaaaaaa actatttctt 2280
atagctagt cgaatgcaaa cttttgacgt cctgattgct ccagggccct ctccaactc 2340
agtctctgt tttctcttct nctctnctcc tcttctctct cctttctctt ctcttcccc 2400
agtggggagg gatcactcag gaaaacagga aaggagggtc cagcccccac cactcgcca 2460
ccccgcccga ggcacatca ggcagaggct agggggcagg cctgggcccga gctccgggct 2520

ggctttttgc agggcgagg tggaggggac aggtctgccc atgggggtgg gagcctgtct 2580
gctgggctgc caggcgccac cactgcaagg ggtgggagcc tggctcggt gtgctgaga 2640
ctctggacag aggtctgggt cctcctgggg gacagcacag tcagtggaga gagccagggg 2700
ctggaggtgg ggcacacccc agcctctggt ccagctctgt ctgctcaact gctgtgtgga 2760
cctcaagcag gtcactggc ctctctgggc ctcagtctcc acatctgtac aaatgggaac 2820
attaccccc gccctgcta cctnanagg ctgtnttgag gnatngatga gatgatgtat 2880
gt 2882
:

<210> 2
<211> 614
<212> БЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 2
Met Leu Ala Gly Gly Val Arg Ser Met Pro Ser Pro Leu Leu Ala Cys
1 5 10 15

Trp Gln Pro Ile Leu Leu Leu Val Leu Gly Ser Val Leu Ser Gly Ser
 20 25 30
 Ala Thr Gly Cys Pro Pro Arg Cys Glu Cys Ser Ala Gln Asp Arg Ala
 35 40 45
 Val Leu Cys His Arg Lys Arg Phe Val Ala Val Pro Glu Gly Ile Pro
 50 55 60
 Thr Glu Thr Arg Leu Leu Asp Leu Gly Lys Asn Arg Ile Lys Thr Leu
 65 70 75 80
 Asn Gln Asp Glu Phe Ala Ser Phe Pro His Leu Glu Glu Leu Glu Leu
 85 90 95
 Asn Glu Asn Ile Val Ser Ala Val Glu Pro Gly Ala Phe Asn Asn Leu
 100 105 110
 Phe Asn Leu Arg Thr Leu Gly Leu Arg Ser Asn Arg Leu Lys Leu Ile
 115 120 125
 Pro Leu Gly Val Phe Thr Gly Leu Ser Asn Leu Thr Lys Leu Asp Ile
 130 135 140
 Ser Glu Asn Lys Ile Val Ile Leu Leu Asp Tyr Met Phe Gln Asp Leu
 145 150 155 160
 Tyr Asn Leu Lys Ser Leu Glu Val Gly Asp Asn Asp Leu Val Tyr Ile
 165 170 175
 Ser His Arg Ala Phe Ser Gly Leu Asn Ser Leu Glu Gln Leu Thr Leu
 180 185 190
 Glu Lys Cys Asn Leu Thr Ser Ile Pro Thr Glu Ala Leu Ser His Leu
 195 200 205
 His Gly Leu Ile Val Leu Arg Leu Arg His Leu Asn Ile Asn Ala Ile
 210 215 220
 Arg Asp Tyr Ser Phe Lys Arg Leu Tyr Arg Leu Lys Val Leu Glu Ile
 225 230 235 240

Ser His Trp Pro Tyr Leu Asp Thr Met Thr Pro Asn Cys Leu Tyr Gly
 245 250 255

Leu Asn Leu Thr Ser Leu Ser Ile Thr His Cys Asn Leu Thr Ala Val
 260 265 270

Pro Tyr Leu Ala Val Arg His Leu Val Tyr Leu Arg Phe Leu Asn Leu
 275 280 285

Ser Tyr Asn Pro Ile Ser Thr Ile Glu Gly Ser Met Leu His Glu Leu
 290 295 300

Leu Arg Leu Gln Glu Ile Gln Leu Val Gly Gly Gln Leu Ala Val Val
 305 310 315 320

Glu Pro Tyr Ala Phe Arg Gly Leu Asn Tyr Leu Arg Val Leu Asn Val
 325 330 335

Ser Gly Asn Gln Leu Thr Thr Leu Glu Glu Ser Val Phe His Ser Val
 340 345 350

Gly Asn Leu Glu Thr Leu Ile Leu Asp Ser Asn Pro Leu Ala Cys Asp
 355 360 365

Cys Arg Leu Leu Trp Val Phe Arg Arg Arg Trp Arg Leu Asn Phe Asn
 370 375 380

Arg Gln Gln Pro Thr Cys Ala Thr Pro Glu Phe Val Gln Gly Lys Glu
 385 390 395 400

Phe Lys Asp Phe Pro Asp Val Leu Leu Pro Asn Tyr Phe Thr Cys Arg
 405 410 415

Arg Ala Arg Ile Arg Asp Arg Lys Ala Gln Gln Val Phe Val Asp Glu
 420 425 430

Gly His Thr Val Gln Phe Val Cys Arg Ala Asp Gly Asp Pro Pro Pro
 435 440 445

Ala Ile Leu Trp Leu Ser Pro Arg Lys His Leu Val Ser Ala Lys Ser
 450 455 460

Asn Gly Arg Leu Thr Val Phe Pro Asp Gly Thr Leu Glu Val Arg Tyr
 465 470 475 480

 Ala Gln Val Gln Asp Asn Gly Thr Tyr Leu Cys Ile Ala Ala Asn Ala
 485 490 495

 Gly Gly Asn Asp Ser Met Pro Ala His Leu His Val Arg Ser Tyr Ser
 500 505 510

 Pro Asp Trp Pro His Gln Pro Asn Lys Thr Phe Ala Phe Ile Ser Asn
 515 520 525

 Gln Pro Gly Glu Gly Glu Ala Asn Ser Thr Arg Ala Thr Val Pro Phe
 530 535 540

 Pro Phe Asp Ile Lys Thr Leu Ile Ile Ala Thr Thr Met Gly Phe Ile
 545 550 555 560

 Ser Phe Leu Gly Val Val Leu Phe Cys Leu Val Leu Leu Phe Leu Trp
 565 570 575

 Ser Arg Gly Lys Gly Asn Thr Lys His Asn Ile Glu Ile Glu Tyr Val
 580 585 590

 Pro Arg Lys Ser Asp Ala Gly Ile Ser Ser Ala Asp Ala Pro Arg Lys
 595 600 605

 Phe Asn Met Lys Met Ile
 610

<210> 3

<211> 59

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: праймер

<400> 3

tcgagaaaaa agatcgatcat cctgctagac tctcttgaag tctagcagga tgacgatca 59

<210> 4
<211> 9
<212> БЛЮК
<213> Homo sapiens

<400> 4
Arg Arg Ala Arg Ile Arg Asp Arg Lys
1 5

<210> 5
<211> 9
<212> БЛЮК
<213> Homo sapiens

<400> 5
Lys Lys Val Lys Val Lys Glu Lys Arg
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> БЛЮК
<213> Homo sapiens

<400> 6
Arg Arg Leu Arg Leu Arg Asp Arg Lys
1 5

}

<210> 7
<211> 9
<212> БЛЮК
<213> Homo sapiens

<400> 7
Arg Arg Gly Arg Gly Arg Asp Arg Lys
1 5

<210> 8
<211> 9

<212> БЛЮК
<213> Homo sapiens

<400> 8
Arg Arg Ile Arg Ala Arg
1 5

<210> 9
<211> 6
<212> БЛЮК
<213> Homo sapiens

<400> 9
Met Gln Val Ser Lys Arg
1 5

<210> 10
<211> 6
<212> БЛЮК
<213> Homo sapiens

<400> 10
Leu Ser Pro Arg Lys His
1 5

<210> 11
<211> 6
<212> БЛЮК
<213> Homo sapiens

<400> 11
Ile Thr Pro Lys Arg Arg
1 5

↓
<210> 12
<211> 6
<212> БЛЮК
<213> Homo sapiens

<400> 12
Ala Cys Pro His His Lys
1 5

<210> 13
<211> 6
<212> БЛЮК
<213> Homo sapiens

<400> 13
Val Ser Pro Arg Lys His
1 5

<210> 14
<211> 23
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: праймер

<400> 14
aaggccacagc aggtgtttgt gga 23

<210> 15
<211> 24
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: праймер

<400> 15
tactcgatct cgatgtttgt cttt 24

<210> 16
<211> 37
<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: праймер

<400> 16

cagcaggctcg acgcggccgc atgctggcgg ggggcgt 37

<210> 17

<211> 29

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 17

cagcaggctcg acctcgcccg gctggttg 29

<210> 18

<211> 37

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: праймер

<400> 18

aattaagaat tcacgggctg ccgccccgc tgcgagt 37

<210> 19

<211> 44

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: праймер

<400> 19

tatatattcta gatcactcgc ccggctgggtt ggagatgaaa gcga 44

<210> 20

<211> 44
 <212> дяк
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: праймер

 <400> 20
 cttgacacgg gatccgcggc cgcattgctgg cggggggcgt gagg 44

 <210> 21
 <211> 45
 <212> дяк
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: праймер

 <400> 21
 gcagcggggc gggcagcccg tggccgagcc tgacagcact gagcc 45

 <210> 22
 <211> 44
 <212> дяк
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: праймер

 <400> 22
 cttgacacgg gatccgcggc cgcattgctgg cggggggcgt gagg 44

 <210> 23
 <211> 45
 <212> дяк
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: праймер
 <400> 23
 gtcccgcatg cgggcggggc ccgagcctga cagcactgag cccag 45
 <210> 24
 <211> 30
 <212> дяк
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: праймер

 <400> 24
 atattctaga atgctggcgg gggcggtgag 30

 <210> 25
 <211> 30
 <212> дяк
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: праймер

 <400> 25
 atatactagt gtcgttgccg cccgcgttgg 30

 <210> 26
 <211> 46
 <212> дяк
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: праймер

 <400> 26
 cccagcaggt gtttgaggac gaggatcta gggccgcgga tccctg 46

 <210> 27
 <211> 46
 <212> дяк
 <213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: праймер
<400> 27
cagggatccg cggcctaga tcaactgtcc acaaacacct gctggg 46

<210> 28
<211> 43
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: праймер
<400> 28
cgccgcgcac cgggtgaat tcgcgcgcgc catccgggac cgc 43

<210> 29
<211> 43
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: праймер
<400> 29
gcgggtcccg atgcgggcgc ggaattcacc cgggtgcgcg gcg 43

<210> 30
<211> 43
<212> ДНК
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: праймер
<400> 30
cgccgcgcac cgggtgaat tcgccagca ggtgtttgtg gac 43

<210> 31

<211> 43
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: праймер

 <400> 31
 gtccacaaac acctgctggg cgaattcacc cgggtgcgcg gcg 43

 <210> 32
 <211> 46
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: праймер

 <400> 32
 catcctctgg ctctcaccg aaaaggtact ggtctcagcc aagagc 46

 <210> 33
 <211> 46
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: праймер

 <400> 33
 gctcttgggt gagaccagta ccttttcggg tgagagccag aggatg 46

 <210> 34
 <211> 5
 <212> БЛОК
 <213> Homo sapiens

 <400> 34
 Ser Pro Arg Lys His
 1 5
 <210> 35
 <211> 31
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: праймер

 <400> 35
 aattaagcgg cgcgatgctg gcggggggcg t 31

 <210> 36
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: праймер

 <400> 36
 aattaagcgg ccgctttgtc atgt 24

 <210> 37
 <211> 32
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: праймер

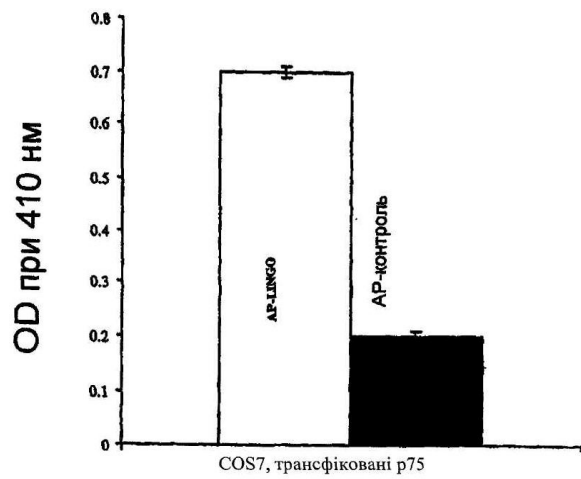
 <400> 37
 gattactcga gatgctggcg gggggcgtga gg 32

 <210> 38
 <211> 36
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

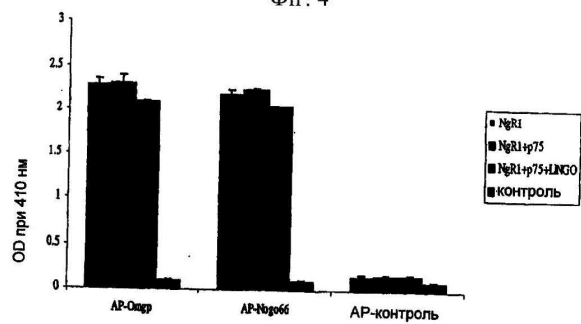
(Продовження)

1. *Journal of the American Medical Association*, 1997; 277: 1039-1043.

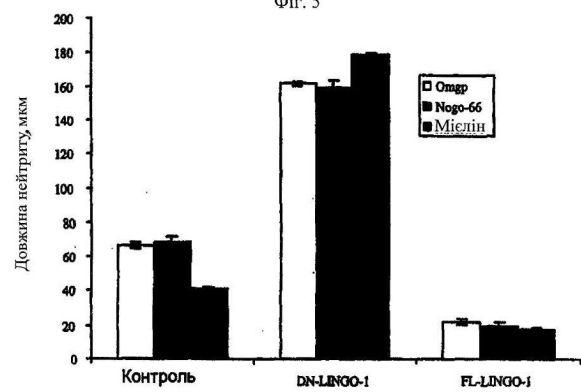
LRR-повтори Основна ділянка



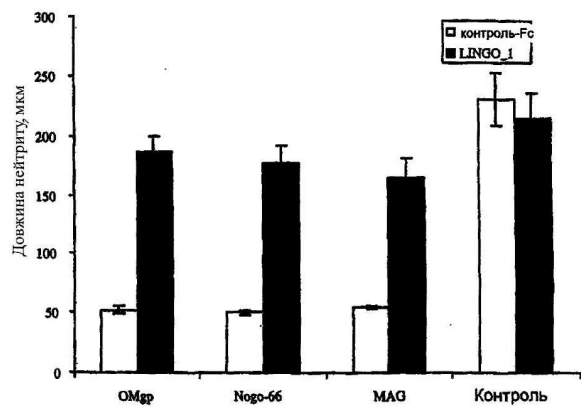
Фиг. 4



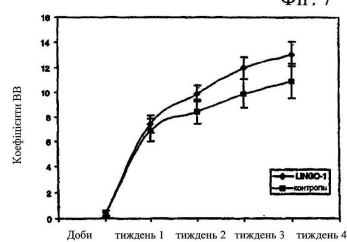
Фиг. 5



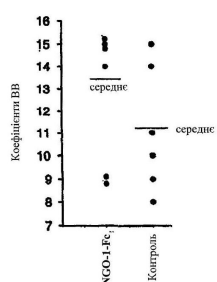
Фиг. 6



Фіг. 7



Фіг. 8



Фіг. 9