

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



03 077204 00

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 63877204 68888688

Folios: 262

Fecha (ARD): 2003-09-04 16:17:12

Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTA

Dependencia: 2028 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

- 1
- ☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad
- ☐ Capítulo I ☒ Capítulo II

2 SOLICITANTE (71)	Nombre: The Procter & Gamble Company Dirección: One Procter & Gamble Plaza Nacionalidad o Domicilio: Cincinnati, Ohio 45202, Estados Unidos de América. Lugar de Constitución: Ohio, Estados Unidos de América Teléfono: Fax: E-mail:	IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número
3 REPRESENTANTE O APODERADO (74)	Nombre: JIMENA ESCOBAR URIBE Dirección: Cra. 11A No. 94-76 (Of. 305) Teléfono: 6 162051/61 Fax: 6 161889 E-mail: tm-patent@escobaruribe.com	IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número 39.779.452T.P 68228
4 INVENTOR (ES) (72)	Nombre: VER ANEXOS Dirección: Nacionalidad o domicilio:	

5 **PCT (86)**

Solicitud Internacional No. PCT/US02/07476 Fecha Marzo 6, 2002
Publicación Internacional No. WO 02/069908 A3 Fecha Septiembre 12, 2002

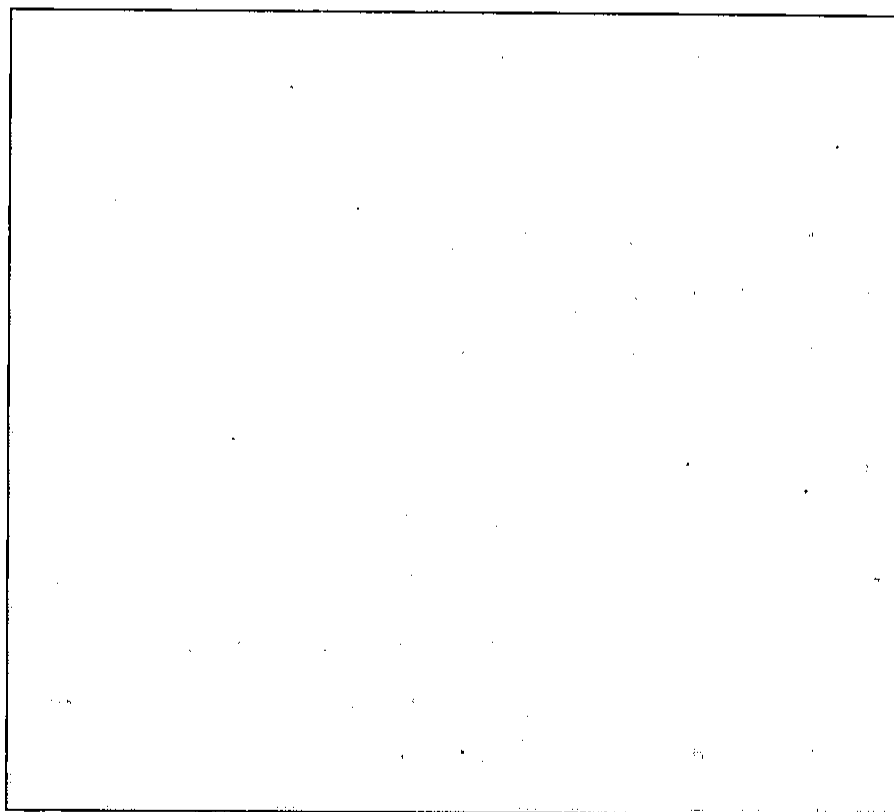
6 **TÍTULO (54)** Métodos para la identificación de compuestos para regular la masa o función muscular utilizando los receptores del factor liberador de corticotropina

7 **Clasificación Internacional (51)** G 01N 33/53, A61K 39/00, /395

8 Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen <u>Estados Unidos de América</u>	(32) Fecha <u>Marzo 6, 2001</u>	(31) Número de Solicitud <u>09/799,978</u>
--	---	------------------------------------	---

9 **Comprobante de pago No.** 03 - 60,373 **Fecha** Agosto 26, 2003

- ☐ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica Prot. 15.698
- ☐ Poderes si fuere el caso **Protocolo No. 15.698**
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia de contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de deposito del material biológico
- ☐ Arte final 12 X 12 .
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☐ Otros

11 FIGURA CARACTERÍSTICA**12 Solicito la concesión de la patente**NOMBRE: JIMENA ESCOBAR URIBEFIRMA: 

C.C. 39.779.452 DE Usaquén T.P. 68.228

As. 2587/PCT

ANEXOS

INVENTORES

1.)

ROBERT JOSEPH ISFORT

(Fairfield, Ohio 45014, Estados Unidos de América);

2.)

RUSSEL JAMES SHELDON

(Fairfield, Ohio 45014, Estados Unidos de América);

3

2587

NIT : 800176089-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 03 - 60,373
FECHA : AGOSTO 26 DE 2003

Radicacion : 83877204 00000000 Folios: 26
Fecha (AMD): 2003-09-04 16:17:12
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENT
Dependencia: 2828 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

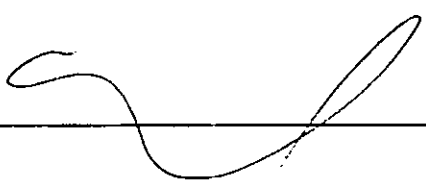
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ESCOBAR URIBE ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	8813266	25/08/2003	4,275,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	CONTENIDO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 -TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	400,000.00
		TOTAL :	\$ 400,000.00

SON: CUATROCIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Solicito expresamente a nombre de la sociedad THE PROCTER & GAMBLE COMPANY, sociedad constituida de conformidad con las leyes del estado de Ohio, Estados Unidos de América, domiciliada en One Procter & Gamble Plaza, Cincinnati, Ohio 45202, Estados Unidos de América, el otorgamiento de Patente para la invención titulada "Métodos para la identificación de compuestos para regular la masa o función muscular utilizando los receptores del factor liberador de corticotropina".

Clase: G 01


JIMENA ESCOBAR URIBE
C.C. 39.779.452 de Usaquen
T.P. 68.228

APOSTILLE

(Convention de la Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United States of America

This public document

2. has been signed by GREGORY HARTMANN

3. acting in the capacity of Clerk of Court of Common Pleas

4. bears the seal/stamp of Court of Common Pleas, Hamilton County

CERTIFIED

5. at Columbus, Ohio

6. August 21, 2003

7. by the Secretary of State of Ohio.

8. No. 138486

9. Seal/Stamp:

10. Signature:



J. Kenneth Blackwell
J. Kenneth Blackwell
Secretary of State of Ohio

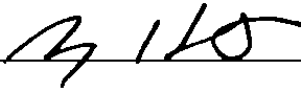
This certification certifies only the authenticity of the signature of the official who signed the document, the capacity in which that official acted, and where appropriate, the identity of the seal or stamp which the document bears. This certification does not imply that the contents of the document(s) are correct, nor that they have the approval of this office.

STATE of OHIO }
COUNTY OF HAMILTON } ss.

I, GREGORY HARTMANN Clerk of the Common Pleas Court,
the same being a court of record for aforesaid county, having by law a seal do hereby certify that
JUDITH BOZILE

Esq., whose name is subscribed to the attached certificate was at
the time a NOTARY PUBLIC, duly commissioned and sworn, and at the time of taking said acknowledgement,
proof or affidavit, was residing in said county, and was, as such, an officer of said state, duly authorized by
the laws thereof to take and certify the same, as well as to take and certify the proof and acknowledgement
of deeds and other instruments in writing to be recorded in said state, and that full faith and credit are and
ought to be given to his official acts; and I further certify that I am well acquainted with his handwriting, and
verily believe that the signature to the attached certificate is his genuine signature. I further certify that the
filing of the impression of the notary seal is not required in this state.

IN WITNESS WHEREOF, I have hereunto set my hand and affixed my
official seal this 8TH day of AUGUST, 20 03



GREGORY HARTMANN

Clerk of Common Pleas Court, Hamilton County, Ohio

P&G

I, Judith Bozile, a Notary Public in and for the State of Ohio, do certify that I have carefully compared with the original documents the attached copies thereof. They are complete, full, true and exact copies of the original documents they purport to reproduce.

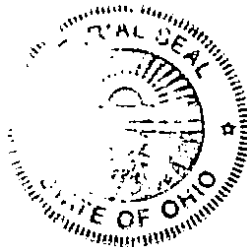
UNITED STATES OF AMERICA)

STATE OF OHIO)

COUNTY OF HAMILTON)

The 03 day of July 2003.


JUDITH BOZILE
NOTARY PUBLIC, STATE OF OHIO
MY COMMISSION EXPIRES
APRIL 28, 2004



JUDITH BOZILE
Notary Public, State of Ohio
My Commission Expires Apr. 28, 2004

GLOBAL GENERAL ASSIGNMENT

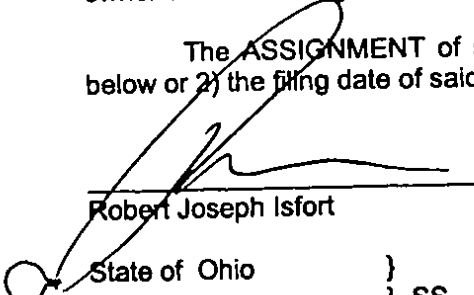
WHEREAS I/we, the undersigned inventor(s) herewith declare that I am the sole inventor/we are the joint inventors and I/we have made a certain invention as set forth in a patent application (including industrial designs and utility models) entitled **Methods For Identifying Compounds for Regulating Muscle Mass or Function using Corticotropin Releasing Factor Receptors**, Attorney's Docket No. 8448 and filed in the United States Patent Office as Number 09/799,978, on March 6, 2001 (the hereinafter named assignee being authorized to insert said Number and filing date when ascertained):

Robert Joseph Isfort of Fairfield, County of Butler, State of Ohio;
Russell James Sheldon of Fairfield, County of Butler, State of Ohio;

I/We made said invention set forth in said patent application while employed by, or otherwise under an obligation to assign said invention to The Procter & Gamble Company or one of its Affiliates (including, Procter & Gamble Asia Pacific Ltd.; Procter & Gamble Australia Pty. Ltd.; Procter & Gamble Technology (Beijing) Co., Ltd.; Procter & Gamble Far East, Inc.; Procter & Gamble Hong Kong Ltd.; Procter & Gamble India, Ltd.; Procter & Gamble Indonesia; Procter & Gamble Korea, Inc.; Procter & Gamble Malaysia Sdn. Bhd.; Procter & Gamble Philippines, Inc.; Procter & Gamble Taiwan Ltd; Procter & Gamble Manufacturing (Thailand) Ltd.; Procter & Gamble (Guangzhou) Ltd.; Procter & Gamble de Mexico; and Procter & Gamble de Venezuela) and acknowledge my/our obligation at the time the invention was made to assign said invention to The Procter & Gamble Company or the Affiliate, respectively. Pursuant to said obligation and (in the case of employment by or obligation to the Affiliate) at the request of the Affiliate, I/we assign to The Procter & Gamble Company, its legal representatives, successors and assigns, the entire right, title and interest (including the right to claim priority of the filing date of said patent application under international conventions) in said invention as set forth in said patent application, and in all patents of the United States and of any other country which may be issued for said invention, as fully and completely as the same would have been held by me/us had this assignment not been made. The entire right, title and interest shall vest irrevocably in The Procter & Gamble Company. I/We further agree upon request, without additional compensation but at no expense to me/us, to execute or assent to applications, and to execute all other legal documents as may be necessary or desirable to vest the enjoyment of the rights assigned to The Procter & Gamble Company, its legal representatives, successors and assigns, or as said Company may direct.

I/We request the Commissioner of Patents and Trademarks to issue any Letters Patent of the United States which may be issued for said invention herein assigned and as set forth in U. S. Application Serial Number 09/799,978 (the hereinafter named assignee being authorized to insert said U.S. Serial Number when ascertained) to The Procter & Gamble Company, its legal representatives, successors or assigns, as the sole owner of the entire right, title, and interest in said patent and the invention and the invention covered thereby.

The ASSIGNMENT of said invention is effective as of the earlier of 1) the date of execution shown below or 2) the filing date of said patent application.


Robert Joseph Isfort

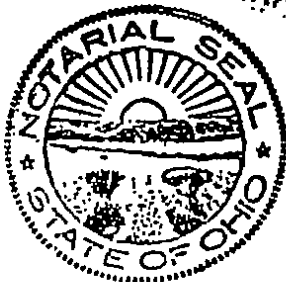
State of Ohio

County of Warren

} SS

5/17/01
Date

On this 17th day of May, 2001, before me personally appeared Robert Joseph Isfort, to me known to be the person named in and who executed the above instrument, and acknowledged to me that he/she executed the same for the uses and purposes therein set forth.




Notary Public/Witness

LORI L. DEATHERAGE, Notary Public
In and for the State of Ohio
My Commission Expires February 1, 2003


Russell James Sheldon

5/18/01
Date

State of Ohio }
County of Warren } SS

On this 18th day of May, 2001, before me personally appeared Russell James Sheldon, to me known to be the person named in and who executed the above instrument, and acknowledged to me that he/she executed the same for the uses and purposes therein set forth.




Notary Public/Witness

LORI L. DEATHERAGE, Notary Public
In and for the State of Ohio
My Commission Expires February 1, 2003

REVISED 7/1/2000

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
12 September 2002 (12.09.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/069908 A3(51) International Patent Classification: G01N 33/53,
33/566, A61K 39/00, 39/395, C07K 16/28, 16/46

(21) International Application Number: PCT/US02/07476

(22) International Filing Date: 6 March 2002 (06.03.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 09/799,978 6 March 2001 (06.03.2001) US

(71) Applicant: THE PROCTER & GAMBLE COMPANY
[US/US]; One Procter & Gamble Plaza, Cincinnati, OH
45202 (US).(72) Inventors: ISFORT, Robert, Joseph; 2395 Resor Road,
Fairfield, OH 45014 (US). SHELDON, Russell, James;
5023 Winton Road, Fairfield, OH 45014 (US).(74) Agents: REED, T. David et al.; The Procter & Gam-
ble Company, 5299 Spring Grove Avenue, Cincinnati, OH
45217-1087 (US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT (util-
ity model), AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA,CH, CN, ~~CR~~ CR, CU, CZ (utility model), CZ, DE (util-
ity model), DE, DK (utility model), DK, DM, DZ, EC, EE
(utility model), EE, ES, FI (utility model), FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK (utility model), SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA,
UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

Published:

- with International search report
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

(88) Date of publication of the international search report:
20 March 2003For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.(54) Title: METHODS FOR IDENTIFYING COMPOUNDS FOR REGULATING MUSCLE MASS OR FUNCTION USING
CORTICOTROPIN RELEASING FACTOR RECEPTORS

(57) Abstract: Screening methods for identifying compounds that bind to or activate corticotropin releasing factor2 receptors (CRF2R) and regulate or potentially regulate skeletal muscle mass or function in vivo. Also disclosed are screening methods for identifying compounds that prolong or augment the activation of CRF2Rs or of CRF2R signal transduction pathways, increase CRF2R or increase CRF expression are provided. Pharmaceutical compositions comprising CRF2R agonists, antibodies to CRF2R and methods for increasing skeletal muscle mass or function or for the treatment of skeletal muscle atrophy using CRF2R as the target for intervention and methods for treatment of muscular dystrophies are described.

WO 02/069908 A3



(10) International Publication Number
WO 02/069908 A2

[Continued on next page]

(S7) Abstract: Screening methods for identifying compounds that bind to or activate corticotropin releasing factor2 receptors (CRF2R) and regulate or potentially regulate skeletal muscle mass or function in vivo. Also disclosed are screening methods for identifying compounds that prolong or augment the activation of CRF2Rs or of CRF2R signal transduction pathways, increase CRF2R or increase CRF expression are provided. Pharmaceutical compositions comprising CRF2R agonists, antibodies to CRF2R and methods for increasing skeletal muscle mass or function or for the treatment of skeletal muscle atrophy using CRF2R as the target for intervention and methods for treatment of muscular dystrophies are described.

WO 02/069908 A2

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/07476

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : G01N 33/53, 33/566; A61K 39/00, 39/395; C07K 16/28, 16/46

US CL : 435/7.1, 7.2; 436/501; 424/143.1, 198.1; 514/2; 530/350, 387.9, 388.22

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 435/7.1, 7.2; 436/501; 424/143.1, 198.1; 514/2; 530/350, 387.9, 388.22

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PERRIN, MH et al., "Diverse roles of corticotropin releasing factor receptors and their ligands", American Zoologist December 2000, Vol 40, Number 6, pages 1168-1169.	1-29
A	VALDENAIRE, O. et al., "A new functional isoform of the human CRF2 receptor for corticotropin releasing factor", Biochimica et Biophysica Acta, 1997, vol. 1352, pages 129-132.	1-29
A	PALCHAUDHURI, M.R. et al., "Isolation and pharmacological characterization of two functional splice variants of corticotropin-releasing factor type 2 receptor from <i>Tupaia belangeri</i> ", Journal of Neuroendocrinology, 1999, Vol. 11, pages 419-428.	1-29
X	GRIGORIADIS, D.B. et al., "125I-Tyr0-Saravagine: A novel high affinity radioligand for the pharmacological and biochemical study of human corticotropin-releasing factor 2 alpha receptors", Molecular Pharmacology, 1996, Vol. 50 pages 679-686.	1-10, 13, 16 14, 15
X	US, 5,766,203 A (LOVENBERG et al.) 28 July, 1998 entire document, especially col. 2 lines 54-65, col. 3, col. 21 lines 5-20.	1-13, 16, 18, 30-34 14, 15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"T" earlier application or patent published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later documents published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application are cited to understand the principles or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"A"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 December 2002 (12.12.2002)

Date of mailing of the international search report

06 JAN 2003

Name and mailing address of the ISA/US

Commissioner of Patents and Trademarks
Box PCT
Washington, D.C. 20531

Authorized officer

Valerie Bed-Harris for

Facsimile No. 703/305-3230

Telephone No. 703-308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/07476

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ☒	SUMAN-CHAUHAN, N. et al., "Expression and characterization of human and rat CRF 2 alpha receptors", Eur. J. Pharmacol., 1999, Vol. 379, pages 219-227.	19-16
X ☒	REYES, T.M. et al., "Urocortin II: A member of the corticotropin-releasing factor (CRF) neuropeptide family that is selectively bound by type 2 CRF receptors", Proc. Nat. Acad. Sci. USA Vol. 98, No. 5, pages 2843-2848.	33, 35

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/07476

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
MEDLINE, EAST:
search terms: urocortin II, CRFR, CRFZR

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1994)

**MÉTODOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS PARA REGULAR LA
MASA O FUNCIÓN MUSCULAR UTILIZANDO LOS RECEPTORES DEL FACTOR
LIBERADOR DE CORTICOTROPINA**

Robert J. Isfort

Russell J. Sheldon

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a métodos para identificar compuestos candidato para regular la masa o función musculoesquelética o para regular la actividad o expresión de un receptor del factor-2 liberador de corticotropina (CRF₂R). La invención se refiere también a métodos para el tratamiento de la atrofia musculoesquelética o a los métodos para inducir la hipertrofia musculoesquelética utilizando el CRF₂R como el objetivo de la intervención, y a los métodos para tratar las distrofias musculares utilizando como objetivos al CRF₂R y al receptor del factor-1 liberador de corticotropina (CRF₁R).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

CRFR y ligandos

Hasta la fecha se han identificado dos factores liberadores de la corticotropina (el CRF₁R y CRF₂R) que pertenecen a la clase de receptor acoplado a la proteína G (GPCR). La activación agonista del CRF₁R o del CRF₂R provoca la activación G_{αs} de la adenilato ciclasa. La adenilato ciclasa cataliza la formación del AMPc, el cual a su vez, tiene múltiples efectos, entre los que se incluyen la activación de la proteína cinasa A, la liberación de calcio intracelular y la activación de la proteína cinasa activada por mitógeno (cinasa MAP). En otros estudios, el aumento en la síntesis de fosfato de inositol intracelular, después de la activación del agonista de los receptores CRF, sugiere que los CRFR también se acoplan con la G_{αq}.

El CRF₁R y el CRF₂R se han clonado a partir de humanos, ratas, ratones, pollos, vacas, bagras, ranas y ovejas. Cada uno del CRF₁R y del CRF₂R tienen patrones de distribución únicos. En los seres humanos se han clonado tres isoformas, alfa, beta y gama del receptor CRF₂R. En ratas se han identificado los homólogos del CRF₂R alfa y beta.

Se conocen varios ligandos/agonistas de los CRFR. El factor liberador de corticotropina (u hormona, CRF o CRH) se une al CRF₁R y al CRF₂R y los activa. El CRF es un importante modulador de las respuestas del cuerpo al estrés. Este péptido de 41 aminoácidos gobierna un conjunto de procesos neuronales, endocrinos e inmunitarios como regulador primario del eje hormonal hipotálamo-hipófisis-suprarrenal (o eje HPA, por sus siglas en inglés). Además, hay una importante homología de secuencia entre el CRF y el péptido sauvagina de anfibio, así como con el péptido urotensina de teleosteos, los

**MÉTODOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS PARA REGULAR LA
MASA O FUNCIÓN MUSCULAR UTILIZANDO LOS RECEPTORES DEL FACTOR
LIBERADOR DE CORTICOTROPINA**

Robert J. Isfort

Russell J. Sheldon

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a métodos para identificar compuestos candidato para regular la masa o función musculoesquelética o para regular la actividad o expresión de un receptor del factor-2 liberador de corticotropina (CRF₂R). La invención se refiere también a métodos para el tratamiento de la atrofia musculoesquelética o a los métodos para inducir la hipertrofia musculoesquelética utilizando el CRF₂R como el objetivo de la intervención, y a los métodos para tratar las distrofias musculares utilizando como objetivos al CRF₂R y al receptor del factor-1 liberador de corticotropina (CRF₁R).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

CRFR y ligandos

Hasta la fecha se han identificado dos factores liberadores de la corticotropina (el CRF₁R y CRF₂R) que pertenecen a la clase de receptor acoplado a la proteína G (GPCR). La activación agonista del CRF₁R o del CRF₂R provoca la activación G_{αs} de la adenilatociclasa. La adenilatociclasa cataliza la formación del AMPc, el cual a su vez, tiene múltiples efectos, entre los que se incluyen la activación de la proteína cinasa A, la liberación de calcio intracelular y la activación de la proteína cinasa activada por mitógeno (cinasa MAP). En otros estudios, el aumento en la síntesis de trifosfato de inositol intracelular, después de la activación del agonista de los receptores CRF, sugiere que los CRFR también se acoplan con la G_{αq}.

El CRF₁R y el CRF₂R se han clonado a partir de humanos, ratas, ratones, pollos, vacas, bagres, ranas y ovejas. Cada uno del CRF₁R y del CRF₂R tienen patrones de distribución únicos. En los seres humanos se han clonado tres isoformas, alfa, beta y gama del receptor CRF₂R. En ratas se han identificado los homólogos del CRF₂R alfa y beta.

Se conocen varios ligandos/agonistas de los CRFR. El factor liberador de corticotropina (u hormona, CRF o CRH) se une al CRF₁R y al CRF₂R y los activa. El CRF es un importante modulador de las respuestas del cuerpo al estrés. Este péptido de 41 aminoácidos gobierna un conjunto de procesos neuronales, endocrinos e inmunitarios como regulador primario del eje hormonal hipotálamo-hipófisis-suprarrenal (o eje HPA, por sus siglas en inglés). Además, hay una importante homología de secuencia entre el CRF y el péptido sauvagina de anfibio, así como con el péptido urotensina de teleósteos, los

cuales actúan como agonistas del CRF₁R y del CRF₂R. Estos tres péptidos tienen propiedades biológicas semejantes como agentes hipotensivos y secretagogos de la ACTH. Adicionalmente, se ha caracterizado a la urocortina, un congénere de mamífero de la urotensina.

5 Los receptores CRF pueden distinguirse, farmacológicamente, de los no CRFR por medio del uso de los agonistas y antagonistas que son selectivos del receptor. Estos agonistas y antagonistas selectivos, junto con los ratones knockout (ratones con una modificación génica específica) en el CRFR, han sido útiles en la determinación de cuál receptor del CRF efectúa la mediación de las respuestas biológicas específicas.

10 La función del CRF₁R está perfectamente bien establecida. Los ratones en los que se ha extirpado el gen CRF₁R (knockout en el CRF₁R) muestran un deterioro en la respuesta al estrés y una reducción en el comportamiento relacionado con la ansiedad. El CRF₁R es el principal mediador del eje HPA. Específicamente, el factor liberador de la corticotropina, la cual se libera desde el hipotálamo y se transporta hacia la hipófisis anterior por medio del sistema portal hipotalámico-hipofisario, interactúa con el CRF₁R presente en las células ubicadas en la hipófisis anterior. La activación del agonista del
15 CRF₁R resulta en la liberación de la ACTH desde las células de la hipófisis anterior hacia la circulación sistémica. La ACTH liberada se une al receptor de la ACTH presente en las células ubicadas en la corteza suprarrenal dando como resultado la liberación de hormonas suprarrenales que incluyen a los corticosteroides. Los corticosteroides median muchos efectos que incluyen, en forma enunciativa, la supresión del sistema inmunitario por medio de un mecanismo que involucra la atrofia del timo y del
20 vaso. Esta activación del CRF₁R indirectamente resulta en la subregulación del sistema inmunitario por medio de la activación del eje HPA.

La función del CRF₂R no está tan bien establecida. Los ratones en los que se ha extraído el gen CRF₂R (knockout en el CRF₂R) muestran una reducción en el deterioro de la ingesta de alimentos después de la estimulación con urocortina, y falta de vasodilatación, aunque una respuesta normal al
25 estrés. Los experimentos con CRF₂R demuestran que el CRF₂R es responsable de los efectos hipotensor/vasodilatador de los agonistas del CRFR y de la reducción en la ingesta de alimentos observada durante el tratamiento de ratones con agonistas del CRFR.

Atrofia e hipertrofia musculoesquelética

30 El músculo esquelético es un tejido plástico que fácilmente se adapta a los cambios, ya sea en la demanda fisiológica de trabajo o por necesidad metabólica. La hipertrofia se refiere a un aumento en la

19

masa musculoesquelética, en tanto que la atrofia musculoesquelética se refiere a una disminución en dicha masa. La atrofia musculoesquelética aguda puede rastrearse hasta una variedad de causas que incluyen, en forma enunciativa: la falta de uso debido a una cirugía, al reposo en cama o a huesos fracturados; la desnervación/daño a los nervios debidos a una lesión en la médula espinal, enfermedades autoinmunitarias o enfermedades infecciosas; el uso de glucocorticoides en condiciones no relacionadas, la sepsis debida a la infección o a otras causas; la limitación de nutrientes debida a enfermedad o a la falta de alimentos; y a los viajes espaciales. La atrofia musculoesquelética se presenta por medio de procesos biológicos normales, no obstante, en ciertas situaciones médicas este proceso biológico normal da como resultado un nivel de debilidad en la atrofia muscular. Por ejemplo, la atrofia musculoesquelética aguda presenta una importante limitación en la rehabilitación de pacientes después de estar inmovilizados, que incluye, en forma enunciativa, a la que acompaña a un procedimiento ortopédico. En estos casos, el período de rehabilitación necesario para revertir la atrofia musculoesquelética es con frecuencia bastante más largo que el período de tiempo necesario para reparar la lesión original. Esta atrofia aguda causada por falta de uso es un problema particular en los ancianos - quienes padecen ya de importantes deficiencias en la masa y función muscular relacionadas con la edad - debido a que esta atrofia puede llevarlos a una incapacidad permanente y a una muerte prematura.

La atrofia musculoesquelética también puede originarse a partir de trastornos crónicos, por ejemplo, la caquexia por cáncer, la inflamación crónica, la caquexia por SIDA, la enfermedad obstructivo-pulmonar crónica (COPD, por sus siglas en inglés), la insuficiencia cardíaca congestiva, los trastornos genéticos, como por ejemplo las distrofias musculares, las enfermedades neurodegenerativas y la sarcopenia (pérdida muscular asociada con la edad). En estas condiciones crónicas y la atrofia musculoesquelética puede llevar a la prematura pérdida de movilidad, aumentando así el porcentaje de morbilidad relacionada con la enfermedad.

Se sabe poco con respecto a los procesos moleculares que controlan la atrofia o la hipertrofia del músculo esquelético. En tanto que la activación que inicia la atrofia musculoesquelética es diferente para los diversos eventos iniciadores de la atrofia, en la fibra musculoesquelética afectada se presentan cambios bioquímicos comunes que incluyen una disminución en la síntesis de proteínas, un aumento en la degradación proteínica y cambios en las isoenzimas proteínicas de enzimas tanto contráctiles como metabólicas características de un cambio de la fibra de lento (metabolismo muy oxidante/isoformas proteínicas de contracción lenta) a rápido (metabolismo muy glicolítico/isoformas proteínicas de rápida contracción). Algunos cambios adicionales que se presentan en el músculo esquelético incluyen la pérdida de vasculatura y la remodelación de la matriz extracelular. En las condiciones adecuadas, la

conmutación muscular rápida y lenta demuestran la atrofia, en donde la pérdida relativa del músculo depende de los estímulos o condición específica de la atrofia. En forma importante, todos estos cambios son regulados en forma coordinada y se activan o desactivan dependiendo de los cambios en las necesidades fisiológicas y metabólicas.

5 Los procesos por medio de los cuales se presenta la atrofia y la hipertrofia se conservan en las especies de mamíferos. Una multitud de estudios ha demostrado que los mismos procesos moleculares, celulares y fisiológicos básicos se presentan durante la atrofia, tanto en roedores como en humanos. De este modo, los modelos de la atrofia musculoesquelética en roedores se han utilizado con éxito para comprender y predecir las respuestas de la atrofia humana. Por ejemplo, la atrofia inducida por una
10 variedad de medios tanto en roedores como en humanos, da como resultado cambios similares en la anatomía muscular, en el área en sección transversal, en la función, en la conmutación del tipo de fibra, en la expresión de la proteína contráctil y en la histología. Además, se ha demostrado que varios agentes regulan la atrofia musculoesquelética tanto en roedores como en humanos. Estos agentes incluyen a los esteroides anabólicos, a la hormona del crecimiento, al factor-1 de crecimiento de tipo insulina y a los
15 agonistas beta adrenérgicos. Estos datos demuestran, en su conjunto, que la atrofia musculoesquelética se origina a partir de mecanismos comunes tanto en roedores como en seres humanos.

En tanto que se ha mostrado que algunos agentes regulan la atrofia musculoesquelética y se aprueban para su uso en seres humanos para esta condición, estos agentes tienen efectos secundarios indeseables como por ejemplo, la hipertrofia del músculo cardíaco, la neoplasia, el hirsutismo, la
20 androgenización de las mujeres, un aumento en el porcentaje de morbilidad y la mortalidad, daño hepático, hipoglicemia, dolor musculoesquelético, aumento en el turgor tisular, taquicardia y edema. En la actualidad, no hay tratamientos que sean muy eficaces y selectivos, ya sea para la atrofia musculoesquelética aguda o crónica. De este modo, existe la necesidad de identificar otros agentes terapéuticos que regulen la atrofia musculoesquelética.

25 *Distrofias musculares*

Las distrofias musculares abarcan un grupo de trastornos musculares progresivos hereditarios que se distinguen clínicamente por la distribución selectiva de la debilidad musculoesquelética. Las dos formas más comunes de distrofia muscular son las distrofias de Duchenne y Becker, cada una de las cuales se origina por la herencia de una mutación en el gen distrofina, que está ubicado en el locus Xp21.
30 Otras distrofias incluyen, en forma enunciativa, la distrofia muscular en la zona de unión con las extremidades que resulta de la mutación de múltiples loci genéticos, que incluyen a los loci de calpaína

p94, adhalina, γ -sarcoglicano y β -sarcoglicano; la distrofia muscular fascioescapulohumeral (de Landouzy-Dejerine) la distrofia miotónica y la distrofia muscular de Emery-Dreifuss. Los síntomas de la distrofia muscular de Duchenne, la cual se presenta casi exclusivamente en hombres, incluyen la marcha de ánade, la caminata sobre las puntas de los dedos de los pies, la lordosis, caídas frecuentes y la dificultad para levantarse y subir escaleras. Los síntomas comienzan alrededor de los 3 a los 7 años de edad en la mayoría de los pacientes confinados a una silla de ruedas durante 10-12 años y muchos mueren aproximadamente a los 20 años de edad debido a complicaciones respiratorias. El tratamiento actual para la distrofia muscular de Duchenne incluye la administración de prednisona (un fármaco corticosteroide), el cual, aunque no cura, desacelera la declinación de la fuerza muscular y retrasa la incapacidad. Se cree que los corticosteroides, como por ejemplo la prednisona, actúan bloqueando la activación e infiltración de la célula inmunitaria que se precipita por los daños en la fibra muscular que resultan de la enfermedad. Desafortunadamente, el tratamiento con corticosteroide también da como resultado la atrofia musculoesquelética que niega parte del beneficio potencial de bloquear la respuesta inmunitaria en estos pacientes. De este modo, existe la necesidad de identificar agentes terapéuticos que desaceleren los daños en la fibra muscular y retrasen el inicio de la incapacidad en pacientes con distrofias musculares, pero que provoquen atrofia musculoesquelética en menor grado que las terapias actuales.

Un problema asociado con la identificación de los compuestos a ser utilizados en el tratamiento de la atrofia musculoesquelética o de las distrofias musculares ha sido la falta de buenos métodos de tamizado para la identificación de dichos compuestos. Los solicitantes han encontrado actualmente que los CRF₂R están involucrados en la regulación de la masa o función musculoesquelética y que los agonistas de los CRF₂R pueden bloquear la atrofia musculoesquelética e inducir la hipertrofia del músculo esquelético. La presente invención resuelve el problema de identificar los compuestos para el tratamiento de la atrofia muscular al proporcionar métodos de tamizado que utilizan el CRF₂R, los cuales pueden ser utilizados para identificar a los compuestos candidato útiles para el tratamiento de la atrofia muscular. La presente invención también resuelve el problema de encontrar compuestos para el tratamiento de las distrofias musculares al proporcionar un método de tamizado para identificar a los compuestos candidato que activan tanto al CRF₁R como al CRF₂R.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al uso de CRFR para identificar compuestos candidato que son potencialmente útiles en el tratamiento de la atrofia musculoesquelética, para inducir la hipertrofia musculoesquelética o ambos. En particular, la invención proporciona métodos *in vitro* para identificar

compuestos candidato para la regulación de la masa o función musculoesquelética, los métodos comprenden poner en contacto un compuesto de prueba con una célula que expresa CRF₂R o poner en contacto un compuesto de prueba con el CRF₂R aislado y determinar si el compuesto de prueba se une al CRF₂R o lo activa. Otra modalidad de la invención se refiere a un método para identificar compuestos terapéuticos candidatos de un grupo de uno o más compuestos candidato, compuestos que se ha determinado se unen al CRF₂R o lo activan, lo que comprende administrar el compuesto candidato a un animal y determinar si el compuesto candidato regula la masa musculoesquelética o la función muscular en el animal tratado.

Una modalidad adicional de la invención se relaciona con un método para identificar los compuestos candidato que regulan la masa o función musculoesquelética, el método comprende, en cualquier orden: (i) poner en contacto un compuesto de prueba con una célula que expresa un CRF₂R funcional y determinar el nivel de activación del CRF₂R resultante por el compuesto de prueba; (ii) poner en contacto un compuesto de prueba con una célula que expresa un CRF₁R funcional y determinar el nivel de activación del CRF₁R que resulta del compuesto de prueba; seguido de (iii) comparar el nivel de activación del CRF₂R y el nivel de activación del CRF₁R; y (iv) identificar aquellos compuestos de prueba que muestren una actividad similar hacia el CRF₂R y el CRF₁R o que muestren selectividad para el CRF₂R como compuestos candidato para regular la masa o función musculoesquelética.

La invención proporciona, además, métodos para identificar a los compuestos candidato que prolongan o aumentan la activación inducida por el agonista del CRF₂R o de una ruta de transducción de señal del CRF₂R. Estos métodos comprenden, ya sea en cualquier orden o en forma concomitante: (i) poner en contacto un compuesto de prueba con una célula que expresa al CRF₂R funcional, (ii) tratar a la célula con un agonista de CRF₂R durante el tiempo suficiente y a la concentración necesaria para provocar la desensibilización del CRF₂R en las células de control; seguido por (iii) la determinación del nivel de activación del CRF₂R e identificar a los compuestos de prueba que prolongan o aumentan la activación de un CRF₂R o de una ruta de transducción de la señal del CRF₂R, como compuestos candidato para regular la masa o función musculoesquelética. En una modalidad particular, la presente invención se relaciona con un método para identificar compuestos terapéuticos candidatos de un grupo de uno o más compuestos candidato que se determinó prolongan o aumentan la activación de un CRF₂R o de una ruta de transducción de señal del CRF₂R; el método comprende: administrar el compuesto candidato, junto con un agonista del CRF₂R, a un animal y determinar si el compuesto candidato regula la masa o función musculoesquelética en el animal tratado.

La invención proporciona además métodos para identificar a los compuestos candidato que aumentan la expresión del CRF₂R; los métodos comprenden poner en contacto al compuesto de prueba con una célula o con un lisado celular que contiene un gen reportero asociado en forma operativa con un elemento regulador del gen del CRF₂R y detectar la expresión del gen reportero. Los compuestos de prueba que aumentan la expresión del gen reportero se identifican como compuestos candidato para aumentar la expresión del CRF₂R. En una modalidad particular, la presente invención se relaciona con un método para determinar si esos compuestos candidato que aumentan la expresión del CRF₂R pueden ser utilizados para regular la masa o función musculoesquelética *in vivo* por medio de la administración de un compuesto candidato a un animal y determinar si el compuesto candidato regula la masa o función musculoesquelética en el animal tratado.

La invención proporciona además métodos para identificar los compuestos candidato que aumentan la expresión del CRF, los métodos comprenden poner en contacto un compuesto de prueba con una célula o con un lisado celular que contiene un gen reportero asociado operativamente con un elemento regulador del gen del CRF y detectar la expresión del gen reportero. Los compuestos de prueba que aumentan la expresión del gen reportero se identifican como compuestos candidato para aumentar la expresión de CRF. En una modalidad particular, la presente invención se refiere a un método para determinar si esos compuestos candidato, que aumentan la expresión del CRF, pueden ser utilizados para regular la masa o función musculoesquelética *in vivo* por medio de la administración de un compuesto candidato a un animal y determinar si el compuesto candidato regula la masa o función musculoesquelética en el animal tratado.

La presente invención también se relaciona con el uso de agonistas del CRF₂R, que expresan vectores que codifican un CRF₂R funcional, vectores de expresión que codifican un CRF₂R constitutivamente activo o compuestos que aumentan la expresión del CRF₂R o del CRF para tratar la atrofia musculoesquelética. En particular, la invención proporciona métodos para tratar la atrofia musculoesquelética en una persona que necesite de dicho tratamiento; los métodos comprenden administrar a la persona una cantidad segura y eficaz de un agonista del CRF₂R, un vector de expresión que codifica para un CRF₂R funcional, un vector de expresión que codifica para un CRF₂R constitutivamente activo, un vector de expresión que codifica para un CRF o un análogo del CRF o un compuesto que aumenta la expresión del CRF₂R o del CRF. En una modalidad particular, la presente invención se refiere a un método para tratar la atrofia musculoesquelética en una persona que necesite de dicho tratamiento, el método comprende administrarle a la persona una cantidad segura y eficaz de un

24

agonista del CRF₂R junto con una cantidad segura y eficaz de un compuesto que prolonga o aumenta la activación, inducida por agonista, del CRF₂R, o de una ruta de transducción de la señal del CRF₂R.

La presente invención también se refiere al uso de un agonista del CRF₂R para aumentar la masa o función musculoesquelética en una persona. En particular, la invención proporciona un método para
5 aumentar la masa o función musculoesquelética en una persona en la que este aumento es deseable; los métodos comprenden identificar a una persona en la que es deseable el aumento en la masa o función muscular y administrarle una cantidad segura y eficaz de un agonista del CRF₂R.

La invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad segura y eficaz de un agonista del CRF₂R y un portador farmacéuticamente aceptable. En una modalidad
10 particular, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo humano o quimérico específico para un CRF₂R. En otra modalidad particular, la composición farmacéutica comprende un CRF o un análogo del CRF, de preferencia urocortina II.

La presente invención también proporciona anticuerpos para el CRF₂R y, en particular, para anticuerpos quiméricos o humanos que son agonistas del CRF₂R.

En toda esta solicitud, se hace referencia a diversas publicaciones. La totalidad de lo expuesto en estas publicaciones se incorpora de este modo como referencia en esta solicitud con el fin de describir de manera más completa el estado de la técnica a la que esta invención pertenece.

DESCRIPCIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS

5 Cada una de las secuencias de proteínas y de nucleótidos del CRFR o la secuencia de proteínas análogas del CRF incluidas en el listado de secuencias, junto con los correspondientes números de acceso de Genbank o de Derwent y las especies de animales a partir de las cuales se clonaron, se muestran en el Cuadro I. También se muestran los números de acceso de las secuencias de nucleótidos relacionadas que codifican para secuencias de aminoácidos idénticas o casi idénticas a la secuencia mostrada en el listado de secuencias. Estas secuencias relacionadas difieren principalmente en la cantidad de la secuencia 5' o 3' no traducida mostrada.

CUADRO I

Descripción de la secuencia	SEQ ID NO: nucleótido, aminoácido	Especie	Número de acceso Genbank (GB) o Derwent (D) de la secuencia de nucleótidos	Números de acceso relacionados con Genbank (GB) o Derwent (D).
CRF ₁ R	1, 2	<i>Homo sapiens</i>	X72304 (GB)	E11431 (GB) L23332 (GB) I92584 (D) T37068 (D) T28968 (D) Q81952 (D)
variante del CRF ₁ R	3, 4	<i>Homo sapiens</i>	L23333 (GB)	
variante del CRF ₁ R	5, 6	<i>Homo sapiens</i>	NM_004387 (GB)	
variante del CRF ₁ R	7, 8	<i>Homo sapiens</i>	AF180301 (GB)	
CRF ₂ R alfa	9,10	<i>Homo sapiens</i>	U34587 (GB) NM_001883 (GB)	E12752 (GB) T12247 (D) T66508 (D)
CRF ₂ R beta	11, 12	<i>Homo sapiens</i>	AF011406 (GB)	
CRF ₂ R gama	13,14	<i>Homo sapiens</i>	AF019381 (GB)	
CRF ₁ R	15,16	<i>Rattus norvegicus</i>	T28970 (D)	L25438 (GB) L24096 (GB) I92586 (D) Q81954 (D) AH006791 (GB)
CRF ₂ R alfa	17,18	<i>Rattus norvegicus</i>	U16253 (GB)	NM_022714 (GB) X01009 (D) T12243 (D)
variante del CRF ₂ R beta	19,20	<i>Rattus norvegicus</i>	T12244 (D)	
CRF ₁ R	21,22	<i>Mus musculus</i>	NM_007762 (GB)	X72305 (D)
CRF ₂ R	23,24	<i>Mus musculus</i>	T28972 (D)	U17858 (GB)
CRF ₂ R	25,26	<i>Mus musculus</i>	NM_009953 (GB)	
CRF ₁ R	27,28	<i>Ovis aries</i>	AF054582 (GB)	
CRF ₁ R	29,30	<i>Xenopus laevis</i>	Y14036 (GB)	
CRF ₂ R	31,32	<i>Xenopus laevis</i>	Y14037 (GB)	
CRF ₁ R	33,34	<i>Ameiurus nebulosus</i>	AF229359 (GB)	
CRF ₁ R	35,36	<i>Ameiurus nebulosus</i>	AF229361 (GB)	
CRF ₂ R	37,38	<i>Ameiurus nebulosus</i>	AF229360 (GB)	
CRF ₁ R	39,40	<i>Bos taurus</i>	AB055434 (GB)	

CRF ₁ R	41,42	<i>Gallus gallus</i>	L41563 (GB)	
Urocortina II	43	<i>Mus musculus</i>	AF331517	
Péptido relacionado con la urocortina	44	<i>Homo sapiens</i>	BC002647	

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 demuestra el efecto antiatrófico del agonista del CRF₁R/CRF₂R, la sauvagina (administrada por vía subcutánea 2X al día), sobre el músculo gastrocnemio medio en el modelo de atrofía por desnervación del nervio ciático de ratón.

La Figura 2 demuestra el efecto antiatrófico de la sauvagina (administrada en forma continua mediante una minibomba osmótica) sobre el músculo anterior de la tibia en el modelo de atrofía por desnervación del nervio ciático de ratón.

Las Figuras 3A y 3B demuestran el efecto antiatrófico de la sauvagina (administrada en forma continua mediante una minibomba osmótica) sobre la atrofía inducida por glucocorticoide del músculo anterior de la tibia (Figura 3A) y el músculo gastrocnemio medio (Figura 3B).

La Figura 4A demuestra el efecto antiatrófico de la sauvagina (administrada en forma subcutánea 2X al día) sobre la atrofía inducida por enyesado del músculo anterior de la tibia y el efecto inductor de la hipertrofia sobre el músculo anterior de la tibia no enyesada (normal). La Figura 4B demuestra el efecto antiatrófico de la sauvagina sobre la atrofía inducida por enyesado del músculo gastrocnemio medio y el efecto inductor de la hipertrofia de la sauvagina sobre el músculo gastrocnemio medio no enyesado (normal).

La Figura 5 demuestra los efectos inductores antiatrófico e hipertrófico de la sauvagina y la urocortina (administrada en forma continua mediante una minibomba osmótica) sobre el músculo anterior de la tibia en el modelo de atrofía inducida por desnervación del nervio ciático de ratón.

Las Figuras 6A y 6B demuestran los efectos antiatróficos de la urocortina (administrada en forma subcutánea 2X al día) sobre la atrofía inducida por falta de uso del músculo anterior de la tibia (Figura 6A) y del músculo gastrocnemio medio (Figura 6B).

La Figura 7 demuestra el efecto antiatrófico de la sauvagina (administrada en forma subcutánea, 2X al día) en el modelo de atrofia inducida por desnervación del nervio ciático adrenalectomizado de rata, sobre la atrofia inducida por desnervación de los músculos tibial anterior (Figura 7A), extensor largo del dedo (EDL, siglas de extensor digitorum longus) (Figura 7B), sóleo (Figura 7C), gastrocnemio medio (Figura 7D) y plantar (Figura 7E). Además, la hipertrofia inducida por sauvagina del músculo EDL no desnervado (Figura 7B).

La Figura 8 demuestra que en el modelo de atrofia por desnervación del nervio ciático de ratón, la sauvagina (administrada en forma continua mediante una minibomba osmótica) tuvo un efecto antiatrófico sobre el músculo anterior de la tibia en ratones de tipo silvestre, pero no en ratones knockout en el CRF₂R.

Las Figuras 9A y 9B demuestran que en un modelo de atrofia por falta de uso por enyesado de la pierna del ratón, la sauvagina tuvo un efecto antiatrófico sobre el músculo EDL y el sóleo, conforme se midió por medio de la masa (Figura 9A) o la función muscular (Figura 9B).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. Términos y definiciones:

La siguiente es una lista de las definiciones de los términos utilizados en la presente.

5 "Agonista" se refiere a cualquier compuesto, que incluye en forma enunciativa anticuerpos, y que activa un receptor. Por ejemplo, los agonistas del CRFR incluyen, en forma enunciativa, al CRF y a los análogos del CRF.

"Variante alélica" se refiere a una variante de un gen o producto génico determinado. Cualquier persona con experiencia en la campo reconoce que un gran número de genes están presentes en dos o más formas alélicas en una población y que algunos genes tienen numerosos alelos.

10 "Anticuerpo", en sus diversas formas gramaticales, se refiere a moléculas de inmunoglobulina y a las porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, a las moléculas que contienen un sitio de unión con el antígeno, las que se unen específicamente a un antígeno. "Anticuerpo purificado" se refiere a un anticuerpo que ha sido separado total o parcialmente de las proteínas y de las moléculas orgánicas naturales con las que está asociado en forma natural. De
15 preferencia, la preparación es de al menos 60% del anticuerpo, con más preferencia de al menos 75% del anticuerpo, con mayor preferencia de al menos 90% del anticuerpo y con la máxima preferencia de al menos 99% en peso seco del anticuerpo.

La "afinidad de unión" se refiere a la proclividad de un ligando a interactuar con un receptor y está inversamente relacionada con la constante de disociación de una interacción ligando-CRFR del CRF específico. La constante de disociación puede medirse directamente por medio de las técnicas estándar de saturación, competencia o cinética de unión, o en forma indirecta mediante técnicas farmacológicas que involucren ensayos funcionales y puntos de terminación.

20 "Anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que contiene elementos estructurales de dos o más diferentes moléculas de anticuerpos, es decir, de diferentes especies animales. Los anticuerpos quiméricos incluyen, en forma enunciativa, a los anticuerpos conocidos como "anticuerpos humanizados", los que incluyen, en forma enunciativa: anticuerpos quiméricos generados por la técnica conocida como injerto en la región de determinación por complementariedad.

"CRF" se refiere al factor liberador de corticotropina, que es lo mismo que la hormona liberadora de corticotropina (CRH). Los péptidos del CRF ilustrativos incluyen al CRF r/h y al CRF de ovino (ver la patente de los EE.UU. núm. 4,415,558) y lo similar.

5 "Análogo del CRF" se refiere a sustancias que actúan como ligandos de los CRFR. Los análogos de CRF adecuados pueden obtenerse a partir de una variedad de especies vertebradas, e incluyen, en forma enunciativa, sustancias tales como la sauvagina (ver, por ejemplo, la patente de los EE.UU. núm. 4,605,642), la urotensina (ver, por ejemplo, las patentes de los EE.UU. núms. 4,908,352 y 4,533,654), la urocortina II de ratón (SEQ ID NO: 43), el péptido relacionado con la urocortina humana (SEQ ID NO:44) (Reyes, T.M. et al., *Proc. Nat'l Acad Sci* 98:2843-2848 (2001)), la urocortina (ver, por 10 ejemplo, la WO 97/00063) y los análogos del CRF descritos en las patentes de los EE.UU. núm. 4,415,558; 4,489,163; 4,594,329; 4,605,642; 5,109,111; 5,235,036; 5,278,146; 5,439,885; 5,493,006; 5,663,292; 5,824,771; 5,844,074; y 5,869,450. Cada una de estas se incorpora en la presente como referencia. Los análogos del CRF preferidos son la sauvagina, la urocortina, el péptido relacionado con la urocortina, la urocortina II y la urotensina.

15 "Agonista del CRFR" se refiere a un compuesto o molécula que tiene la capacidad de activar al CRF₁R al CRF₂R o a los dos. La activación de los CRFR puede medirse conforme se describe más adelante.

"CRFR" se refiere al CRF₁R o al CRF₂R.

20 "CRF₁R" se refiere a cualesquiera isoformas del CRF₁R de cualesquiera especies animales. Al CRF₁R se le ha referido previamente como CRF-RA, PC-CRF, CRF, (Perrin, M.H., et al. *Endocrinology* 133:3058-3061 (1993), Chen, R., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8967-8971 (1993), Chang, C-P. et al., *Neuron* 11:1187-1195 (1993), Kishimoto, T., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:1108-1112 (1995) y, Vita, N. et al., *FEBS Lett.* 335: 1-5 (1993)) o el receptor de la CRH.

30 La definición del CRF₁R incluye, en forma enunciativa, a aquellos receptores para los cuales se ha depositado en una base de datos, el ADNc o la secuencia genómica que codifica para el receptor. Estas secuencias incluyen a los números de acceso: X72304, E11431, L23332, I92584, T37068, T28968, Q81952, L23333, NM_004382, AF180301, T28970, L25438, L24096, I92586, Q81954, AH006791, NM_007762, X72305, AF054582, Y14036, AF229359, AF229361, AB055434 y L41563. Las secuencias de nucleótidos y de proteínas de estos receptores pueden obtenerse del GenBank o de Derwent y, por conveniencia, las secuencias representativas se proporcionan en el listado de secuencias de la presente.

"CRF₂R" se refiere a cualquier isoforma del CRF₂R de cualesquiera especies animales. Al CRF₂R también se le ha referido como HM-CRF, CRF-RB, (Kishimoto, T., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:1108-1112 (1995) y Perrin, M. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:2969-2973 (1995)).

La definición del receptor del CRF₂R incluye, en forma enunciativa, a los receptores para los cuales la secuencia de ADN que codifica para el receptor se ha depositado en una base de datos de secuencias. Estas secuencias incluyen a los números de acceso: U34587, E12752, NM_001883, T12247, T66508, AF011406, AF019381, U16253, T12244, T28972, U17858, NM_009953, Y14037 y AF229360. Las secuencias de nucleótidos y de proteínas de estos receptores pueden obtenerse del GenBank o de Derwent y, por conveniencia, en el listado de secuencias de la presente se proporcionan secuencias representativas.

El término "CRFR" también incluye proteínas trunca, con mutaciones o ambas, en donde las regiones no necesarias de la molécula receptora para la unión con el ligando o la señalización han sido suprimidas o modificadas. Por ejemplo, alguien con experiencia en el campo reconocerá que un CRFR con uno o más cambios conservadores en la secuencia primaria de aminoácidos sería útil en la presente invención. En el campo se sabe que la sustitución de ciertos aminoácidos con aminoácidos diferentes que tienen estructura o propiedades similares (sustituciones conservadoras) pueden dar como resultado un cambio silencioso, es decir, un cambio que no altera en forma significativa a la función. Los substitutos conservadores son bien conocidos en el campo. Por ejemplo, se sabe que los GPCR pueden tolerar sustituciones de residuos de aminoácidos en las alfa-hélices transmembrana, las que están orientadas hacia el lípido con otros aminoácidos hidrofóbicos y que siguen funcionando. Los CRF₁R difieren de una secuencia natural por los truncamientos, las mutaciones o ambas, de tal forma que las sustituciones de aminoácidos conservadoras también están incluidas en la definición de CRF₁R. El CRF₂R que difiere de una secuencia natural por los truncamientos, mutaciones o ambas, como por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos conservadoras, también están incluidos en la definición de CRFR₂.

Alguien con experiencia en el campo también reconocerá que los CRFR de otra especie diferente a las anteriormente enumeradas, particularmente las especies de mamífero, serán útiles en la presente invención. Alguien con experiencia en el campo además reconocerá que al utilizar sondas de las secuencias de las especies de CRFR conocidas, el ADN o las secuencias genómicas homólogas de la secuencia conocida podrán ser obtenidas a partir de la misma especie o de especies alternas por medio de los métodos de clonación conocidos. Este CRF₁R también está incluido en la definición de CRF₁R y este CRF₂R también está incluido en la definición de CRF₂R.

Además, alguien de experiencia en el campo reconocerá que las variantes alélicas funcionales o las variantes de empalme funcionales de los CRFR pueden estar presentes en una especie particular y que estas variantes también tendrán utilidad en la presente invención. Se conocen las variantes de empalme de los CRFR, por ejemplo, de las patentes de los EE. UU. núms. 5,888,811; 5,786,203; y 5,728,545, cada una de las cuales se incorpora en la presente como referencia. Las variantes del CRF₁R también están incluidas en la definición de CRF₁R y las variantes del CRF₂R también están incluidas en la definición de CRF₂R.

A las fusiones de un polipéptido de CRF₁R o de CRF₂R, o de un fragmento de polipéptido de CRF₁R o de CRF₂R con un polipéptido que no es de CRFR se les conoce como proteínas de fusión del CRFR. Mediante el uso de métodos conocidos, alguien con experiencia en el campo podrá preparar proteínas de fusión de un CRF₁R o de un CRF₂R que, en tanto que es diferente del CRF₁R o del CRF₂R nativos, seguirá siendo útil en la presente invención. Por ejemplo, el polipéptido que no es de CRFR puede ser una secuencia de polipéptido de señal (o líder), la cual dirige en forma co-traducciona o post-traducciona la transferencia de la proteína de su sitio de síntesis hacia otro lugar (por ejemplo, el líder del factor α de la levadura). O el polipéptido que no es de CRFR puede añadirse para facilitar la purificación o identificación del CRFR (por ejemplo, poli-His o el péptido de bandera). Las proteínas de fusión del CRF₁R también están incluidas dentro de la definición de CRF₁R y las proteínas de fusión del CRF₂R también están incluidas dentro de la definición de CRF₂R.

"Ruta de transducción de la señal de CRF₂R" se refiere a cualquier ruta de señalización (por ejemplo, AMPc, cinasa MAP) o combinación de rutas de señalización que estén moduladas por la unión de ligandos endógenos o exógenos con el CRF₂R.

"Los CRFR funcionales" se refieren a CRFR, los cuales se unen al CRF o a un análogo del CRF *in vivo* o *in vitro* y se activan como resultado de la unión con el ligando.

"Gen de fusión" se refiere a dos o más secuencias que codifican para el ADN, asociadas en forma operativa, de modo que codifiquen para una proteína híbrida. Una "proteína de fusión" es el producto proteínico de un gen de fusión.

"Inhibir" se refiere a bloquear total o parcialmente un proceso o actividad particular. Por ejemplo, un compuesto inhibe la atrofia musculoesquelética si evita ya sea total o parcialmente la atrofia muscular.

Conforme se utiliza en la presente, se dice que dos secuencias de ADN están "asociadas en forma operativa" si la naturaleza del vínculo o enlace entre las dos secuencias de ADN no: (1) da como resultado la introducción de una mutación por desplazamiento del cuadro, (2) interfiere con la habilidad de una región promotora para dirigir la transcripción de las secuencias de codificación, o (3) interferir con la capacidad de transcripción del ARN correspondiente que será traducido en una proteína. Por ejemplo, una secuencia de codificación y las secuencias reguladoras están asociadas en forma operativa cuando están ligadas covalentemente en una forma tal que colocan a la transcripción de la secuencia de codificación bajo la influencia o el control de las secuencias reguladoras. De este modo, una región promotora está operativamente asociada con una secuencia de codificación cuando la región promotora tiene la capacidad de efectuar la transcripción de la secuencia de ADN, de tal forma que la transcripción resultante es susceptible de ser traducida en la proteína o polipéptido deseado.

"Porcentaje de identidad" se refiere al porcentaje de nucleótidos o aminoácidos que dos secuencias tienen en común, se calcula como sigue. Para calcular el porcentaje de identidad de una secuencia específica (la incógnita) la parte relevante de la secuencia incógnita se compara con una secuencia de referencia, utilizando el programa de computadora de comparación BestFit, Wisconsin Package, Versión 10.1, que puede obtenerse de Genetics Computer Group, Inc. Este programa utiliza el algoritmo de Smith y Waterman, *Advances in Applied Mathematics*, Issue 2: 482-489 (1981). El porcentaje de identidad se calcula con los siguientes parámetros por omisión para el programa BestFit: la matriz de marcación es *blosum62.cmp*, la penalización por creación de la brecha es de 8 y la penalización por extensión de la brecha es de 2. Cuando se compara una secuencia con la secuencia de referencia, la parte relevante de la secuencia incógnita es la que se deriva de una secuencia de CRFR. Por ejemplo, cuando la incógnita es un CRFR/proteína de fusión con etiqueta de purificación, solamente la porción de polipéptido del CRFR de la secuencia se alinea para calcular la marcación del porcentaje de identidad.

"Polipéptido" se refiere a cualquier cadena de aminoácidos, sin considerar la longitud o modificación post-traducciona (por ejemplo, la fosforilación o la glicosilación).

"Promotor" se refiere a una secuencia de ADN que controla el inicio de la transcripción y la velocidad de transcripción de un gen o región de codificación.

"Tratamiento profiláctico" se refiere al tratamiento preventivo de una persona, que actualmente no muestra signos de atrofia musculoesquelética, con el fin de bloquear total o parcialmente la ocurrencia de la atrofia musculoesquelética. Alguien con experiencia en el campo reconocerá que ciertas

personas se encuentran en riesgo por la atrofia musculoesquelética, conforme se menciona en la sección de antecedentes de la presente. Adicionalmente, alguien con experiencia en el campo reconocerá que si los cambios bioquímicos que desembocan en la atrofia muscular se regulan en forma apropiada, se evitaría o reduciría la ocurrencia de la atrofia en las personas en riesgo. Por ejemplo, los pacientes con distrofia muscular que comienzan el tratamiento con corticosteroides están en riesgo de desarrollar la atrofia musculoesquelética, lo que indica que sería apropiado el tratamiento profiláctico de estos pacientes.

"Regular" en todas sus formas gramaticales, se refiere a aumentar, disminuir o mantener, por ejemplo, regular la masa o función musculoesquelética se refiere a aumentar, disminuir o mantener el nivel de la masa o función musculoesquelética.

"Regulación de la masa o función musculoesquelética" incluye la regulación de la masa musculoesquelética, de la función musculoesquelética o de ambas.

"Elemento regulador" se refiere a una secuencia que tiene la capacidad de controlar el nivel de transcripción de una secuencia de ADN asociada en forma operativa. Dentro de esta definición de elemento regulador se incluyen los promotores e intensificadores. Por ejemplo, un elemento regulador del gen de CRFR es una secuencia de ADN con capacidad para controlar el nivel de transcripción del gen del CRFR.

"Gen reportero" se refiere a una secuencia de codificación cuyo producto puede ser detectado, de preferencia en forma cuantitativa, en donde el gen reportero está asociado en forma operativa con un promotor o elemento intensificador heterólogo que responde a una señal que es la que será medida. En este contexto, al promotor o elemento intensificador se le denomina en la presente como "elemento que responde" o "elemento respondiente".

"Agonista selectivo" se refiere a que el agonista tiene una actividad significativamente mayor hacia ciertos receptores en comparación con otros receptores, y no a que este es completamente inactivo con respecto a otros receptores.

"Hipertrofia musculoesquelética" se refiere a un aumento en la masa musculoesquelética o en la función musculoesquelética o en ambas.

"Atrofia musculoesquelética" se refiere a lo mismo que "consunción muscular" y se refiere a una disminución en la masa musculoesquelética o en la función musculoesquelética o en ambas.

"Variante de empalme" se refiere a un ARNm o proteína que resulta del uso de exón alternativo. Alguien con experiencia en el campo reconoce que, dependiendo del tipo de célula o incluso dentro de un solo tipo de célula, un ARNm puede ser expresado en una forma diferente, como una variante de empalme y, de este modo, la proteína traducida será diferente dependiendo del ARNm que se exprese.

5 Una "cantidad terapéuticamente eficaz o efectiva" de una sustancia es una cantidad capaz de producir un resultado médicamente deseable en un paciente tratado, por ejemplo, disminuye la atrofia musculoesquelética, aumenta la masa musculoesquelética o aumenta la función musculoesquelética, con una proporción de riesgo beneficioso aceptable en un mamífero humano o no humano.

10 "Tratamiento terapéutico" se refiere al tratamiento de una persona en la que es deseable un aumento en la masa muscular o en la función muscular. Por ejemplo, el tratamiento de una persona que actualmente exhibe signos de atrofia musculoesquelética con el fin de revertir parcial o totalmente la atrofia musculoesquelética que se ha presentado o para bloquear total o parcialmente la ocurrencia de una atrofia musculoesquelética adicional, sería el tratamiento terapéutico de dicha persona. El término "tratamiento terapéutico" también incluye, por ejemplo, el tratamiento de una persona que no muestra 15 signos de la atrofia musculoesquelética para inducir la hipertrofia musculoesquelética, por ejemplo, el tratamiento de animales de ganado para aumentar la masa muscular.

El término "tratamiento" se refiere a un tratamiento profiláctico o terapéutico.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que aquél que entiende en forma común alguien de habilidad 20 ordinaria en las áreas de la química de las proteínas, de la farmacología o la biología molecular. No se pretende que los métodos, materiales y ejemplos que se describen en la presente sean limitativos. En la práctica o en la prueba de la presente invención pueden utilizarse otros métodos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos.

II. La función de los CRFR en la regulación de la masa musculoesquelética

25 Alguien de experiencia en el campo reconocerá la utilidad de la presente invención dada la información en la técnica anterior y las enseñanzas que siguen. Los resultados que se describen en la presente demuestran que la administración de un agonista del receptor de CRF que activa tanto al CRF₁R como al CRF₂R (agonista del CRFR no selectivo) bloquea, inhibe o ambos, la atrofia musculoesquelética, induciendo el efecto de la desnervación, la falta de uso, o el tratamiento con 30 dexametasona en los modelos de atrofia musculoesquelética. Además, los datos muestran que los

36

agonistas del CRFR no muestran este efecto antiatrófico en ratones en los que se ha modificado el CRF₂R. También, en ratas en las que se ha interrumpido el eje HPA mediado por CRF₁R mediante el retiro de las glándulas suprarrenales (adrenalectomía quirúrgica), el tratamiento de estos animales con agonistas del CRF no selectivos muestra un efecto antiatrófico, lo que indica que el CRF₂R media los efectos antiatróficos. Además, los resultados demuestran que la administración de un agonista del CRFR no selectivo muestra un efecto inductor de la hipertrofia. Conjuntamente, estos datos demuestran el papel modulador del CRF₂R en el proceso de la atrofia musculoesquelética. El papel o función específica de los CRFR *in vivo* se investigó utilizando los agentes farmacológicos, sauvagina (Bachem Biosciences, Inc. King of Prussia, PA) y urocortina (Bachem Biosciences, Inc.), que son agonistas selectivos de los CRFR en varios modelos de la atrofia musculoesquelética, que se describen más adelante. Estos agentes han sido bien caracterizados y se describen en la literatura científica.

Las Figuras 1 a 7 y 9 muestran los resultados de los experimentos que demuestran que la administración de agonistas selectivos de los CRFR resulta en la inhibición estadísticamente significativa de la atrofia musculoesquelética. La Figura 8 muestra que el efecto antiatrófico del agonista del CRFR, la sauvagina, es mediado por medio del CRF₂R. Los agonistas del CRFR administrados dos veces al día en combinación con el inhibidor de la fosfolipasa y la teofilina, dio como resultado la inhibición de la atrofia musculoesquelética en modelos animales de atrofia musculoesquelética. La teofilina se añadió para potenciar la duración y magnitud de la acción de los agonistas del CRFR, dando como resultado un aumento en la eficacia de estos compuestos. La teofilina administrada sola en estos modelos de atrofia no tuvo efecto, lo que demuestra que el efecto antiatrófico del agonista del CRFR combinado con la teofilina se debió al efecto del agonista del CRFR. Adicionalmente, la dosificación continua del agonista del CRFR en ausencia de la teofilina, por medio de una minibomba osmótica, también dio como resultado la inhibición de la atrofia musculoesquelética y la hipertrofia musculoesquelética. La significancia estadística de los resultados se determinó utilizando el ANCOVA (Douglas C. Montgomery, Design and Analysis of Experiments, John Wiley and Sons, New York (2da ed. 1984)). Las abreviaturas utilizadas en las Figuras 1-9 son: g-gramo, SEM-errores estándar de la media.

Específicamente, la Figura 1 (Fig. 1) muestra que la sauvagina inhibe la atrofia inducida por la desnervación del músculo gastrocnemio medio en un modelo de atrofia por desnervación del nervio ciático de ratón. Leyenda: A - solución salina fisiológica (control); B - sauvagina (0,01 mg/kg) + teofilina; C - sauvagina (0,03 mg/kg) + teofilina; D - sauvagina (0,1 mg/kg) + teofilina; E - sauvagina (1,0 mg/kg) + teofilina; * - $p \leq 0,05$ comparado con la solución salina. Después de la desnervación del nervio ciático derecho, a los ratones macho se les inyectó sauvagina en forma subcutánea dos veces al

dia en la región media escapular, a las dosis indicadas anteriormente o con el vehículo de control (solución salina fisiológica) durante nueve días. La sauvagina se administró conjuntamente con 30 mg/kg de teofilina. El día nueve, se retiró el músculo gastrocnemio medio y se pesó para determinar el grado de la atrofia.

5 La Figura 2 (Fig. 2) muestra que la sauvagina inhibe la atrofia inducida por la deservación del músculo tibial anterior en un modelo de atrofia por deservación del nervio ciático del ratón. Leyenda: A - agua (control); B - sauvagina (0,1 mg/kg/d); C - sauvagina (0,3 mg/kg/d); D - sauvagina (1,0 mg/kg/d); * - $p \leq 0,05$ comparado con agua. Después de la deservación del nervio ciático derecho, a los ratones macho se les dosificó ya sea con sauvagina o con el vehículo de control (solución salina fisiológica) mediante la infusión continua utilizando una minibomba osmótica Alzet a 5 μ l/hr hasta el término del periodo del experimento (sin teofilina adicional). La dosis suministrada diariamente de sauvagina es la anteriormente indicada. La implantación de la minibomba se realizó en el momento de la deservación del nervio ciático. El día nueve, se retiró el músculo tibial anterior y se pesó para determinar el grado de la atrofia.

15 La Figura 3 (Fig. 3) demuestra que la sauvagina inhibe a la atrofia muscular inducida por glucocorticoides de los músculos tibial anterior (Fig. 3A) y gastrocnemio medio (Fig. 3B) en el modelo de atrofia inducida por glucocorticoides en ratones. Leyenda: A - agua sola sin incluir dexametasona en el agua potable (control no atrofiado); B - agua + dexametasona (control atrofiado); C - sauvagina (0,1 mg/kg/d) + dexametasona; D - sauvagina (0,3 mg/kg/d) + dexametasona; E - sauvagina (1,0 mg/kg/d) + dexametasona; * - $p \leq 0,05$ comparado con agua; # - $p \leq 0,05$ comparado con agua + dexametasona. Después de la adición del glucocorticoide y la dexametasona al agua potable (1,2 mg/kg/d), a los ratones macho se les dosificaron los agentes o el vehículo de control (solución salina fisiológica) anteriormente indicados, mediante la infusión continua utilizando una minibomba osmótica Alzet a 5 μ l/hr hasta el fin del periodo del experimento (sin teofilina adicional). La dosis suministrada diariamente de sauvagina es como se indicó anteriormente. La implantación de la minibomba se realizó al momento del inicio de la exposición a la dexametasona. Nueve días después del inicio de la dosificación de sauvagina, se retiraron los músculos gastrocnemio medio y tibial anterior y se pesaron para determinar el grado de la atrofia.

25 La Figura 4 (Fig. 4) demuestra que la sauvagina inhibe la atrofia inducida por la falta de uso de los músculos tibial anterior (Fig. 4A) y gastrocnemio medio (Fig. 4B). Además, se observó una hipertrofia estadísticamente significativa de los músculos gastrocnemio medio y tibial anterior de la pierna no enyesada con el tratamiento con sauvagina. Leyenda: A - solución salina fisiológica (control); B - teofilina; C - sauvagina (0,03 mg/kg) + teofilina; D - sauvagina (0,1 mg/kg) + teofilina; E - sauvagina

(0,3 mg/kg) + teofilina; * - $p \leq 0,05$ comparado con la solución salina. Después del enyesado de la pierna trasera derecha, a los ratones macho se les inyectó sauvagina o el vehículo de control (solución salina fisiológica) en forma subcutánea en la región media escapular, dos veces al día durante diez días a la dosis indicada suministrada diariamente. La sauvagina se administró conjuntamente con la dosis intraperitoneal del inhibidor de la fosfodiesterasa teofilina (30 mg/kg) dos veces al día. El día diez se retiraron los músculos gastrocnemio medio y tibial anterior y se pesaron para determinar el grado de la atrofia.

La Figura 5 (Fig. 5) demuestra que tanto la sauvagina como la urocortina inhiben la atrofia inducida por deservación del músculo tibial anterior, en un modelo de atrofia por deservación del nervio ciático en ratón. Además, se observó la hipertrofia de la pierna no deservada con el tratamiento con urocortina. Leyenda: A - agua (control); B - sauvagina (1 mg/kg/d); C - urocortina (1,0 mg/kg/d); * - $p \leq 0,05$ comparado con agua. Después de la deservación del nervio ciático derecho, a los ratones se les dosificaron los agentes o el vehículo de control (solución salina fisiológica) anteriores mediante la infusión continua, utilizando una minibomba osmótica Alzet a $5 \mu\text{l/hr}$ hasta el fin del período del experimento (sin teofilina adicional). La dosis suministrada diariamente de los agentes se indicó anteriormente. La implantación de la minibomba se realizó al mismo tiempo que la deservación del nervio ciático. El día nueve se retiró el músculo tibial anterior y se pesó para determinar el grado de la atrofia.

La Figura 6 (Fig. 6) demuestra que la urocortina inhibe la atrofia inducida por la falta de uso de los músculos tibial anterior (Fig. 6A) y gastrocnemio medio (Fig. 6B) en el modelo de atrofia por falta de uso por enyesado de la pierna del ratón. Leyenda: A - solución salina fisiológica (control); B - urocortina (0,3 mg/kg) + teofilina; * - $p \leq 0,05$ comparado con la solución salina. Después del enyesado de la pierna trasera derecha, a los ratones macho se les inyectó urocortina o el vehículo de control (solución salina fisiológica) en forma subcutánea, en la región media escapular dos veces al día, durante diez días. La urocortina se administró de acuerdo a las dosis indicadas en la descripción de las Figuras 6A y 6B. La urocortina se administró conjuntamente con la dosificación intraperitoneal del inhibidor de la fosfodiesterasa, la teofilina (30 mg/kg), dos veces al día. El día diez se retiraron los músculos gastrocnemio medio y tibial anterior y se pesaron para determinar el grado de la atrofia.

La Figura 7 (Fig. 7) demuestra que la sauvagina inhibe la atrofia inducida por deservación de los músculos tibial anterior (Fig. 7A), EDL (Fig. 7D), síleo (Fig. 7C), gastrocnemio medio (Fig. 7D) y plantar (Fig. 7E). Además, la sauvagina provocó una hipertrofia estadísticamente significativa del músculo EDL no deservado (Fig. 7B). Leyenda: A - solución salina fisiológica (control); B - sauvagina

(0,003 mg/kg) + teofilina; C - sauvagina (0,01 mg/kg) + teofilina; D - sauvagina (0,03 mg/kg) + teofilina; # - $p < 0,05$ comparado con los controles correspondientes. Después de la desnervación del nervio ciático derecho, a las ratas macho adrenalectomizadas (se utilizaron ratas adrenalectomizadas para retirar los efectos inductores de la atrofia musculoesquelética por activación del eje HPA mediante el agonismo del CRF₁R) se les inyectó ya sea sauvagina o el vehículo de control (solución salina fisiológica), en forma subcutánea en la región media escapular, dos veces al día durante nueve días de acuerdo a las dosis anteriormente mostradas. La sauvagina se administró conjuntamente con 30 mg/kg de teofilina. El día nueve, se retiraron los músculos tibial anterior, extensor largo del dedo (EDL), sóleo, gastrocnemio medio y plantar y se pesaron para determinar el grado de la atrofia.

La Figura 8 (Fig. 8) demuestra que la sauvagina inhibe la atrofia observada en ratones de tipo silvestre, pero no en ratones knockout en el CRF₂R, en el modelo de atrofia por desnervación del nervio ciático en ratón. Leyenda: A-C - ratones de tipo silvestre; D-F - ratones knockout en el CRF₂R. A y D - agua (control); B y E - sauvagina (0,3 mg/kg/d); C y F - sauvagina (1,0 mg/kg/d); * - $p < 0,05$ comparado con la solución salina. Después de la desnervación del nervio ciático derecho, a los ratones hembras silvestres y a los ratones knockout en el CRF₂R se les dosificó sauvagina o vehículo de control mediante infusión continua, utilizando una minibomba osmótica Alzet a 5 μ l/hr durante nueve días a la dosis suministrada diariamente e indicada anteriormente. El día nueve se retiró el músculo tibial anterior y se pesó para determinar el grado de la atrofia.

La Figura 9 (Fig. 9) demuestra que la sauvagina inhibe la pérdida inducida por la falta de uso de la masa muscular del EDL y del sóleo (Fig. 9A), e inhibe la pérdida de la función muscular, conforme se evaluó mediante la medición de la fuerza absoluta (Fig. 9B) en el modelo de atrofia por falta de uso por enyesado de la pierna del ratón. Leyenda: A - control de músculo no enyesado; B - músculo enyesado, control de solución salina; C - músculo enyesado, sauvagina (0,3 mg/kg) + teofilina (30 mg/kg); * - $p < 0,05$ en comparación con la solución salina. Después del enyesado de la pierna trasera derecha, a los ratones macho se les inyectó ya sea sauvagina o el vehículo de control (solución salina fisiológica), en la región media escapular, dos veces al día, durante diez días de acuerdo a las dosis anteriormente indicadas. La sauvagina se administró conjuntamente con 30 mg/kg de teofilina. El día diez, se retiraron los músculos EDL y sóleo y se tomaron las mediciones de fuerza y masa absolutas para determinar el grado de la atrofia.

III. Preparación de los CRFR, el CRF o los análogos de CRF, o las líneas celulares que expresan a los CRFR

El CRF₁R, CRF₂R, CRF y los análogos del CRF pueden prepararse para una variedad de usos que incluyen, en forma enunciativa: la generación de anticuerpos, el uso como reactivos en los ensayos de tamizado de la presente invención y el uso como reactivos farmacéuticos para el tratamiento de la atrofia musculoesquelética. Para alguien con experiencia en el campo será evidente que para ciertas modalidades de la invención, serán más útiles los polipéptidos purificados, en tanto que para otras modalidades serán más útiles las líneas celulares que expresan a los polipéptidos. Por ejemplo, en situaciones en donde es importante conservar la estructura y características funcionales del CRFR, por ejemplo, en un método de tamizado para identificar a los compuestos candidato que activan a los CRFR, es deseable utilizar células que expresen a los CRFR funcionales.

Debido a que el CRF y los análogos del CRF son polipéptidos cortos, los experimentados en el campo reconocerán que estos polipéptidos serán suministrados de la forma más conveniente por medio de la síntesis directa, en vez de por medios recombinantes, utilizando técnicas bien conocidas en el campo. Además, muchas de estas moléculas se encuentran comercialmente disponibles.

Cuando la fuente de los CRFR es una línea celular que expresa al polipéptido, las células que, por ejemplo, pueden expresar en forma endógena al CRFR, han sido estimuladas para aumentar la expresión endógena del CRFR o han sido genéticamente modificadas para expresar un CRFR. En el campo se conocen los métodos para determinar si una línea celular expresa a un polipéptido de interés. Por ejemplo, la detección del polipéptido con un anticuerpo apropiado, el uso de una sonda de ADN para detectar ARNm que codifica para la proteína (por ejemplo, las técnicas de transferencia northor o PCR), o para medir la unión de un agente selectivo para el polipéptido de interés (por ejemplo, un agonista selectivo con etiqueta radioactiva).

El uso de la tecnología del ADN recombinante en la preparación de CRF₁R, CRF₂R, o de las líneas celulares que expresan a estos polipéptidos está contemplado en forma particular. Estos métodos recombinantes son bien conocidos en el campo. Para expresar un CRF₁R o CRF₂R recombinante, se prepara un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica para el polipéptido de interés con el control de uno o más elementos reguladores. Las secuencias genómicas o de ADNc que codifican para el CRF₁R y el CRF₂R de varias especies se ha descrito y puede obtenerse fácilmente de la base de datos de GenBank (que puede obtenerse en <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>) o de la base de

41

datos de Dcrwent (que puede obtenerse en <<http://www.dcrwent.co.uk/genescq/index.html>>) así como de la secuencia de listados de esta solicitud. Los números de acceso de las secuencias CRF₁R y CRF₂R y sus correspondientes SEQ. ID NOS se muestran en el cuadro I. Con el uso de esta información de secuencias que está disponible en forma pública, un medio para aislar una molécula de ácido nucleico que codifica para el CRF₁R o el CRF₂R, es tamizar un ADN genómico o una biblioteca de ADNc con una sonda de ADN natural o sintetizada en forma artificial, utilizando los métodos bien conocidos en el campo, por ejemplo, mediante amplificación por PCR de la secuencia de una biblioteca adecuada. Otro método es utilizar a los cebadores de oligonucleótido específicos para el receptor de interés para amplificar por PCR el ADNc directamente del ARNm aislado de un tejido particular (como por ejemplo, el músculo esquelético). Este ARNm está comercialmente disponible. Alguien de experiencia en el campo también reconocerá que al utilizar sondas de ácido nucleico correspondientes a porciones de secuencias del receptor de CRFR conocido, pueden obtenerse las secuencias de los ADNc homólogos o las secuencias genómicas de otras especies, utilizando los métodos conocidos. En los métodos de la presente invención son particularmente útiles los receptores de CRFR de las especies que incluyen, en forma enunciativa, humana, de ratón, de rata, de cerdo, de mono, de chimpancé, de lúd, de perro, de vaca, de oveja, de gato, de pollo y de pavo. Con los métodos bien conocidos en el campo, la molécula de ácido nucleico aislada que codifica para el CRFR de interés se liga entonces a un vector de expresión adecuado. El vector de expresión, preparado de esta manera, se expresa en una célula hospedera y las células hospederas que expresan el receptor se utilizan directamente en un ensayo de tamizado, o el receptor se aísla de las células hospederas que expresan el receptor y el receptor aislado se utiliza en un ensayo de tamizado.

Los sistemas de hospedero-vector de expresión que pueden ser utilizados para los fines de la invención incluyen, de forma enunciativa: microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformados con ADN de bacteriófago recombinante, vectores de expresión de ADN de plásmido o de ADN de cósmido que contienen secuencias de nucleótidos de CRFR; levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformadas con vectores de expresión de levadura recombinante que contienen secuencias de nucleótidos del CRFR; sistemas de células de insectos infectadas con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias de nucleótido de CRFR; sistemas de células de plantas infectados con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, el virus mosaico de la coliflor, el virus mosaico del tabaco) o transformados con vectores de expresión de plásmido recombinante (por ejemplo, plásmido de T1) que contienen secuencias de nucleótido del CRFR; o sistemas de células de mamífero (por ejemplo, COS, CHO, HFK293, NIH3T3)

que albergan constructos de expresión recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, retrovirus LTR) y también contienen secuencias de nucleótidos de CRFR.

5 Se usa a la célula hospedera para producir el polipéptido de interés. Debido a que el CRFR es una molécula unida a la membrana, se purifica a partir de las membranas de la célula hospedera o el CRFR se utiliza mientras está anclado a la membrana celular, es decir, se usan células completas o fracciones de la membrana celular. La purificación o el enriquecimiento o concentración de los CRFR de estos sistemas de expresión se logra utilizando los detergentes y micelas lipídicas adecuadas por medio de métodos bien conocidos por los experimentados en el campo.

10 En los sistemas bacterianos, pueden seleccionarse con ventaja varios vectores de expresión, dependiendo del uso que se pretende para el producto génico que será expresado. Por ejemplo, cuando se produce una gran cantidad de esta proteína para la generación de anticuerpos para los CRFR, son deseables los vectores que dirigen la expresión de elevados niveles de productos proteínicos. Alguien con experiencia en el campo puede generar estos constructos de vector y purificar las proteínas por
15 medio de una variedad de metodologías que incluyen las tecnologías de purificación selectiva, tales como las columnas selectivas de proteína de fusión, las columnas de anticuerpos y las tecnologías de purificación no selectivas.

En un sistema de expresión de proteínas de insecto, como vector para expresar genes extraños en células de *S. frugiperda* se usa el baculovirus del virus de la polihedrosis nuclear (AcNPV) *A. californica*. En este caso, las secuencias de nucleótidos del CRFR se clonan en regiones no esenciales del virus y se colocan bajo el control de un promotor de AcNPV. Los virus recombinantes se utilizan entonces para infectar células en las que se expresa el gen insertado y la proteína se purifica mediante una de las muchas técnicas conocidas por los experimentados en el campo.

En las células del hospedero mamífero pueden utilizarse varios sistemas de expresión de base viral. La utilización de estos sistemas de expresión con frecuencia necesita la creación de señales de inicio específicas en los vectores para la traducción eficiente de las secuencias de nucleótidos insertadas. Esto es particularmente importante si se utiliza una porción del gen de CRFR que no contiene la señal de inicio endógena. La colocación de esta señal de inicio junto con la región de codificación de la secuencia de nucleótidos insertada, así como la adición de elementos que aumentan la transcripción y la traducción y la purificación de la proteína recombinante se logran mediante una de las muchas metodologías que conocen los experimentados en el campo. En las células hospedadoras de mamífero también es

importante la selección de un tipo de célula adecuado que tenga la capacidad para las necesarias modificaciones post-traduccionales de la proteína recombinante. Estas modificaciones, por ejemplo, escisión, fosforilación, glicosilación, etcétera, necesitan la selección de la célula hospedadora adecuada que contenga a las enzimas modificadoras. Estas células hospedadoras incluyen, en forma enunciativa, CHO, HEK293, NIH3T3, COS, etcétera y son conocidas por los experimentados en el campo.

Para la expresión elevada y de largo plazo de proteínas recombinantes se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, pueden diseñarse líneas celulares que expresen en forma estable a los CRFR. Alguien con experiencia en el campo, siguiendo los métodos conocidos, tales como por ejemplo: la electroporación, la transfección en fosfato de calcio o la transfección mediada por liposoma, puede generar una línea celular que exprese en forma estable a los CRFR. Esto se logra normalmente mediante la transfección de células que utilizan vectores de expresión que contienen elementos de control de expresión adecuados (por ejemplo, secuencias promotoras, secuencias intensificadoras, secuencias de la terminación transcripcional, sitios para la poliadenilación, sitios para el inicio de la traducción, etc.), un marcador seleccionable y el gen de interés. El marcador seleccionable puede ya sea estar contenido dentro del mismo vector como el gen de interés o puede estar contenido en un vector separado, el cual se transfecta en forma conjunta con la secuencia de CRFR que contiene al vector. El marcador seleccionable en el vector de expresión puede conferir resistencia a la selección y permitir que las células integren al vector en forma estable en sus cromosomas y se desarrollen para formar focos que a su vez puedan ser clonados y expandidos en líneas celulares. En forma alternativa, el vector de expresión puede permitir la selección de la célula que expresa al marcador seleccionable utilizando un atributo físico del marcador, es decir, la expresión de la proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein o GFP, por sus siglas en inglés) y permite la selección de células que expresen al marcador utilizando el análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés).

Una persona con experiencia en el campo puede seleccionar un tipo de célula adecuada para la transfección con el fin de permitir la selección de células en las que se ha integrado satisfactoriamente el gen de interés. Por ejemplo, cuando el marcador seleccionable es la enzima timidina del virus del herpes simple, la hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa o adenina fosforibosiltransferasa, el tipo de célula adecuado sería, respectivamente, una de las células tk, hprt o aprt. O pueden utilizarse células normales en donde el marcador seleccionable es dhfr, gpt, neo o hlgro, el que confiere resistencia al metotrexato, al ácido micofenólico, al G-418 o a la higromicina, respectivamente. Estas líneas celulares recombinantes son útiles para la identificación de los compuestos candidato que afectan la actividad del CRFR.

IV. Preparación de anticuerpos del CRFR

Los anticuerpos que reconocen en forma selectiva uno o más epítopos de un CRFR también están incluidos en la presente invención. Estos anticuerpos incluyen, por ejemplo, anticuerpos policlónicos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos de humano, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, moléculas producidas utilizando la biblioteca de expresión Fab, anticuerpos de humano (policlónicos o monoclonales) producidos en ratones transgénicos y fragmentos de unión con epítopo de cualquiera de los anteriores. Para los usos terapéuticos, se prefieren los anticuerpos quiméricos o de humano, en donde los que tienen la máxima preferencia son los anticuerpos de humano.

Los anticuerpos pueden utilizarse en forma conjunta con los esquemas de tamizado de compuestos que se describen en la presente para la evaluación de los compuestos de prueba, por ejemplo, para la inmovilización de polipéptidos de CRFR, o estos anticuerpos pueden ser utilizados junto con las técnicas de terapia génica para evaluar, por ejemplo, la expresión de los CRFR, ya sea en células o directamente en los tejidos del paciente en los que se han introducido estos genes. Además, los anticuerpos de la presente invención son útiles en el tratamiento de la atrofia musculoesquelética. Los anticuerpos selectivos para el CRFR pueden tamizarse mediante los métodos de la presente invención para identificar un subconjunto de los anticuerpos que son agonistas del CRFR. Además, los anticuerpos anti-idiotipo generados contra los anticuerpos específicos del CRF o un análogo del CRF pueden ser útiles como agonistas del CRFR, y como anticuerpos anti-CRFR pueden ser tamizados en cuanto a su capacidad para activar al CRFR mediante los métodos de la presente invención.

Para la producción de anticuerpos, una variedad de animales hospederos puede ser inmunizada mediante la inyección de CRFR, CRF o un análogo del CRF, anticuerpo anti-CRF, anticuerpo análogo del anti-CRF o fragmentos inmunogénicos de los mismos, mediante los métodos bien conocidos en el campo. Para la preparación de un anticuerpo anti-idiotipo, el inmunógeno es un anticuerpo anti-CRF o un anticuerpo análogo de anti-CRF. La producción de anticuerpos anti-idiotipo se describe, por ejemplo, en la patente de los EE. UU. núm. 4,699,880, que se incorpora como referencia en la presente. Los animales hospederos adecuados incluyen, en forma enunciativa, conejos, ratones, cabras, ovejas y caballos. En el campo se conocen bien las técnicas de inmunización. Los anticuerpos policlónicos pueden purificarse a partir del suero de los animales inmunizados o los anticuerpos monoclonales pueden ser generados por medio de los métodos que son bien conocidos en el campo. Estas técnicas incluyen, en forma enunciativa, las bien conocidas técnicas de hibridoma de Kohler and Milstein, las técnicas del hibridoma

de la célula B humana y la tecnología del hibridoma del EBV. Los anticuerpos monoclonales pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina, que incluyen: IgG, IgE, IgM, IgA, y IgD, que contienen ya sea cadenas ligeras kappa o lambda.

Debido a la inmunogenicidad de los anticuerpos no humanos en seres humanos, cuando se utilizan para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos, se prefieren los anticuerpos quiméricos a los anticuerpos no humanos. Las técnicas para producir y utilizar los anticuerpos quiméricos son conocidas en el campo y se describen, por ejemplo, en las patentes de los EE. UU. núms. 5,807,715; 4,816,397; 4,816,567; 5,330,101; 5,583,089; 5,693,761; 5,693,762; 6,180,370; y 5,824,307, todas incorporadas en la presente como referencia.

Para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos son particularmente deseables los anticuerpos completamente humanos debido a que son menos inmunogénicos que los anticuerpos no humanos o que los anticuerpos quiméricos. Estos anticuerpos pueden ser producidos utilizando ratones transgénicos que prácticamente son incapaces de expresar genes de cadena larga o corta de inmunoglobulina endógena, pero que pueden expresar genes humanos de cadena larga y ligera. Los ratones transgénicos se inmunizan en la forma normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo todo el CRF2R o una parte del mismo. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno se obtienen utilizando la tecnología de hibridoma convencional a partir de estos ratones transgénicos inmunizados. Esta tecnología se describe con detalle en las patentes de los EE. UU. Núms. 5,874,299; 5,877,397; 5,369,825; 5,661,016; 5,770,429; y 6,075,161, incorporadas todas como referencia en la presente. Como una alternativa para obtener inmunoglobulinas humanas directamente del cultivo de las células de hibridoma, las células de hibridoma pueden utilizarse como la fuente de los loci de cadena larga o de cadena corta reacomodados para la posterior expresión o manipulación genética. El aislamiento de los genes de estas células productoras de anticuerpos es directo, ya que elevados niveles de los ARNm adecuados están disponibles. Los loci reacomodados y recuperados pueden manipularse según se desee. Por ejemplo, la región constante puede ser eliminada o intercambiada por la de un isotipo diferente, o las regiones variables pueden ligarse para codificar regiones Fv de una sola cadena. Estas técnicas se describen en la WO 96/33735 y WO 96/34096, incorporadas en la presente como referencia.

V. Selección de los compuestos de prueba

Los compuestos que pueden tamizarse de conformidad con los ensayos de la invención incluyen, en forma no limitativa, bibliotecas de los compuestos conocidos, incluyendo productos naturales como por ejemplo extractos de plantas o animales, compuestos químicos sintéticos, materiales biológicamente

activos que incluyen proteínas, péptidos tales como los péptidos solubles que incluyen, en forma enunciativa, a los miembros de las bibliotecas de péptidos aleatorios y la biblioteca molecular derivada por química combinatoria hecha con aminoácidos con configuración D o L, fosfolípidos (que incluyen, en forma enunciativa, miembros degenerados parcial o aleatoriamente, bibliotecas de fosfopéptidos dirigidos), anticuerpos (que incluyen, en forma enunciativa, anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos, de humano, anti-idiotípicos o de una sola cadena y Fab, F(ab')₂ y fragmentos de la biblioteca de expresión de Fab, y fragmentos de unión con el epítopo de los mismos) y moléculas orgánicas e inorgánicas.

Además de las fuentes más tradicionales de los compuestos de prueba, el modelado por computadora y las tecnologías de búsqueda permiten la selección racional de compuestos de prueba utilizando la información estructural del sitio de unión con el ligando del CRFR o de los agonistas ya identificados de los CRFR. Esta selección racional de los compuestos de prueba puede reducir el número de compuestos de prueba que deben tamizarse para identificar a un compuesto terapéutico candidato. Los CRFR son GPCR y, de este modo, el conocimiento de la secuencia de proteínas del CRFR permite la generación de un modelo de su sitio de unión que puede ser utilizado para tamizar a los ligandos potenciales. Este proceso puede lograrse de varias formas bien conocidas en el campo. Brevemente, la aproximación más robusta incluye generar una alineación de secuencias de la secuencia del CRFR con una plantilla o molde (derivado de las estructuras cristalinas de rodopsina o bacterio-rodopsina o de otro modelo de GPCR), la conversión de las estructuras de aminoácidos y la refinación del modelo mediante la mecánica molecular y el examen visual. Si no puede obtenerse la alineación de una secuencia fuerte, entonces también puede generarse un modelo construyendo modelos de las hélices hidrofóbicas. Éstas se ajustan entonces haciendo girar y trasladando cada hélice con respecto a las otras, comenzando desde el arreglo general de las estructuras de rodopsina conocidas. Los datos de mutaciones que apuntan hacia los contactos residuo-residuo también pueden ser utilizados para colocar a las hélices una con respecto a la otra de modo que se obtengan estos contactos. Durante este proceso, también puede usarse el acoplamiento de los ligandos conocidos en la cavidad del sitio de unión dentro de las hélices para ayudar a colocar a las hélices mediante el desarrollo de interacciones que estabilizarían la unión del ligando. El modelo también puede refinarse por medio del refinamiento utilizando la mecánica molecular y la construcción de bucles intracelulares y extracelulares utilizando técnicas de homología estándar. La información general referente a la estructura del GPCR y el modelado pueden encontrarse en Schneberg, T. et. al., *Molecular and Cellular Endocrinology*, 151:181-193 (1999), Flower, D.,

Biochimica et Biophysica Acta, 1422:207-234 (1999), y en Sexton, P.M., *Current Opinion in Drug Discovery and Development*, 2(5):440-448 (1999).

Una vez que el modelo está terminado, puede ser utilizado junto con uno de los varios programas de computadora existentes para reducir el número de compuestos que serán tamizado mediante los métodos de tamizado de la presente invención. El más general de estos programas es el programa DOCK (UCSF Molecular Design Institute, 533 Parnassus Ave, II-64, Box 0446, San Francisco, California 94143-0446). En muchas de sus variantes pueden tamizarse las bases de datos de compuestos comerciales, patentados o ambos, buscando el ajuste estérico y la complementariedad electrostática general con el sitio de unión. Con frecuencia se ha encontrado que las moléculas que marcan bien dentro del DOCK tienen una mejor oportunidad de ser ligandos. Otro programa que puede ser utilizado es el FLEXX (Tripos Inc., 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144-2913 (www.tripos.com)). Este programa, al ser significativamente más lento, normalmente se restringe a búsquedas en bases de datos de compuestos más pequeñas. El esquema de marcación dentro del FLEXX es más detallado y normalmente proporciona un mejor estimado de la capacidad de unión que el del estimado de DOCK. FLEXX se utiliza mejor para confirmar las sugerencias de DOCK o para examinar bibliotecas de compuestos que se generan en forma combinatoria a partir de ligandos o de moldes.

VI. Ensayos de tamizado para identificar a los compuestos candidato para la regulación de la masa o función musculoesquelética

El hallazgo de que el CRF₂R desempeña una función en la regulación de la atrofia musculoesquelética, habilita varios métodos para el tamizado de uno o más compuestos de prueba para identificar a los compuestos candidato que finalmente podrían ser utilizados para el tratamiento profiláctico o terapéutico de la atrofia musculoesquelética. Esta invención proporciona métodos para tamizar compuestos de prueba en cuanto a su capacidad para unirse al CRF₂R, activar al CRF₂R, prolongar o aumentar la activación inducida por agonista del CRF₂R o de una ruta de transducción de señal del CRF₂R o aumentar la expresión de los genes del CRF₂R o del CRF.

Debido a que el CRF₂R y el CRF₁R son proteínas homólogas, se espera que una cierta proporción de los agonistas del CRF₂R funcionen también como agonistas del CRF₁R. Conforme se comentó anteriormente, la activación del CRF₁R induce la activación del eje HPA y la producción acompañante de corticosteroides. En la mayoría de los casos en los que se desea un aumento en la masa o función muscular, no es deseable activar el eje HPA. Por lo tanto, además de tamizar a los compuestos de prueba en cuanto a su capacidad para activar al CRF₂R, la invención también proporciona el uso del

CRF₂R y del CRF₁R para tamizar los agonistas selectivos del CRF₂R. Cuando se selecciona un compuesto candidato útil para el tratamiento de la atrofia muscular crónica o aguda que no esté relacionado con la distrofia muscular, es preferible que los compuestos candidato sean selectivos para el CRF₂R. De preferencia, el compuesto candidato muestra una selectividad de 10 veces para el CRF₂R contra el CRF₁R (es decir, es 10 veces más activo contra el CRF₂R que contra el CRF₁R), con más preferencia una selectividad de 100 veces y con la máxima preferencia, una selectividad de 1000 veces o más. Conforme los estudios publicados han demostrado el beneficio de la terapia con corticosteroides en el tratamiento de las distrofias musculares, podría ser benéfico que un agonista del CRF₂R conserve cierto nivel del agonismo del CRF₁R cuando se utiliza para tratar las distrofias musculares. De este modo, para el tratamiento de las distrofias musculares se prefiere un compuesto de menor selectividad que active al CRF₂R así como al CRF₁R, en una gama de concentraciones similares. De preferencia, el compuesto candidato es 100 veces más selectivo para el CRF₂R contra el CRF₁R, con más preferencia 10 veces más selectivo y con la máxima preferencia no es selectivo del CRF₂R contra el CRF₁R (es decir, la actividad del compuesto candidato es substancialmente similar a la del CRF₂R y del CRF₁R).

También, en este caso, podría ser más preferible que el compuesto sea un agonista completo del CRF₂R en tanto que es un agonista parcial del CRF₁R. Por lo tanto, este compuesto candidato tendría un límite integrado en cuanto al grado máximo de elevación de cortisol y potencial para la atrofia muscular, en tanto que el efecto antiatrófico mediado a través del CRF₂R podría aumentarse aumentando la dosis. Cualquiera con experiencia en el campo podría determinar fácilmente si un compuesto candidato es un agonista completo o parcial del CRF₁R o del CRF₂R utilizando los métodos conocidos en el campo.

Para tamizar los compuestos que finalmente serán utilizados para regular la masa o función musculoesquelética, por medio del CRF₂R en seres humanos, se prefiere que el tamizado inicial *in vitro* se realice utilizando un CRF₂R con una secuencia de aminoácidos que tenga más del 80% de identidad con la SEQ ID NO:10 y, con más preferencia, mayor del 90% de identidad con SEQ ID NO:10. De manera más preferente, los compuestos de prueba serán tamizados contra CRF₂R de humano, de ratón o de rata, en donde el que tiene la máxima preferencia es el de humano. Para tamizar compuestos que finalmente serán utilizados para regular la masa o función musculoesquelética por medio del CRF₂R en una especie no humana, se prefiere utilizar el CRF₂R de las especies en las que se tiene contemplado el tratamiento.

Para tamizar con el fin de determinar el nivel de actividad que un compuesto de prueba o candidato tiene hacia el CRF₁R para determinar qué selectividad, en caso de que la haya, muestra un candidato compuesto para el CRF₂R contra el CRF₁R, se prefiere que el tamizado inicial se realice

utilizando un CRF₁R con una secuencia de aminoácidos que tenga una identidad mayor al 80%, con la SEQ ID NO:2 y, con mayor preferencia, más del 90% de identidad con SEQ ID NO:2. Con mayor preferencia, los compuestos de prueba serán tamizados contra un CRF₁R de humano, de ratón o de rata, en donde el que tiene la máxima preferencia es el de humano. Para tamizar compuestos que finalmente serán utilizados para regular la masa o función musculoesquelética en una especie no humana, se prefiere utilizar el CRF₁R de especies en las que se tiene contemplado el tratamiento.

Los métodos de la presente invención son susceptibles de usarse en aplicaciones de elevada capacidad; no obstante, el uso de un número tan pequeño de compuestos de prueba como un compuesto en el método, está incluido en el término "tamizar". Los compuestos de prueba que se unen al CRF₂R, activan al CRF₂R, prolongan o aumentan la activación, inducida por agonista, del CRF₂R o de una ruta de transducción de señal de CRF₂R o aumentan la expresión de los genes CRF₂R o CRF, según se determina mediante un método de la presente invención, son denominados en la presente como "compuestos candidato". Estos compuestos candidato pueden ser utilizados para regular la masa o función musculoesquelética. Sin embargo, más comúnmente, este primer nivel de tamizado *in vitro* proporciona un medio, mediante el cual se selecciona un intervalo más estrecho de compuestos; es decir, los compuestos candidato, los cuales ameritan una investigación adicional en niveles adicionales de tamizado. El técnico experimentado reconocerá que la utilidad de la presente invención es identificar, a partir de un grupo de uno o más compuestos de prueba, un subconjunto de compuestos que ameritan la investigación adicional. Alguien con experiencia en el campo también reconocerá que los ensayos de la presente invención son útiles en la clasificación de la probable utilidad de un compuesto candidato particular, con respecto a otros compuestos candidato. Por ejemplo, un compuesto candidato que activa al CRF₂R a 1000 nM (pero no a 10 nM) tiene menor interés que aquél que activa al CRF₂R a 10 nM. Utilizando esta información, el técnico experimentado puede seleccionar un subconjunto de los compuestos candidato, identificados en el primer nivel de tamizado, para su investigación adicional. Solamente a manera de ejemplo, los compuestos que activan al CRF₂R a concentraciones menores de 200 nM pueden probarse adicionalmente en un modelo animal de atrofia musculoesquelética, en tanto que aquéllos que están por encima del umbral ya no serían probados adicionalmente. El técnico experimentado también reconocerá que, dependiendo de la manera en que se seleccionó el grupo de compuestos de prueba y de cómo se seleccionaron los positivos, solamente se identificará como compuestos candidato a una cierta proporción de los compuestos de prueba y que esta proporción puede ser muy pequeña.

Con los sistemas de ensayo que se describen más adelante, pueden formularse kits que comprenden CRF₂R o células que expresan al CRF₂R que pueden envasarse en una variedad de recipientes, por ejemplo, viales, tubos de microtitulación, placas de cavidades, botellas y lo similar. Otros reactivos pueden incluirse en recipientes separados y suministrarse con el kit, por ejemplo, muestras de control positivo, muestras de control negativo, amortiguadores y medios para el cultivo celular.

En una modalidad, la invención proporciona un método para analizar uno o más compuestos de prueba para identificar compuestos candidatos que se unan al CRF₂R. Los métodos para determinar la unión de un compuesto con un receptor son bien conocidos en el campo. Normalmente, los ensayos incluyen los pasos de incubar una fuente del CRF₂R con un compuesto etiquetado, que se sabe se une al receptor, en presencia o ausencia de un compuesto de prueba, y determinar la cantidad del compuesto etiquetado unido. La fuente del CRF₂R puede ser ya sea células que expresan al CRF₂R o alguna forma del CRF₂R aislado, conforme se describe en la presente. El compuesto etiquetado puede ser CRF o cualquier análogo del CRF etiquetado, de tal forma que pueda medirse, preferentemente en forma cuantitativa (por ejemplo, 125I-etiquetado, europio etiquetado, fluorescencia etiquetada, GFP etiquetado, 35S-metionina etiquetada). Estos métodos de etiquetado son bien conocidos en el campo. Los compuestos de prueba que se unen al CRFR provocan una reducción en la cantidad del ligando etiquetado unido al receptor, reduciendo de esta manera el nivel de la señal en comparación con el de las muestras de control (ausencia del compuesto de prueba). Se han descrito variaciones de esta técnica, en las que la unión al receptor en presencia y en ausencia de agentes de desacoplamiento de la proteína G pueden discriminar a los agonistas de los antagonistas (por ejemplo, la unión en ausencia y en presencia de un análogo de nucleótido de guanina, es decir, GpppNHp). Ver Koen, M., *Radioligand Binding Methods for Membrane Preparations and Intact cells en Receptor Signal Transduction Protocols*, R.A.J. Challin, (ed), Humana Press Inc., Totoway N.J. (1997).

Debido a que es deseable discriminar entre compuestos que se unen específicamente al CRF₂R, en comparación con el CRF₁R, los ensayos anteriormente descritos deben realizarse utilizando una célula o una membrana de una célula que exprese solamente al CRF₂R o los ensayos pueden realizarse con una fuente recombinante del CRF₂R. Las células que expresan ambas formas del CRFR pueden modificarse utilizando la recombinación homóloga para inactivar o inhabilitar de otra manera al gen del CRF₁R. En forma alternativa, si la fuente del CRFR contiene más de un tipo de CRFR, la señal de fondo producida por el receptor que no es de interés debe ser sustraída de la señal obtenida en el ensayo. La respuesta de fondo puede determinarse mediante varios métodos que incluyen la eliminación de la señal

del CRFR que no es de interés mediante el uso de anticuerpos antisentido o antagonistas selectivos. Los antagonistas conocidos de los CRFR incluyen antalarina (selectiva del CRF₁R), antisauvagina-30 (selectiva del CRF₂R) y astresina (no selectiva para el CRF₁R / CRF₂R).

En otra modalidad, la invención proporciona métodos para tamizar compuestos de prueba con el fin de identificar compuestos candidato que activan al CRF₂R, al CRF₁R o a ambos. Normalmente, los ensayos están basados en células; no obstante, se conocen ensayos sin células que pueden diferenciar la unión con el agonista y el antagonista, según se describió anteriormente. Los ensayos basados en células incluyen los pasos de poner en contacto a las células que expresen al CRF₁R o al CRF₂R con un compuesto de prueba o control y la medición de la activación del CRFR con la medición de la expresión o actividad de los componentes de las rutas de transducción de la señal del CRFR.

Conforme se describió en la anterior sección de antecedentes, parece que los CRFR se acoplan a través de varias rutas diferentes que incluyen G_{12s}, G_{12q} o G_{12i}, dependiendo del tipo de célula. Se piensa que la activación del agonista del CRFR permite que el receptor envíe una señal por medio de cualesquiera de estas rutas, siempre que los componentes de la ruta necesaria estén presentes en el tipo de célula particular. De este modo, para tamizar la activación del CRFR, un ensayo puede utilizar cualquiera de las rutas de transducción de señal como la lectura incluso si el tipo de célula relevante para el tratamiento, *in vivo*, acopla el CRFR con la atrofia musculoesquelética por medio de una ruta diferente. Alguien con habilidad ordinaria en el campo reconocería que un ensayo de tamizado sería efectivo para identificar agonistas del CRFR útiles, independientemente de la ruta a través de la cual se midió la activación del receptor. Los ensayos para medir la activación de estas rutas de señalización se conocen en el campo.

Por ejemplo, después del contacto con el compuesto de prueba, los lisados de las células pueden prepararse y ensayarse para la inducción del AMPc. El AMPc se induce en respuesta a la activación de G_{12s}. Debido a que la G_{12s} es activada por otros receptores diferentes al CRFR y debido a que un compuesto de prueba puede estar ejerciendo su efecto a través de los CRFR o a través de otro mecanismo, son relevantes dos comparaciones de control para determinar si un compuesto de prueba aumenta los niveles del AMPc mediante la activación de un CRFR. Un control compara el nivel del AMPc de las células que se pusieron en contacto con un compuesto de prueba y el nivel de AMPc de las células que se pusieron en contacto con un compuesto de control (es decir, el vehículo en el que se disuelve el compuesto de prueba. Si el compuesto de prueba aumenta los niveles del AMPc con respecto al compuesto de control, esto indica que el compuesto de prueba está aumentando al AMPc a través de algún mecanismo. El otro control compara los niveles del AMPc de una línea celular que expresa al

CRFR y una línea celular que es esencialmente la misma con excepción de que no expresa al CRFR, en donde las dos líneas celulares han sido tratadas con el compuesto de prueba. Si el compuesto de prueba eleva los niveles de AMPc en la línea celular que expresa al CRFR con respecto a la línea celular que no expresa al CRFR, esta es una indicación de que el compuesto de prueba aumenta al AMPc por medio de la activación de los CRFR.

En una modalidad específica de la invención, la inducción del AMPc puede medirse con el uso de constructos de ADN que contienen al elemento que responde al AMPc ligado a alguno de una variedad de genes reporteros, que pueden ser introducidos en las células que expresan a los CRFR. Estos genes reporteros incluyen, en forma enunciativa, clorofenicol aciltransferasa (CAT), luciferasa, glucuronido sintetasa, hormona del crecimiento, proteínas fluorescentes (por ejemplo, la proteína verde fluorescente) o la fosfatasa alcalina. Después de la exposición de las células al compuesto de prueba, puede cuantificarse el nivel de expresión del gen reportero para determinar la capacidad del compuesto de prueba para aumentar los niveles del AMPc y, de este modo, determinar la capacidad de los compuestos de prueba para activar al CRFR.

Las células útiles en este ensayo son las mismas que para el ensayo de unión con el CRFR anteriormente descrito, con la excepción de que las células utilizadas en los ensayos de activación preferentemente expresan un receptor funcional que proporciona una respuesta estadísticamente significativa al CRF o a uno o más análogos del CRF. Además de utilizar células que expresan a los CRFR de longitud completa, pueden diseñarse células que expresen a los CRFR que contienen el dominio de unión con el ligando del receptor acoplado a, o modificado físicamente para contener a los elementos reporteros o interactuar con las proteínas de señalización. Por ejemplo, un CRFR de tipo silvestre o un fragmento del CRFR puede ser fusionado a una proteína G que resulta en la activación de la proteína G fusionada con la unión del agonista a la porción del CRFR de la proteína de fusión. (Siefert, R. et al., *Trends Pharmacol. Sci.* 20: 383-389 (1999)). Las células también deben poseer, preferentemente, varias características que dependen de la lectura, para maximizar la respuesta inductiva por medio del CRF o del análogo del CRF, por ejemplo, para detectar una fuerte inducción de un gen reportero de CRE: (a) un bajo nivel natural del AMPc; (b) proteínas G capaces de interactuar con los CRFR; (c) un elevado nivel de adenilil ciclasa; (d) un elevado nivel de proteína cinasa A; (e) un bajo nivel de fosfodiesterasas; y (f) un elevado nivel del elemento de respuesta al AMPc que se une a la proteína acríla ventajoso. Para aumentar la respuesta al CRF o a un análogo del CRF, podrán diseñarse células hospederas para expresar una cantidad mayor de factores favorables o una cantidad menor de

factores desfavorables. Además, podrían eliminarse las rutas alternativas para la inducción del reportero del CRF para reducir los niveles basales.

En algunos casos, aminoran las respuestas del receptor acoplado a la proteína G, o se desensibilizan, después de una prolongada exposición a un agonista. Otra modalidad de la invención proporciona métodos para identificar compuestos que prolongan o aumentan la activación inducida por agonista del CRF₂R, o la ruta de transducción de señal del CRF₂R, en respuesta a un agonista del CRF₂R. Estos compuestos pueden ser utilizados, por ejemplo, junto con un agonista del CRF₂R, para el tratamiento de la atrofia musculoesquelética. Normalmente, el método utiliza un ensayo basado en células que comprende, en cualquier orden o en forma concurrente, (i) poner en contacto a las células con un compuesto de prueba; (ii) tratar a las células que expresan al CRF₂R funcional con un agonista del CRF₂R a una concentración de agonista y durante un período de exposición agonista-receptor suficiente para permitir la desensibilización del receptor; seguido por (iii) determinar el nivel de activación del CRF₂R. Alguien con experiencia en el campo reconocerá que diversos mecanismos contribuyen a la desensibilización del receptor, incluyendo, en forma no exhaustiva, la fosforilación del receptor, la internalización o degradación del receptor y la submodulación de la ruta de transducción de la señal del CRF₂R. Alguien con experiencia en el campo puede determinar el tiempo adecuado (es decir, antes, durante y después del tratamiento con agonista) para poner en contacto a las células con los compuestos de prueba, dependiendo de a cuál mecanismo de desensibilización se dirija. Por ejemplo, la puesta en contacto de las células con los compuestos de prueba después del tratamiento con agonista puede detectar compuestos de prueba que bloquean la desensibilización del receptor, lo que ocurre como resultado de la fosforilación del receptor.

En otra modalidad, la invención proporciona un método para tamizar uno o más compuestos de prueba para identificar a los compuestos candidato que regulan la transcripción del gen CRF₂R o que regulan la expresión del CRF₂R. Los compuestos candidato que regulan la actividad transcripcional de los genes del CRFR pueden identificarse utilizando un gen reportero asociado en forma operativa con una región reguladora del CRF₂R (construido de gen reportero). Estos métodos son conocidos en el campo. En uno de estos métodos, el constructo del gen reportero se pone en contacto con un compuesto de prueba en presencia de una fuente de factores celulares y se determina el nivel de expresión del gen reportero. Un compuesto de prueba que provoca un aumento en el nivel de expresión, en comparación con una muestra de control, es indicativo de un compuesto candidato que aumenta la transcripción del gen del CRF₂R. Para proporcionar los factores celulares necesarios para la transcripción *in vitro* o *in*

vivo, se preparan las células o extractos de células adecuadas a partir de cualquier tipo de célula que normalmente expresa al CRF_{2R}.

Los compuestos candidato que regulan la expresión del CRF_{2R} también pueden identificarse en un método en donde una célula se pone en contacto con un compuesto de prueba y se determina la expresión del CRFR. El nivel de expresión del CRF_{2R} en presencia del compuesto de prueba se compara con el nivel de expresión en ausencia del compuesto de prueba. Los compuestos de prueba que aumentan la expresión del CRF_{2R} se identifican como compuestos candidato para aumentar la masa muscular o la función muscular. Este método detecta compuestos candidato que aumentan la transcripción o la traducción del CRF_{2R} o que aumentan la estabilidad del ARNm o de la proteína del CRF_{2R}.

- 10 En otra modalidad, esta invención proporciona métodos para tamizar uno o más compuestos de prueba para identificar a los compuestos candidato que regulan la expresión del CRF o de un análogo del CRF. Estos ensayos se realizan esencialmente conforme se describió anteriormente para los ensayos con el fin de identificar compuestos que regulan la expresión de los CRFR con las siguientes modificaciones. Para identificar el compuesto candidato que regula la transcripción del gen del CRF o de un análogo del CRF, el gen reportero está asociado en forma operativa con la región reguladora del gen del CRF o del gen análogo del CRF de interés y la fuente de factores celulares debe ser de un tipo de célula que expresa al gen de interés.

VII. Tamizado de los compuestos candidato utilizando modelos de atrofia musculoesquelética

- 20 Los compuestos candidato seleccionados de uno o más de los compuestos de prueba, por medio de un ensayo *in vitro* conforme se describió anteriormente, pueden probarse adicionalmente en cuanto a su capacidad para regular la masa o función musculoesquelética en sistemas modelo de atrofia e hipertrofia musculoesquelética. Estos modelos de atrofia o hipertrofia musculoesquelética incluyen tanto modelos de cultivo celular *in vitro* como modelos animales *in vivo* de la atrofia musculoesquelética. Estos niveles adicionales de tamizado son útiles para estrechar adicionalmente el intervalo de compuestos candidato que ameritan investigación adicional, por ejemplo, pruebas clínicas.

Modelos de cultivo celular de atrofia muscular

- En el campo se conocen los modelos *In vitro* de la atrofia musculoesquelética. Estos modelos se describen, por ejemplo, en Vandeburgh, H.H., *In Vitro* 24:609-619 (1988), Vandeburgh, H.H. et al., *J of Biomechanics*, 24 Suppl 1:91-99 (1991), Vandeburgh, H.H et al., *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 24(3):166-174 (1988), Chroniak, J.A., et al., *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 34(9):694-703 (1998), Shansky, J., et

al., *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 33(9):659-661 (1997), Perrone, C.E. et al., *J. Biol. Chem.* 270(5):2099-2106 (1995), Chromiac, I.A. and Vandenberg, H.H., *J. Cell. Physiol.* 159(3):407-414 (1994), and Vandenberg, H.H. and Karlisch, P., *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 25(7):607-616 (1989). Estos modelos son útiles, aunque no son necesarios, después del tamizado *in vitro* antes descrito, para estrechar adicionalmente el intervalo de compuestos candidato que amontan la prueba en un modelo animal. Los modelos de cultivo celular se tratan con compuestos candidato y la respuesta del modelo al tratamiento se mide evaluando los cambios en los marcadores musculares, tales como: síntesis o degradación de la proteína muscular, cambios en la masa musculoesquelética o en la función contráctil. Los compuestos que inducen cambios significativos en los marcadores musculares normalmente se tamizan adicionalmente en un modelo animal de atrofia musculoesquelética.

Modelos animales de la atrofia musculoesquelética

Los compuestos candidato se administran en animales y se monitorea la respuesta de los mismos, por ejemplo, mediante la evaluación de los cambios en los marcadores de la atrofia o de la hipertrofia, tales como: la masa musculoesquelética, la función musculoesquelética, el área en sección transversal del músculo o de la miofibrila, el contenido de la proteína contráctil, el contenido de la proteína no contráctil o un marcador bioquímico o genético que se correlaciona con los cambios en la masa o función musculoesquelética. Los compuestos candidato que inducen la hipertrofia musculoesquelética o que evitan cualquier aspecto de la atrofia musculoesquelética deben ser considerados como prospectos de candidatos terapéuticos para el tratamiento de la atrofia musculoesquelética humana y en la presente se les denominan compuestos terapéuticos candidato. Además de evaluar la capacidad de un compuesto candidato para regular la atrofia musculoesquelética, en este tamizado también pueden detectarse efectos secundarios indeseables, tales como la toxicidad. La ausencia de niveles inaceptablemente elevados de efectos secundarios puede ser utilizada como un criterio adicional para la selección de los compuestos terapéuticos candidato.

En el campo se conoce una variedad de modelos animales para la atrofia musculoesquelética, tales como los que se describen en las siguientes referencias: Herbison, G.J., et al. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 60:401-404 (1979), Appell, H.J. *Sports Medicine* 10:42-58 (1990), Hasselgren, P.-O. and Fischer, J.F. *World J. Surg.* 22:203-208 (1998), Agbenyega, E.T. and Wareham, A.C. *Comp. Biochem. Physiol.* 102A:141-145 (1992), Thomason, D.B. and Booth, F.W. *J. Appl. Physiol.* 68:1-12 (1990), Fitts, R.H., et al. *J. Appl. Physiol.* 60:1946-1953 (1986), Bramanti, P., et al. *Int. J. Anat. Embryol.* 103:45-64 (1998), Carter, G.D. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 50:137-141 (1995), Cork, L.C., et al. *Prog. Clin. Biol. Res.* 229:241-269 (1987), Booth, F.W. and Gollnick, P.D. *Med. Sci. Sports Exerc.* 15:415-420

36

(1983), Bloomfield, S.A. *Med. Sci. Sports Exerc.* 29:197-206 (1997). Los animales preferidos para estos modelos son ratones y ratas. Estos modelos incluyen, por ejemplo, modelos de atrofia inducida por la falta de uso, como por ejemplo, el enyesado o la inmovilización de las extremidades de alguna otra manera, la suspensión de la extremidad trasera, la inmovilización completa del animal y las situaciones con reducción en la gravedad. Los modelos de atrofia inducida por daños en el nervio incluyen, por ejemplo la trituration del nervio, el retiro de secciones de los nervios que inervan a músculos específicos, la aplicación de toxinas a los nervios y la infección de nervios con agentes virales, bacterianos o infecciosos cuantitativos. Los modelos de la atrofia inducida por glucocorticoides incluyen la aplicación a los animales de dosis inductoras de la atrofia de glucocorticoides exógenos y la estimulación de la producción de corticosteroides endógenos, por ejemplo, mediante la aplicación de hormonas que activan al eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal (HPIA). Los modelos de la atrofia inducida por sepsis incluyen, por ejemplo, la inoculación con organismos inductores de la sepsis, tales como bacterias, el tratamiento del animal con compuestos que activan la inmunidad, tales como extracto de la pared celular bacteriana o endotoxinas y la punción de las paredes intestinales. Los modelos de la atrofia inducida por caquexia incluyen, por ejemplo, inoculación de un animal con células tumorigénicas con potencial para formar la caquexia, la infección de un animal con agentes infecciosos (como por ejemplo, virus que provocan el SIDA) que dan como resultado la caquexia y el tratamiento de un animal con hormonas o citocinas, como CNTF, TNF, IL-6, IL-1, etc., que inducen la caquexia. Los modelos de atrofia inducida por falla cardíaca incluyen la manipulación de un animal, de modo que se presente la falla cardíaca con la atrofia musculoesquelética acompañante. Los modelos de atrofia inducida por enfermedades neurodegenerativas incluyen modelos de animales autoinmunitarios, tales como los que resultan de la inmunización de un animal con componentes neuronales. Los modelos inducidos por distrofia-muscular de la atrofia incluyen los modelos genéticamente inducidos, ya sea naturales o por intervención del hombre, de la distrofia muscular, tal como por ejemplo, la mutación del gen de la distrofina que se presenta en el ratón Mdx.

Los modelos animales de la hipertrofia musculoesquelética incluyen, por ejemplo, los modelos de aumento en el uso del músculo de la extremidad debido a la inactivación de la extremidad opuesta, el re-pesado después de un evento inductor de atrofia por falta de uso, la reutilización de un músculo que se atrofió debido a un daño transitorio en el nervio, el aumento en el uso de músculos selectivos debido a la inactivación de un músculo sinérgico (por ejemplo, la hipertrofia compensatoria), el aumento en la utilización del músculo debido a un aumento en la carga colocada en el músculo y la hipertrofia que resulta del retiro del glucocorticoide después de la atrofia inducida por glucocorticoide. Los modelos de

atrofia animal preferidos incluyen al modelo de atrofia por desnervación del nervio ciático, el modelo de la atrofia inducida por glucocorticoide y el modelo de atrofia por falta de uso por enyesado de la pierna, que se describen con mayor detalle más adelante.

El modelo de atrofia por desnervación del nervio ciático incluye el anestesiado del animal, seguido por el retiro quirúrgico de un segmento corto, ya sea del nervio ciático derecho o izquierdo, por ejemplo, en ratones el nervio ciático está aislado aproximadamente en el punto medio a lo largo del fémur y se retiró un segmento de 3-5 mm. Esto desnerva la musculatura inferior de la extremidad trasera, dando como resultado la atrofia de estos músculos. Normalmente, la innervación de los bíceps femorales se deja intacta para proporcionar el movimiento satisfactorio de la rodilla para la ambulación virtualmente normal. Normalmente, en los animales no tratados, la masa muscular de los músculos desnervados se reduce en 30%-50% diez días después de la desnervación. Después de la desnervación, se administran los compuestos de prueba, por ejemplo, mediante inyección o mediante infusión continua, por ejemplo, mediante la implantación de una minibomba osmótica (por ejemplo, Alzet, Palo Alto, CA), para determinar su efecto sobre la atrofia musculoesquelética inducida por desnervación. En varios momentos después de la desnervación, los animales se someten a la eutanasia y se diseccionan rápidamente los músculos inferiores de la pierna tanto de la pierna desnervada como de la no desnervada, los músculos, a los que se les quita los tendones y el tejido conectivo se pesan. Se analiza la extensión de la atrofia en los músculos afectados midiendo, por ejemplo, la masa muscular, el área en sección transversal del músculo, el área en sección transversal de la miofibra o el contenido de proteína contráctil.

el modelo de atrofia inducida por glucocorticoide involucra la administración de un glucocorticoide al animal de prueba, por ejemplo, de 1,2 mg/kg/día de dexametasona en el agua que beben. Normalmente, en los animales no tratados, la masa musculoesquelética se reduce en 30%-50% después de diez días de la administración de dexametasona. En forma concomitante o después de la administración de glucocorticoide, se administraron los compuestos de prueba, por ejemplo, por medio de inyección o mediante la infusión continua para determinar su efecto sobre la atrofia musculoesquelética inducida por glucocorticoide. En diversos momentos después de la administración del glucocorticoide, se analiza la extensión o el grado de la atrofia en los músculos afectados conforme se describió anteriormente para el modelo de desnervación.

El modelo de la atrofia por falta de uso por enyesado de la pierna involucra enyesar una pierna trasera de un animal desde la rodilla hasta el pie. Normalmente, la masa muscular se reduce en 20%-40% después de diez días del enyesado. Después del enyesado, los compuestos de prueba se administran por

medio de inyección o mediante la infusión continua a través de la implantación de una minibomba osmótica (por ejemplo, Alzet, Palo Alto, CA) para determinar su efecto sobre la atrofia musculoesquelética inducida por enyesado de la pierna. En diversos momentos después del enyesado de la pierna se analiza la extensión de la atrofia en los músculos afectados, conforme se describió anteriormente para el modelo de la desnervación.

Alguien con experiencia en el campo reconocerá que en el tamizado de los compuestos para el uso humano, debido a que existen diferencias entre el CRF₂R y el CRF₂R de otras especies animales, pueden existir algunos resultados negativos o falsos positivos que surgen cuando el tamizado se realiza utilizando CRF₂R no humano. De este modo, es preferible realizar el tamizado inicial *in vitro* utilizando CRF₂R humano. En ciertas circunstancias, los compuestos candidato identificados pueden activarse solamente hacia el receptor humano y no hacia el receptor no humano. En estas circunstancias, podría ser deseable determinar si estos compuestos candidato pueden regular la masa o función musculoesquelética en un segundo nivel de tamizado. Debido a que estos candidatos no activan al CRF₂R no humano, no se aconseja un tamizado *in vivo* estándar con un animal no humano. En estas circunstancias, el segundo nivel de tamizado de estos candidatos puede realizarse en animales transgénicos que expresan a los CRFR humanos.

Para generar animales transgénicos del CRFR, pueden utilizarse animales de cualquier especie, en especial mamíferos, que incluyen, en forma enunciativa, ratones, ratas, conejos, cobayos, cerdos, cabras, perros y primates. Se prefieren a los ratones y las ratas, la mayor preferencia es por los ratones. En el campo se conoce una variedad de técnicas y pueden ser utilizadas para introducir los transgenes del CRFR humano en los animales para producir las líneas fundadoras de los animales transgénicos. Estas técnicas incluyen, en forma enunciativa, la microinyección pronuclear, la transferencia de genes mediada por retrovirus en líneas germinales, enfocado de genes en hemocitoblastos embrionarios, electroporación de embriones y transferencia génica mediada por espermatozoides.

VIII. Métodos de terapia génica para el tratamiento de la atrofia musculoesquelética

La actividad total del CRF₂R puede aumentarse al sobreexpresar un gen para el CRF₂R (para aumentar la expresión del CRF₂R) o para activar constitutivamente al CRF₂R en el tejido adecuado. Los niveles del CRF pueden aumentarse, *in vivo*, al sobreexpresar del mismo modo un gen del CRF. La sobreexpresión de estos genes aumentará la actividad global del CRF₂R celular, regulando así a la atrofia musculoesquelética. El gen o los genes de interés se insertan en un vector adecuado para la expresión en el sujeto. Estos vectores incluyen, en forma enunciativa, adenovirus, adenovirus asociado al virus,

retrovirus y vectores del virus de herpes, además de otras partículas que introdujeron ADN en las células (por ejemplo, liposoma, partículas de oro, etcétera) o mediante la inyección directa del vector de expresión de ADN, que contiene al gen de interés, en el tejido humano (por ejemplo, el músculo).

IX. Formulaciones farmacéuticas y métodos de uso

5 Los compuestos candidato o los compuestos terapéuticos candidato identificados al tamizar los métodos que se describen en la presente, pueden administrarse a las personas para tratar la atrofia musculoesquelética o para inducir la hipertrofia musculoesquelética. Con este fin, la presente invención incluye métodos y composiciones para modular la atrofia musculoesquelética, que incluye, en forma enunciativa, la atrofia musculoesquelética inducida por la falta de uso debido a la cirugía, al reposo en cama, a huesos fracturados; a la desnervación/daño en el nervio debido a lesiones en la médula espinal; enfermedad autoinmunitaria; enfermedad infecciosa; el uso de glucocorticoides para condiciones no relacionadas; sepsis debida a infección o a otras causas; limitación de nutrientes debida a enfermedad o a la falta de alimento; caquexia por cáncer; inflamación crónica, caquexia por SIDA; COPD; insuficiencia cardíaca congestiva; sarcopenia y trastornos genéticos; por ejemplo, distrofias musculares, enfermedades neurodegenerativas. Los agonistas del CRF₂R pueden ser utilizados para inhibir la atrofia musculoesquelética. No es necesario que los compuestos eficaces demuestren la absoluta especificidad por el CRFR. Se tiene contemplado que el agonista específico de otros receptores afectados puedan ser administrados conjuntamente con un agonista efectivo, aunque no específico. En forma alternativa, esta falta de especificidad puede ser dirigida por la modulación de dosis única o del régimen de dosificación.

20 Los compuestos candidato o los compuestos terapéuticos candidatos identificados mediante los métodos de tamizado de la presente invención pueden administrarse en conjunción con compuestos que prolongan o aumentan la activación del CRF₂R o de una ruta de transducción de señal del CRF₂R. Estos pueden ser compuestos conocidos, por ejemplo, teofilina o estos compuestos pueden identificarse mediante los métodos de tamizado de esta invención para prolongar o aumentar la activación de un receptor del CRF₂R o de una ruta de transducción de señal del CRF₂R.

Determinaciones de la dosis

30 La seguridad y eficacia terapéutica de los compuestos que son agonistas del CRFR, pueden determinarse por medio de los procedimientos estándar utilizando tecnologías ya sea *in vitro* o *in vivo*. Se prefieren los compuestos que muestran grandes índices terapéuticos, aunque los compuestos con menores índices terapéuticos son útiles si el nivel de los efectos secundarios es aceptable. Los datos

obtenidos a partir de las técnicas toxicológicas y farmacológicas *in vitro* e *in vivo* pueden ser utilizados para formular el intervalo humano de dosis que pueden ser útiles. La dosis preferida está en el intervalo en el que la concentración circulante del compuesto es terapéuticamente la máxima con una seguridad aceptable. La concentración circulante del compuesto puede variar dependiendo de la forma de la dosis, el tiempo posterior a la dosificación, la vía de administración, etcétera. Las dosis que están fuera de este intervalo también son útiles siempre que los efectos laterales sean aceptables. Aspectos tales como la edad y el peso del paciente y lo similar, pueden ser utilizados para determinar estos aspectos de la manera convencional. Las aproximaciones farmacogenéticas pueden ser útiles para optimizar la selección del compuesto, las dosis y el régimen de dosificación en poblaciones clínicas.

10 *Formulación y uso*

Las composiciones farmacéuticas de uso en la modulación de la atrofia musculoesquelética, de conformidad con la presente invención, pueden formularse utilizando metodologías convencionales que usan portadores y excipientes farmacéuticamente aceptables. Las composiciones de esta invención se suministran preferentemente en forma de dosificación unitaria. Conforme se utiliza en la presente, una

"forma de dosificación unitaria" es una composición de esta invención que contiene una cantidad de un agonista de CRF₂R que es adecuada para administrarla a un animal, de preferencia a un animal mamífero, con mayor preferencia a un ser humano, en una sola dosis, de conformidad con las buenas prácticas médicas. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para el suministro por medio de, por ejemplo, administración intranasal, transdérmica, por inhalación, parenteral, cutánea, oral o rectal.

Para la administración oral, la composición farmacéutica puede adoptar la forma de tabletas o cápsulas que contienen al compuesto farmacológicamente activo y aditivos entre los que se incluyen, en forma enunciativa, agentes aglutinantes, cargas, lubricantes, agentes de desintegración o agentes humectantes. Las tabletas pueden estar recubiertas. Las preparaciones líquidas para la administración oral, incluyen, en forma enunciativa, jarabes, suspensiones o productos secos que se reconstituyen con un vehículo líquido antes del uso, que contienen al compuesto farmacológicamente activo y los aditivos incluyen, en forma enunciativa, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, vehículos no acuosos, conservadores, sales amortiguadoras, saborizantes, colorantes, agentes edulcorantes, etc. Las composiciones farmacéuticas para la administración oral pueden formularse para la liberación controlada de los compuestos farmacológicamente activos, ya sea en la boca, el estómago o en el tracto intestinal.

Para la administración por inhalación, los compuestos para utilizarse de conformidad con la presente invención pueden ser suministrados, en forma enunciativa, por medio de las siguientes formas: líquida, en polvo, en gel o en forma de un rocío en aerosol que utiliza propelentes ya sea presurizados o

no presurizados en dosificaciones ya sea previamente medidas o dosis que no están previamente medidas. El compuesto farmacológicamente activo puede formularse con cargas, vehículos, conservadores, amortiguadores, etc. que sean adecuados. Para la administración parenteral, el compuesto farmacológicamente activo puede formularse con vehículos, conservadores, etcétera, que sean fisiológicamente aceptables y puede prepararse en forma de suspensiones, soluciones, emulsiones, polvos listos para su reconstitución, etcétera, ya sea para la inyección de bolo o por infusión. Las dosis de estos compuestos pueden administrarse mediante una variedad de tecnologías que incluyen las jeringas hipodérmicas, los dispositivos de alta presión, etc. Para la administración rectal, el compuesto farmacológicamente activo puede formularse con portadores, conservadores, etcétera, fisiológicamente aceptables, para suministrarlo como supositorios, enemas, etc. Para la administración cutánea, el compuesto farmacológicamente activo puede formularse con portadores fisiológicamente aceptables que incluyen lociones, emolientes, etc., o incorporarse en un dispositivo de tipo parche. Para la administración de largo plazo, el compuesto farmacológicamente activo y los aditivos adecuados, como por ejemplo, en forma irrestricta, polímeros, materiales hidrofóbicos, resinas, etc., puede formularse como una preparación de depósito, ya sea para la inyección o la implantación en múltiples sitios, que incluyen, en forma enunciativa, lugares intramusculares y subcutáneos. Además, el compuesto farmacológicamente activo puede administrarse mediante un dispositivo despachador.

Monitoreo de los efectos durante las pruebas clínicas

El monitoreo de la influencia de los compuestos (por ejemplo, fármacos) sobre la expresión o actividad del CRF₂R pueden utilizarse no solamente en el tamizado básico del fármaco, sino también en pruebas clínicas. Por ejemplo, la efectividad de un compuesto, determinada por medio de un ensayo de tamizado, para aumentar la actividad del receptor de CRF₂R o la expresión del receptor de CRF₂R puede evaluarse en pruebas clínicas en pacientes que tienen atrofia musculoesquelética o que están en riesgo de padecerla. En diversos momentos después de la administración del compuesto de prueba o del placebo, puede determinarse el efecto del compuesto en el paciente, por ejemplo, al observar el cambio en la masa musculoesquelética, en la función musculoesquelética, los marcadores bioquímicos de la descomposición muscular o las medidas de la calidad de vida. En el campo se conocen los métodos para medir la masa musculoesquelética en seres humanos e incluyen, por ejemplo: medición de la circunferencia de una extremidad; medición del grosor del músculo, por ejemplo, por medio de tomografía computarizada, MRI o ultrasonido; o la biopsia del músculo para examinar los parámetros morfológicos y bioquímicos (por ejemplo, el área de la fibra en sección transversal, el diámetro de la fibra o las actividades enzimáticas). Además, debido a que la masa musculoesquelética se correlaciona

con la función musculoesquelética, la función muscular puede ser utilizada como un marcador subrogado de la masa y los cambios en la masa muscular pueden evaluarse utilizando mediciones funcionales, por ejemplo, la fortaleza, la fuerza de un grupo de músculos sinérgicos o las características de contracción que se encuentran en los registros electromiográficos. Además, la pérdida de proteína muscular como resultado de la atrofia muscular puede medirse mediante la cuantificación de los niveles de aminoácidos o de los derivados de aminoácidos, es decir, la 3-metil histidina, en la sangre o en la orina de una persona. Para una revisión de estos métodos ver Appell, *Sports Med.* 10:42-58 (1990). Las mediciones de la calidad de vida incluyen, en forma enunciativa, la facilidad para levantarse de una silla, el número de pasos que se dan antes de cansarse o la capacidad para subir escaleras.

10

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Construcción de vectores para la expresión del receptor de CRF_{2R} humano.

La secuencia de ADN del CRF_{2R} (hCRF_{2R}) humano, núm. de acceso E12752, se recuperó y se sintetizaron dos oligonucleótidos que incluyen a uno que contiene el extremo 5' del gen que comienza en el codón de iniciación (oligonucleótido 5') y uno que contiene al extremo 3' del gen que contiene al codón de terminación (oligonucleótido 3'). Estos oligonucleótidos se diseñaron de modo que contengan sitios de endonucleasa de restricción que no están presentes en el gen hCRF_{2R} con un sitio único en el oligonucleótido 5' y un sitio de endonucleasa de restricción único y diferente en el oligonucleótido 3'. Además, el oligonucleótido 3' contiene una secuencia de señal de adición por poliadenilación. El ADN de doble cadena del músculo esquelético humano se adquiere de la colección ADNc de Universal QUICK-Clone (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA). Por medio del uso de los anteriores oligonucleótidos 5' y 3', se amplifica al ADNc hCRF_{2R} mediante la PCR del ADNc del músculo esquelético humano, utilizando el kit para PCR AdvanTaq PCR (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA). El producto de la PCR del gen hCRF_{2R} se purifica a partir de artefactos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa y el fragmento de ADN del gen de hCRF_{2R} se purificó a partir de gel de agarosa, utilizando un producto de purificación tal como por ejemplo, NucleoTrap (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA).

La clonación del producto de la PCR hCRF_{2R} en el vector pIRESneo (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA) se logra cortando primero el producto de la PCR hCRF_{2R} y al vector pIRESneo con las endonucleasas de restricción adecuadas, de modo que los sitios de la endonucleasa de restricción 5' y 3' estén listos para la ligación. El ADN del vector pIRESneo se liga al ADN del producto de la PCR, hCRF_{2R}, utilizando ADN ligasa, del kit de clonación AdvantAge™ PCR Cloning Kit (Clontech Inc.,

63

Palo Alto, CA, USA), de conformidad con las recomendaciones del fabricante. El vector ligado y el constructo de inserto (pIRESneo/ hCRF₂R) se utilizan entonces para transformar células de E. coli TOP10F' competentes (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA). Las células transformadas se cultivan en placa sobre LB/X-gal/IPTG más agar que contiene ampicilina. Las colonias blancas (clones positivos) se seleccionan y se cultivan individualmente en el medio LB. El ADN del plásmido se aísla utilizando el sistema de purificación de ADN NucleoBond (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA). El inserto de al menos un clon se somete a secuenciación para asegurar que es correcta la secuencia del hCRF₂R. Las células HEK293 que contienen un plásmido Mercury CRE-LUC integrado en forma estable (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA) se transfectan con pIRESneo/ADN hCRF₂R purificado, que tiene al inserto de secuencia correcto, utilizando el kit para transfección en mamíferos CalPhos™ (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA). Las células transfectadas en forma estable con pIRESneo/ADN hCRF₂R se seleccionan por medio del cultivo de las células en G418. Las células transfectadas en forma estable (células HEK293/CRE-LUC/pIRESneo/ hCRF₂R) se propagan en DMEM (Life Technologies, Rockville, MD) que contiene suero de bovino fetal al 10% (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA), solución de penicilina/estreptomicina (Life Technologies, Rockville, MD), L-glutamina (Life Technologies, Rockville, MD), y un aminoácido no esencial (Life Technologies, Rockville, MD) a 37°C en una atmósfera de 5% de bióxido de carbono/95% de aire. Los clones se caracterizan tanto para la unión al CRF como a la activación del CRE-LUC después de la exposición al CRF, conforme se describe en el Ejemplo 2 y en el Ejemplo 3. Las células que expresan al receptor de hCRF₂R en un nivel adecuado y que están acopladas en forma adecuada en el sistema reportero CRE-LUC, se utilizan entonces para el análisis adicional.

Ejemplo 2. Ensayos de unión con el receptor

El análisis de unión con el receptor de los compuestos se realiza en células completas mediante el cultivo en placa de las células HEK293/CRE-LUC/pIRESneo/ hCRF₂R del Ejemplo 1 en una placa de 96 cavidades recubierta con polilisina. Las células se siembran en el medio DMEM que contiene suero de bovino fetal al 10%, solución de penicilina/estreptomicina, L-glutamina y un aminoácido no esencial a 37°C en una atmósfera de 5% de bióxido de carbono/95% de aire y se incubaron durante toda la noche. El medio de cultivo se retiró y se añadió la cantidad adecuada del CRF etiquetado en forma covalente con Europio (Eu-CRF) en MEM (Life Technologies, Rockville, MD) + Seablock al 10% (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA). Las células se incubaron con el Eu-CRF durante 90 minutos a temperatura ambiente, después, se lavaron 4 veces con solución salina amortiguada con fosfato carente de calcio y magnesio (Life Technologies, Rockville, MD). Después del lavado final, se añadió la solución

intensificadora (Wallac Inc., Gaithersburg, MD) y la placa se leyó en un lector de placa Wallac (Wallac Inc., Gaithersburg, MD) utilizando el programa BioWorks Europium. Para el análisis de unión por saturación, a las células se añadieron las dosis de bitácora de Eu-CRF en el intervalo de 10(-12) a 10(-3) M y se analizó la unión tanto en ausencia como con la presencia de una concentración de saturación de CRF sin etiquetar para la evaluación de la unión no específica. Para la unión competitiva, se añadió una concentración de Eu-CRF que es la mitad de la máxima, en términos de unión, además de concentraciones variables del compuesto de interés.

Ejemplo 3. Ensayo de activación del receptor

El análisis de activación del receptor se realizó sembrando las células HEK293/CRE-LUC/pIRESneo/hCRF₂R del Ejemplo 1, en una Packard View Plate-96 (Packard Inc., CA). Las células se sembraron en el medio DMEM que contenía suero de bovino fetal al 10%, solución de penicilina/estreptomicina, L-glutamina y aminoácido no esencial a 37°C en una atmósfera de 5% de bióxido de carbono/95% de aire y se incubaron durante toda la noche. El medio se retiró entonces y fue reemplazado con DMEM (Life Technologies, Rockville, MD) que contenía la fracción V de albúmina de bovino al 0,01% (SIGMA, St. Louis, MO) que contenía al compuesto de interés. Las células se incubaron entonces durante cuatro horas a 37°C en una atmósfera de 5% de bióxido de carbono/95% de aire, después de lo cual, se retiró el medio y las células se lavaron dos veces con solución salina balanceada de Hanks (Life Technologies, Rockville, MD). A continuación, a las células lavadas se añadió el reactivo para la lisis (Promega Inc., Madison, WI) y las células se incubaron durante 20 minutos a 37°C en una atmósfera de 5% de bióxido de carbono/95% de aire. Las células se colocaron entonces a -80°C durante 20 minutos, seguidos por una incubación de 20 minutos a 37°C en una atmósfera de 5% de bióxido de carbono/95% de aire. Después de esta incubación, a los lisados celulares se añadió el amortiguador para el ensayo de luciferasa y el sustrato para el ensayo de luciferasa (Promega Inc., Madison, WI) y se cuantificó la actividad de la luciferasa utilizando un luminómetro. La actividad relativa de un compuesto se evaluó comparando el aumento después de la exposición ante el compuesto en el nivel de la luciferasa en células HEK que contenían al constructo CRE-LUC sin el hCRF₂R después de la exposición al compuesto. También se verificó la especificidad de la respuesta mediante la evaluación de la respuesta de la luciferasa de las células hCRF₂R /CRE-LUC HEK ante el compuesto, en presencia y en ausencia de un exceso de 10 veces el antagonista del hCRF₂R.

Ejemplo 4. Tamizado para identificar a los compuestos candidato que prolonguen o aumenten la activación del CRF₂R y de la ruta de transducción de la señal del receptor de CRF₂R.

La identificación de compuestos que prolongan o aumentan la activación inducida por agonista del CRF₂R o de una ruta de transducción de la señal del CRF₂R, involucra una variación en el ensayo de activación del receptor descrito en el Ejemplo 3. Específicamente, este ensayo se realiza sembrando las células receptoras HEK293/ CRE-LUC/pIRESneo/hCRF₂R en una Packard View Plate-96 (Packard Inc., CA). Las células se sembraron en el medio DMEM, que contenía suero de bovino fetal al 10%, solución de penicilina/estreptomicina, L-glutamina, aminoácido no esencial y cantidades de saturación del CRF a 37°C en una atmósfera de 5% de bióxido de carbono/95% de aire y se incubaron durante 48 horas. El medio se retiró entonces y fue reemplazado con DMEM (Life Technologies, Rockville, MD) que contenía la fracción V de albúmina de bovino al 0,01% (SIGMA, St. Louis, MO) y CRF además del compuesto de interés. Las células se incubaron a continuación durante cuatro horas a 37°C en una atmósfera de 5% de bióxido de carbono/95% de aire, después de lo cual se retiró el medio y las células se lavaron dos veces con solución salina balanceada de Hanks (Life Technologies, Rockville, MD). A las células lavadas se añadió entonces el reactivo para la lisis (Promega Inc., Madison, WI) y las células se incubaron durante 20 minutos a 37°C en una atmósfera de 5% bióxido de carbono/95% de aire. Las células se colocaron entonces a -80°C durante 20 minutos seguidos por una incubación de 20 minutos a 37°C en una atmósfera de 5% de bióxido de carbono/95% de aire. Después de esta incubación, a los lisados celulares se añadió el amortiguador para el ensayo de luciferasa y el sustrato para el ensayo de luciferasa (Promega Inc., Madison, WI) y la actividad de la luciferasa se cuantificó utilizando un luminómetro. Los compuestos de prueba que estimulan la fluorescencia en forma significativa por encima de los niveles de las células de control no tratadas, después de la corrección por variaciones en la densidad celular, fueron considerados como compuestos candidato para regular la masa o función musculoesquelética. Los compuestos de más interés son aquéllos que inducen niveles de fluorescencia relativamente elevados.

Ejemplo 5. Tamizado para identificar compuestos candidato específicos para el CRF₂R.

Los compuestos que activan al CRF₂R se identificaron como en el Ejemplo 3. Para seleccionar los compuestos activos que muestran la selectividad del CRF₂R con respecto al CRF₁R, estos compuestos también se tamizaron contra el CRF₁R. Las células HEK293/CRE-LUC/pIRESneo/hCRF₁R se generaron esencialmente según se describió en el Ejemplo 1, con la excepción de que se utilizó la secuencia de ADN de CRF₁R (hCRF₁R) humano, número de acceso X72304, para la amplificación

66

inicial por PCR. Para determinar qué tan activos son los compuestos contra el CRF₁R, se realizó un ensayo de activación, esencialmente según se describió en el Ejemplo 3, con la excepción de que se utilizaron células HEK293/CRE-LUC/pIRESneo/hCRF₁R para sembrar las placas. La cantidad de fluorescencia estimulada por el compuesto en las células que expresan CRF₂R se comparó con la cantidad de fluorescencia estimulada por el compuesto en las células que expresan CRF₁R. Los compuestos que demuestran una mejor respuesta de 10 veces (sobre la base molar) en las células que expresan CRF₂R que en las células que expresan CRF₁R fueron verificadas entonces en forma adicional para la especificidad de respuesta con el fin de eliminar las diferencias debidas a la variación clonal. Las células HEK293/CRE-LUC/pIRESneo/hCRF₂R se ensayaron con el compuesto en presencia o en ausencia de un exceso de 10 veces el antagonista del CRF₂R, la antisauvagina-30. Los compuestos que muestran una selectividad mayor de 10 veces para el CRF₂R y cuya actividad se inhibe por la antisauvagina-30, se seleccionaron como compuestos candidato.

Ejemplo 6. Tamizados para identificar compuestos candidato que aumentan la expresión de hCRF₂R

La secuencia que contiene la región promotora del gen hCRF₂R, que comienza muy lejos corriente arriba, es decir, en dirección 5', del sitio de iniciación de la transcripción para contener todos los elementos reguladores necesarios para la expresión fisiológica del gen hCRF₂R en el tejido adecuado, se recupera de la base de datos del genoma humano. Se sintetizaron dos oligonucleótidos, uno que contenía al extremo 5' de la región promotora (oligonucleótido 5') y uno que contenía al extremo 3' de la región promotora, que incluye al sitio de inicio de la transcripción (oligonucleótido 3'). Estos oligonucleótidos también contienen sitios de la endonucleasa de restricción que no están presentes en la región reguladora del gen hCRF₂R con un sitio único en el oligonucleótido 5' y un sitio único y diferente de la endonucleasa de restricción en el oligonucleótido 3'. Los oligonucleótidos 5' y 3' se utilizaron para la amplificación por PCR de la región reguladora del gen hCRF₂R a partir del ADN humano (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA), utilizando el kit para PCR, Advantage® Genomic PCR kit (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA). El producto de la PCR, región reguladora del gen hCRF₂R se purificó a partir de artefactos de la PCR mediante electroforesis en gel de agarosa y el fragmento de ADN de la región reguladora del gen hCRF₂R se purificó a partir del gel de agarosa, utilizando un producto de purificación, como por ejemplo, el NucleoTrap (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA). La clonación del producto de la PCR, región reguladora del gen hCRF₂R, en el vector pECFP-1 (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA) se logró cortando primero el producto de la PCR, región reguladora del gen hCRF₂R, y el vector pECFP-1 con las endonucleasas de restricción adecuadas, de modo que los sitios de la endonucleasa de restricción 5' y 3' estén listos para la ligación. La ligación del ADN del vector pECFP-1

al ADN del producto de la PCR, región reguladora del gen hCRF₂R, se logra utilizando ADN ligasa del kit de clonación AdvantAge™ PCR Cloning Kit (Clonotech Inc., Palo Alto, CA, USA), de conformidad con las recomendaciones del fabricante. El vector ligado y el constructo del inserto se utilizaron entonces para transformar células de *E. coli* TOP10F' competentes (Clonotech Inc., Palo Alto, CA, USA). Las

5 células se cultivaron en placas en LB más agar que contenía kanamicina y para el análisis adicional, se seleccionaron las colonias resistentes a la kanamicina. Los clones resistentes a la kanamicina se cultivaron en el medio LB que contenía kanamicina y el ADN del plásmido se aisló utilizando el sistema de purificación de ADN NucleoBond (Clonotech Inc., Palo Alto, CA, USA) y el constructo que contenía a la región reguladora del gen hVPAC₂ se analizó mediante la secuenciación del ADN para asegurar la

10 corrección e integridad del constructo. A continuación, el ADN del plásmido constructo purificado que contenía a la región reguladora del gen hCRF₂R se transfectó en células HEK293 utilizando la transfección mediada por fosfato de calcio, utilizando el kit de transfección para mamífero CalPhos™ (Clonotech Inc., Palo Alto, CA, USA). Los clones de la célula transfectada se seleccionaron utilizando G418, se aislaron y propagaron en DMEM (Life Technologies, Rockville, MD) que contenía suero de

bovino fetal al 10% (Clonotech Inc., Palo Alto, CA, USA), solución de penicilina/estreptomicina (Life Technologies, Rockville, MD), L-glutamina (Life Technologies, Rockville, MD), aminoácido no esencial (Life Technologies, Rockville, MD) y G418 (Life Technologies, Rockville, MD) a 37°C en una atmósfera de 5% de bióxido de carbono/95% de aire. Los clones resistentes al G418 se caracterizaron mediante la transferencia Southern para asegurar que contienen a la secuencia promotora del gen

20 hCRF₂R; además de la activación de la región reguladora del gen hCRF₂R, se analizaron utilizando un agente estimulador adecuado. Las células que expresan a ECFP-región reguladora del gen hCRF₂R en un nivel apropiado, se utilizan entonces en los ensayos diseñados para evaluar a los compuestos que pueden modular la actividad de la región reguladora del gen hCRF₂R de la siguiente manera. El análisis de la activación de la región reguladora se realizó sembrando la ECFP-región reguladora del gen hCRF₂R que

25 contenía células HEK293 a la densidad adecuada en placas de microtitulación de 96 cavidades negras con fondo transparente y se les dejó desarrollarse durante toda la noche. Al día siguiente se retiró el medio y se añadió el compuesto de prueba en un medio de crecimiento recién preparado. Las células se incubaron durante 16 horas a 37°C en una atmósfera de 5% de bióxido de carbono/95% de aire, seguida por la medición de la fluorescencia (excitación a 433 (453) nm mediante la detección de la emisión a

30 475(501) nm, utilizando un fluorómetro (biolumin™ 960, Molecular Dynamics/Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Los compuestos de prueba que estimularon la fluorescencia en forma significativa por encima de los niveles de las células de control no tratadas, después de la corrección por variaciones en la densidad celular, se consideraron compuestos candidato para regular la masa o función

musculoesquelética. Los compuestos de más interés son aquéllos que inducen niveles de fluorescencia relativamente elevados.

Ejemplo 7. Tamizados para identificar compuestos que aumentan la expresión del CRF humano

Los métodos para identificar compuestos que aumentan la expresión del CRF (hCRF) humano son esencialmente idénticos a los métodos para identificar compuestos que aumentan la expresión del receptor de hVPAC₂, con excepción de que la región reguladora utilizada es la del gen hCRF. La secuencia que contiene a la región reguladora del gen hCRF, que comienza muy lejos corriente arriba, es decir, en dirección 5', del sitio de iniciación de la transcripción para contener a todos los elementos reguladores necesarios para la expresión fisiológica del gen hCRF en el tejido adecuado, se recuperó de la base de datos del genoma humano. Se sintetizaron dos oligonucleótidos, uno que contenía al extremo 5' de la región reguladora (oligonucleótido 5') y uno que contenía al extremo 3' de la región reguladora que incluía al sitio de inicio de la transcripción (oligonucleótido 3'). Estos oligonucleótidos también contienen sitios de la endonucleasa de restricción que no están presentes en la región reguladora del gen hCRF con un sitio único en el oligonucleótido 5' y un sitio único y diferente de la endonucleasa de restricción en el oligonucleótido 3'. Los oligonucleótidos 5' y 3' se utilizan para la amplificación por PCR de la región reguladora del gen hCRF de ADN humano (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA) utilizando el kit para PCR Advantage® Genomic PCR kit (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA). El producto de la PCR, región reguladora del gen hCRF, se purifica a partir de artefactos para PCR, mediante electroforesis en gel de agarosa y el fragmento de ADN de la región reguladora del gen hCRF se purifica a partir del gel de agarosa, utilizando el producto de purificación NucleoTrap (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA). La clonación del producto de la PCR, región reguladora del gen hCRF en el vector pECFP-1 (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA) se logra cortando primero el producto de la PCR, región reguladora del gen hCRF y al vector pECFP-1 con las endonucleasas de restricción adecuadas, de modo que los sitios de la endonucleasa de restricción 5' y 3' estén listos para la ligación. La ligación del ADN del vector pECFP-1 al ADN del producto de la PCR, región reguladora del gen hCRF, se logra utilizando ADN ligasa del kit para clonación Advantage™ PCR Cloning Kit (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA), de conformidad con las recomendaciones del fabricante. El vector ligado y el constructo del inserto se utilizan entonces para transformar células de E. coli TOP10F' competentes (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA). Las células se cultivaron en placas en LB más agar que contenía kanamicina y para su análisis adicional se seleccionaron las colonias resistentes a la kanamicina. Los clones resistentes a la kanamicina se cultivaron en un medio de LB que contenía kanamicina y el ADN del plásmido se aisló utilizando el sistema de purificación de ADN NucleoBond DNA Purification System (Clontech Inc.,

Palo Alto, CA, USA) y se analizó el constructo que contenía a la región reguladora del gen hCRF mediante la secuenciación del ADN para asegurar la corrección e integridad del constructo. El ADN del plásmido constructo purificado que contenía a la región reguladora del gen hCRF se transfectó entonces en las células HEK293, utilizando la transfección mediada por fosfato de calcio, utilizando el kit para transfección de mamífero CalPhos™ Mammalian Transfection Kit (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA). Los clones de la célula transfectada se seleccionaron utilizando G418, se aislaron y propagaron en DMEM (Life Technologies, Rockville, MD) que contenía suero de bovino fetal al 10% (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA), solución de penicilina/estreptomicina (Life Technologies, Rockville, MD), L-glutamina (Life Technologies, Rockville, MD), aminoácido no esencial (Life Technologies, Rockville, MD) y G418 (Life Technologies, Rockville, MD) a 37°C en una atmósfera de 5% de bióxido de carbono/95% de aire. Los clones resistentes al G418 se caracterizaron mediante transferencia Southern para asegurar que contienen la secuencia de la región reguladora del gen hCRF; además, se analizó la activación de la región reguladora del gen hCRF utilizando un agente estimulante adecuado. Las células que expresan al ECFP-región reguladora del hCRF con un nivel adecuado, se utilizaron entonces en ensayos diseñados para evaluar a los compuestos que puedan modular la actividad de la región reguladora del gen hCRF de la siguiente manera. El análisis de la activación de la región reguladora se realizó al igual que en el Ejemplo 5, con la excepción de que se usaron los clones que contenían el constructo de la región reguladora del gen hCRF.

Ejemplo 8. Método para preparar anticuerpos humanos que activen al hCRF₂R.

Los anticuerpos monoclonales totalmente humanos que activan al hCRF₂R se produjeron generando primero a la proteína hCRF₂R recombinante, de la siguiente manera. Para obtener el producto de la PCR hCRF₂R siguió el procedimiento del Ejemplo 1. Este producto de la PCR, hCRF₂R, se clonó entonces en el vector pHAT20 (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA) cortando primero al producto de la PCR, gen hCRF₂R, y al vector pHAT20 con las endonucleasas de restricción adecuadas, de modo que los sitios de la endonucleasa de restricción 5' y 3' estén listos para la ligación. La ligación del ADN del vector pHAT20 al ADN del producto de la PCR, gen hCRF₂R, se logró utilizando ADN ligasa del kit para clonación AdvantAge™PCR Cloning Kit (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA), de conformidad con las recomendaciones del fabricante. Después, se utilizó el vector ligado/constructo del inserto para transformar células de E. coli TOP10F' competentes (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA). Las células transformadas se cultivaron en placa en LB más agar que contenía ampicilina y para el análisis adicional se seleccionaron las colonias resistentes a la ampicilina. Los clones positivos se cultivaron en el medio LB que contenía ampicilina y se aisló el ADN de plásmido, utilizando el sistema de purificación de ADN

NucleoBond DNA Purification System (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA) y el constructo que contenía al gen hCRF₂R se analizó mediante la secuenciación del ADN para asegurar la corrección e integridad del constructo. Después se usó el ADN del vector hCRF₂R -pHAT20 para la clonación adicional por PCR, utilizando un oligonucleótido 5' que contiene el comienzo de la secuencia HAT y un sitio único de endonucleasa de restricción no presente en el constructo hCRF₂R -pHAT20 y el oligonucleótido hCRF₂R 3' anteriormente utilizado. Los cebadores de oligonucleótido se utilizaron para amplificar por PCR al gen de fusión HAT- hCRF₂R del constructo hCRF₂R -pHAT20 y el producto de la PCR se purificó conforme se describió anteriormente. El producto de la PCR, el gen de fusión HAT- hCRF₂R se utilizó entonces para la clonación en el vector pBacPAK8 utilizando el sistema de expresión de baculovirus BacPAK de Clontech (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA). La ligación del gen de fusión HAT- hCRF₂R en el vector pBacPAK8 es esencialmente según se describió en lo anterior. A continuación, el constructo hCRF₂R /HAT-pBacPAK8 se transfectó en células de E. coli TOP10⁺ competentes, se seleccionaron las células resistentes a la ampicilina y el ADN del plásmido se aisló y se verificó en cuanto a la integridad del constructo, según se describió anteriormente. Este constructo se transfectó entonces conjuntamente con el ADN BacPAK6 linealizado en células hospederas del insecto Sf21, utilizando el kit de transfección para mamífero CalPhos[™] (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA). Las células del insecto se incubaron entonces durante 2-3 días y a continuación se cosechó el virus de las placas transparentes individuales. El virus se amplificó entonces en células Sf21, el virus recolectado se tituló y el virus titulado se utilizó para la infección a gran escala de las células Sf21 utilizando el medio de célula de insecto BacPAK - todo de conformidad con las recomendaciones de los fabricantes (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA). La proteína de fusión HAT-CRF₂R recombinante se purificó entonces utilizando el kit de purificación TALON[®] de Clontech (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA) utilizando las condiciones recomendadas por el fabricante. Brevemente, las células Sf21 infectadas se cosecharon 48 horas después de la infección y se sometieron a sonicación en amortiguador de extracción/carga. El lisado celular se hizo pasar entonces a través de una columna TALON[®] CellThru. La columna se lavó dos veces con el amortiguador de extracción/carga y la proteína HAT- hCRF₂R unida se eluyó con amortiguador de elución. La proteína eluida se analizó por medio de SDS-PAGE en cuanto a la integridad y se cuantificó la concentración de la proteína utilizando el sistema SDS-PAGE Bio-Rad y los sistemas para la cuantificación de proteína, de conformidad con las recomendaciones del fabricante (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Ca). La proteína de fusión HAT- hCRF₂R purificada se utilizó entonces para inmunizar animales XenoMouse (Abgenix Inc., Fremont, CA) para la producción del anticuerpo monoclonal humano, de la siguiente manera. Se utilizaron 10 µg de la proteína de fusión HAT- hCRF₂R recombinante purificada, combinados con 25 µg del lípido A de monofosforilo

adyuvante (Sigma, St. Louis, MO) para vacunar 10 animales XenoMouse múltiples veces durante un período de ocho semanas. Se obtuvo suero de los animales vacunados y se utilizó en ELISA de captura de antígeno, utilizando a la proteína de fusión HAT- hCRF₂R purificada para detectar los anticuerpos de la proteína HAT- hCRF₂R mediante el recubrimiento de placas ELISA de poliestireno (Corning Glass Works, Corning, NY) con la proteína de fusión HAT- hCRF₂R, bloqueada con PBS-BSA al 1%, se lavó y se incubó a 37°C durante 1 hora a una dilución de 1:50 de las muestras de suero. Después de lavar 5 veces con PBS, las placas se incubaron a 37°C durante 1 hora con anticuerpos de cabra conjugados-fosfatasa alcalina en inmunoglobulina humana G. Las placas se lavan entonces 5X con PBS y los anticuerpos fueron detectados con substrato fosfato de p-nitrofenilo (Sigma, St. Louis, MO) en amortiguador. Se midieron las densidades ópticas a 405 nm utilizando un lector de placa y se cuantificó la señal. Los ratones que demostraron una elevada producción de anticuerpos se utilizaron para la formación de hibridoma. Los hibridomas se generaron mediante la fusión de células del bazo de los animales XenoMouse con la línea celular de mieloma no secretora NSA-bcl 2 utilizando una proporción de 4:1 de células de bazo a células NSA-bcl2 en presencia del polietilenglicol PEG1450 al 30%. Las células fusionadas se clonan individualmente limitando la dilución en placas de 96 cavidades y se cultivaron en medio RPMI-1640 que contenía suero de bovino fetal al 10%, aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio, L-glutamina, 100 u/ml de penicilina-estreptomycinina e hipoxantina-aminopterina-timidina (todos ellos de Life Technologies, Rockville, MD). Los sobrenadantes de los hibridomas seleccionados de la hipoxantina-aminopterina-timidina se tamizaron en cuanto a la producción del anticuerpo humano mediante el ensayo ELISA, conforme se describió anteriormente. Los hibridomas que produjeron anticuerpos humanos en la proteína de fusión HAT- hCRF₂R se seleccionaron para la producción de anticuerpos a gran escala. Los anticuerpos monoclonales se purificaron mediante cromatografía con Sefarosa-proteína G. Brevemente, el sobrenadante de los clones de hibridoma cultivados se cargaron en una columna de Sefarosa-proteína G (SIGMA, St. Louis, MO) en un amortiguador de carga, se lavaron 3 veces y la IgG se eluyó con el amortiguador de elución. Estos anticuerpos se utilizaron entonces para el tamizado con el fin de evaluar el potencial de activación (agonismo) del hCRF₂R. Esto se logró utilizando la metodología que se describió en el Ejemplo 3. Estos anticuerpos monoclonales humanos que demostraron actividad agonista hacia el hCRF₂R se designaron como compuestos candidato.

30 Ejemplo 9. Determinación de la medición de fuerza absoluta de un músculo.

De la pierna enyesada del ratón se retiraron los músculos extensor largo del dedo (EDL) y sóleo, de tendón a tendón. Se amarró una sutura de seda a cada tendón de los músculos aislados y los músculos

se colocaron en una cámara de plexiglass llena con solución de Ringer (cloruro de sodio 137 mM, bicarbonato de sodio 24 mM, glucosa 11 mM, cloruro de potasio 5 mM, sulfato de magnesio 1 mM, fosfato de sodio 1 mM, tubocurarina 0,025 mM, todos a un pH de 7,4 y oxigenados con 95% de oxígeno/5% de bióxido de carbono) burbujeada constantemente 95% de oxígeno/5% de bióxido de carbono y mantenida a 25 °C. Los músculos se alinearon horizontalmente entre el brazo de palanca de un servomotor (Modelo 305B-LR Cambridge Technology Inc., Watertown MA, USA) y el gancho de acero inoxidable de un transductor de fuerza (Modelo BG-50; Kulite Semiconductor Products Inc., Leonia, NJ, USA) y se estimuló en el campo mediante pulsos transmitidos entre dos electrodos de platino colocados longitudinalmente a cada lado del músculo. Los pulsos de onda cuadrada (de 0,2 ms de duración) generados por una computadora personal con una tarjeta Labview (Modelo PCI-MIO 16E-4), Labview Inc., Austin, TX, USA) se amplificaron (amplificador de potencia Acurus modelo A25, Dobbs Ferry, NY, USA) para aumentar la contracción titánica. El voltaje de estimulación y la longitud del músculo (L_0) se ajustaron para obtener la máxima fuerza de contracción isométrica. La producción de la máxima fuerza titánica (P_0) se determinó a partir de la meseta de la relación frecuencia-fuerza.

15 Ejemplo 10. Tratamiento terapéutico de la atrofia musculoesquelética utilizando un anticuerpo humano que es un agonista del receptor hCRF_{2R}.

Una persona del sexo masculino con un peso de 50 kg y que tenía una importante atrofia muscular en brazos y piernas, debido al reposo prolongado en la cama, fue tratada para revertir la atrofia musculoesquelética. A la persona se le administraron, a través de inyección intravenosa, una vez a la semana y durante un período de 3 meses, 15 ml de una solución acuosa de pH 6 que comprendía un anticuerpo activador del receptor CRF_{2R}. La solución comprendía lo siguiente:

<u>Concentración</u>	<u>del componente (mg/ml)</u>
Anticuerpo del antagonista del receptor CRF _{2R}	20
L-histidina HCl	0,47
L-histidina	0,3
α , α -trehalosa dihidratada	20
Polisorbato 20	0,1
Agua esterilizada bacteriostática	c.b.p para un 1 mL

Al final del período de tratamiento, la persona mostró aumentos mensurables en la masa muscular, la fortaleza y movilidad de brazos y piernas.

Ejemplo 11. Tratamiento profiláctico de la atrofia musculoesquelética, utilizando un anticuerpo humano que es un agonista del receptor hCRF₂R.

Una persona del sexo femenino con peso de 55 kg fue programada para la cirugía de reemplazo de la articulación de la cadera en un mes. La persona fue tratada para aumentar la masa musculoesquelética antes y después de la cirugía para reducir finalmente el nivel de la atrofia musculoesquelética debido a la falta de uso del músculo durante el período de recuperación postoperatorio. Específicamente, a la persona se le suministró, a través de inyección intravenosa, una vez a la semana, durante un período de 1 mes previo a la cirugía y durante 2 meses posteriores a la cirugía, 18 ml de una solución acuosa de pH 6,0 que comprendía un anticuerpo activador del receptor CRF₂R. La solución comprendía lo siguiente:

<u>Componente</u>	<u>Concentración (mg/ml)</u>
Anticuerpo activador del CRF ₂ R	20
L-histidina HCl	0,47
L-histidina	0,3
α, α-trehalosa dihidratada	20
Polisorbato 20	0,1
Agua esterilizada bacteriostática	c.b.p para 1 mL

Al final del período de tratamiento, la persona mostró una conservación mensurable de la masa muscular, la fortaleza y movilidad de brazos y piernas en comparación con el estado esperado de la persona sin la terapia con anticuerpos.

Ejemplo 12. Tratamiento profiláctico de la atrofia musculoesquelética utilizando un anticuerpo humano que es un agonista del receptor CRF₂R.

A una persona del sexo femenino con peso de 45 kg que estuvo sometida a un procedimiento de enyesado para tratar la fractura sencilla del húmero después de una caída. A la persona se le trató para evitar la atrofia del músculo esquelético del brazo y el hombro afectados, debido a la falta de uso y a su uso limitado durante la curación de la fractura. Específicamente, a la persona se le administraron, a través de inyección intravenosa, una vez a la semana, comenzando el día del enyesado, 13 ml de solución con pH 6,0, que comprendía al receptor anti-hCRF₂R. La solución comprendía lo siguiente:

<u>Componente</u>	<u>Concentración (mg/ml)</u>
Anticuerpo activador de CRFR	20
L-histidina HCl	0,47
L-histidina	0,3
5 α , α -trehalosa dihidratada	20
Polisorbato 20	0,1
Agua esterilizada, bacteriostática	c.b.p para 1 mL

10 Al final del período de tratamiento, la persona mostró una conservación mensurable de la masa, fortaleza y movilidad muscular del brazo y hombro afectados, y una menor duración de terapia física en comparación con el estado esperado de la persona y el tratamiento de seguimiento sin la terapia con anticuerpos.

Ejemplo 13. Tratamiento profiláctico dke la atrofia musculoesquelética, utilizando urocortina II

15 Una persona del sexo femenino con peso de 60 kg fue admitida en el hospital en estado comatoso. La persona recibió el tratamiento con este método para evitar la atrofia del músculo esquelético de todo el cuerpo, debido a la falta de uso durante el estado comatoso. Específicamente, una vez al día mientras estuvo en coma, a la persona se le administraron, a través de infusión intravenosa lenta, aproximadamente 500 ml de una solución acuosa que se preparó añadiendo 5 ml de la siguiente solución madre a 500 ml de solución salina esterilizada:

<u>Componente</u>	<u>Concentración (mg/ml)</u>
20 Urocortina II	12
Amortiguador de fosfato de sodio, pH 7,4	140

Como resultado del tratamiento, la persona mostró una conservación mensurable de la masa y función musculoesquelética, y se necesitó de una menor terapia física durante el coma y después de recuperar la conciencia, en comparación con el estado de la persona sin la terapia con el fármaco.

25 Ejemplo 14. Tratamiento terapéutico de un paciente con atrofia muscular de Duchenne utilizando CRF

A una persona del sexo masculino con un peso de 40 kg y con un diagnóstico actual de distrofia muscular de Duchenne se le trató con un compuesto que muestra agonismo por el CRF1-R y el CRF2-R en una gama de dosis similar. A la persona se le trató con formulación de depósito de liberación prolongada del compuesto, con el fin de mejorar o retener la fortaleza y función muscular durante el

progreso de la enfermedad. Específicamente, a la persona se le administraron una vez al mes, a través de inyección intramuscular, 3 ml de una solución acuosa con pH 6,0 que comprendía lo siguiente:

<u>Componente</u>	<u>Concentración (mg/ml)</u>
CRH (Hormona Liberadora de Corticotropina)	4
Copolímero de ácidos D,L láctico y glicólico	5

Como resultado del tratamiento, la persona experimentó ya sea una mejora o la atenuación en la declinación de la fortaleza muscular o de la función muscular en evaluaciones en función del tiempo, en comparación con la exhibida durante el avance natural de la enfermedad.

La presente invención no está limitada en cuanto a su alcance por las modalidades específicas descritas, mismas que tienen la intención de servir solamente como ilustraciones de aspectos individuales de la invención, y los métodos y componentes funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de la invención. Estos incluyen, en forma enunciativa, especies de animal de prueba, naturaleza y tipo de agonistas de CRFR, sexo del animal, modelo de la atrofia, método para activar al CRFR, que incluye a las metodologías genéticas, etc. A los experimentados en el campo les serán evidentes las diversas modificaciones de la invención, adicionales a las mostradas y descritas en la presente, a partir de la lectura de la descripción anterior y de las figuras acompañantes. Se pretende que estas modificaciones queden dentro del alcance de las reivindicaciones anexas.

Reivindicaciones

1. Un método para identificar compuestos candidato para regular la masa o función musculoesquelética; el método comprende:
 - a) poner en contacto un compuesto de prueba con un CRF₂R,
 - b) determinar si el compuesto de prueba se une al CRF₂R, y
 - c) identificar aquellos compuestos de prueba que se unen al CRF₂R como compuestos candidato para regular la masa o función musculoesquelética.
2. Un método para identificar compuestos candidato para regular la masa o función musculoesquelética, el método comprende:
 - a) poner en contacto un compuesto de prueba con una célula que expresa un CRF₂R funcional,
 - b) determinar si el compuesto de prueba activa al CRF₂R, y
 - c) identificar a aquellos compuestos que activan al CRF₂R como compuestos candidato para regular la masa o función musculoesquelética.
3. El método para identificar compuestos candidato, según la reivindicación 2, el método comprende además la generación de una lista de compuestos candidato.
4. El método para identificar compuestos candidato según la reivindicación 2, en los que el CRF₂R se expresa en una célula eucariótica.
5. El método para identificar compuestos candidato, según la reivindicación 4, en donde el CRF₂R tiene una secuencia de aminoácidos que tiene más de 80% de identidad con la secuencia de SEQ ID NO: 10.
6. El método para identificar compuestos candidato según la reivindicación 4, en donde el CRF₂R tiene una secuencia de aminoácidos que es mayor a 90% de identidad con la secuencia de SEQ ID NO: 10.
7. El método para identificar compuestos candidato según la reivindicación 4, en donde el CRF₂R tiene la secuencia de aminoácidos correspondiente a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:32 o SEQ ID NO:38.
8. El método para identificar compuestos candidato según la reivindicación 4, en donde el CRF₂R es de una especie seleccionada del grupo que consiste de humanos, ratones y ratas.

Reivindicaciones

1. Un método para identificar compuestos candidato para regular la masa o función musculoesquelética; el método comprende:
 - a) poner en contacto un compuesto de prueba con un CRF₂R,
 - b) determinar si el compuesto de prueba se une al CRF₂R, y
 - c) identificar aquellos compuestos de prueba que se unen al CRF₂R como compuestos candidato para regular la masa o función musculoesquelética.
2. Un método para identificar compuestos candidato para regular la masa o función musculoesquelética, el método comprende:
 - a) poner en contacto un compuesto de prueba con una célula que expresa un CRF₂R funcional,
 - b) determinar si el compuesto de prueba activa al CRF₂R, y
 - c) identificar a aquellos compuestos que activan al CRF₂R como compuestos candidato para regular la masa o función musculoesquelética.
3. El método para identificar compuestos candidato, según la reivindicación 2, el método comprende además la generación de una lista de compuestos candidato.
4. El método para identificar compuestos candidato según la reivindicación 2, en los que el CRF₂R se expresa en una célula eucariótica.
5. El método para identificar compuestos candidato, según la reivindicación 4, en donde el CRF₂R tiene una secuencia de aminoácidos que tiene más de 80% de identidad con la secuencia de SEQ ID NO: 10.
6. El método para identificar compuestos candidato según la reivindicación 4, en donde el CRF₂R tiene una secuencia de aminoácidos que es mayor a 90% de identidad con la secuencia de SEQ ID NO: 10.
7. El método para identificar compuestos candidato según la reivindicación 4, en donde el CRF₂R tiene la secuencia de aminoácidos correspondiente a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 38.
8. El método para identificar compuestos candidato según la reivindicación 4, en donde el CRF₂R es de una especie seleccionada del grupo que consiste de humanos, ratones y ratas.

29
78

9. El método para identificar compuestos candidato según la reivindicación 8, en donde el CRF₂R es humano.
10. El método para identificar compuestos candidato, según la reivindicación 4, la célula tiene un nivel de AMPc celular, en el que la determinación de si el compuesto de prueba activa al CRF₂R, involucra la medición del nivel del AMPc celular.
11. El método para identificar compuestos candidato según la reivindicación 10, en el que la célula comprende además un gen reportero asociado en forma operativa con un elemento que responde al AMPc y la medición del nivel del AMPc celular involucra la medición de la expresión del gen reportero.
12. El método para identificar compuestos candidato según la reivindicación 11, en donde el gen reportero es fosfatasa alcalina, cloranfenicol acetiltransferasa, luciferasa, glucuronido sintetasa, hormona del crecimiento, fosfatasa alcalina de placenta o proteína verde fluorescente.
13. Un método para identificar compuestos candidato para regular la masa o función musculoesquelética que comprende, en cualquier orden:
 - a) poner en contacto un compuesto de prueba con una célula que expresa un CRF₂R funcional y determinar el nivel de activación del CRF₂R resultante del compuesto de prueba,
 - b) poner en contacto un compuesto de prueba con una célula que expresa un CRF₁R funcional y determinar el nivel de activación del CRF₁R resultante del compuesto de prueba, seguido por
 - c) comparar el nivel de activación del CRF₂R y el nivel de activación del CRF₁R, y
 - d) identificar aquellos compuestos que muestran similar actividad hacia el CRF₂R y el CRF₁R o que muestran selectividad por el CRF₂R, como compuestos candidato para regular la masa o función musculoesquelética.
14. El método según la reivindicación 13, en donde el compuesto candidato muestra una selectividad de 100 veces o mayor por el CRF₂R.
15. El método según la reivindicación 14, en donde el compuesto candidato muestra una selectividad de 1000 veces o mayor por el CRF₂R.
16. El método según la reivindicación 13, en donde el compuesto candidato muestra una selectividad por el CRF₂R de entre 1 vez y 100 veces.

80
39

17. Un método para identificar compuestos terapéuticos candidato de un grupo de uno o más compuestos candidato que previamente se ha determinado se unen al CRF₂R o lo activan; el método comprende:
- administrar el compuesto candidato a un animal no humano, y
 - determinar si el compuesto candidato regula la masa o función musculoesquelética en el animal tratado.
18. Un método para identificar compuestos candidato que prolongan o aumentan la activación inducida por agonista de un CRF₂R o de una ruta de transducción de la señal del CRF₂R, el método comprende, en cualquier orden o en forma concurrente:
- poner en contacto un compuesto de prueba con una célula que expresa un CRF₂R funcional,
 - tratar la célula con un agonista del CRF₂R durante un tiempo suficiente y con una concentración suficiente para provocar la desensibilización del CRF₂R en células de control, seguido por
 - determinar el nivel de activación del CRF₂R, y
 - identificar aquellos compuestos de prueba que prolongan o aumentan la activación de un CRF₂R o de una ruta de transducción de señal de CRF₂R, como compuestos candidato para regular la masa o función musculoesquelética.
19. Un método para identificar compuestos terapéuticos candidato de un grupo de uno o más compuestos candidato que previamente se ha determinado que prolongan o aumentan la activación de un CRF₂R o de una ruta de transducción de señal del CRF₂R; el método comprende:
- administrar el compuesto candidato, junto con un agonista del CRF₂R, a un animal, y
 - determinar si el compuesto candidato regula la masa o función musculoesquelética en el animal tratado.
20. Un método para identificar compuestos candidato para aumentar la expresión del CRF₂R o del CFR; el método comprende:
- poner en contacto un compuesto de prueba con una célula o un lisado celular que contiene un gen reportero, asociado en forma operativa con un elemento regulador de CRF₂R o con un elemento regulador del CRF;
 - detectar la expresión del gen reportero; y

81
80

- o) identificar aquellos compuestos que aumentan la expresión del gen reportero, como compuestos candidato para regular la masa o función musculoesquelética.
21. Un método para aumentar la masa o función musculoesquelética de un sujeto en el que es deseable este aumento; el método comprende:
- a) identificar al sujeto en el que es deseable el aumento en la masa o función muscular, y
 - b) administrarle al sujeto una cantidad segura y eficaz de un agonista de CRF₂R.
22. Un método para tratar la atrofia musculoesquelética en un sujeto que necesita dicho tratamiento; el método comprende:
- a) identificar al sujeto que necesita el tratamiento para la atrofia musculoesquelética; y
 - b) administrarle al sujeto una cantidad segura y eficaz de un compuesto seleccionado del grupo que consiste de un agonista de CRF₂R, un vector de expresión que codifica para un CRF₂R funcional, un vector de expresión que codifica para un CRF₂R constitutivamente activo, un vector de expresión que codifica para un CRF y un compuesto que aumenta la expresión del CRF₂R o del CRF.
23. Un método para tratar la atrofia musculoesquelética según la reivindicación 22, en donde el compuesto es un agonista del CRF₂R.
24. El método para tratar la atrofia musculoesquelética según la reivindicación 23, en donde el agonista del CRF₂R se identifica mediante un método para identificar compuestos candidato, para regular la masa o función musculoesquelética, el método comprende:
- a) poner en contacto un compuesto de prueba con un CRF₂R,
 - b) determinar si el compuesto de prueba activa al CRF₂R; y
 - c) identificar aquellos compuestos que activan al CRF₂R como compuestos candidato para regular la masa o función musculoesquelética.
25. El método para tratar la atrofia musculoesquelética según la reivindicación 23, en donde el agonista del CRF₂R es un anticuerpo quimérico o humano.
26. El método según la reivindicación 25, en donde el agonista de CRF₂R es selectivo para el CRF₂R con respecto al CRF₁R.
27. El método según la reivindicación 26, en donde el agonista del CRF₂R muestra una selectividad por el CRF₂R mayor o igual a 100 veces.

28. El método según la reivindicación 23, en donde el sujeto tiene distrofia muscular y el agonista de CRF₂R muestra una selectividad por el CRF₂R entre una vez y 100 veces.
29. El método para tratar la atrofia musculoesquelética según la reivindicación 23, que comprende además: administrarle al sujeto una cantidad segura y eficaz de un compuesto que prolonga o aumenta la activación del CRF₂R o la activación de una ruta de transducción de señal del CRF₂R.
30. Un anticuerpo purificado específico para un CRF₂R, en donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humano.
31. El anticuerpo según la reivindicación 30, en donde el anticuerpo es un agonista de un CRF₂R.
32. El anticuerpo según la reivindicación 31, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano.
33. Una composición farmacéutica que comprende:
- a) una cantidad segura y eficaz de un agonista de CRF₂R, y
 - b) un portador farmacéuticamente aceptable.
34. La composición farmacéutica según la reivindicación 33, en donde el agonista del CRF₂R es un anticuerpo quimérico o humano específico para un CRF₂R.
35. La composición farmacéutica según la reivindicación 33, en donde el agonista del CRF₂R es urocortina II.

83
32

5

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Se presentan métodos de tamizado para identificar compuestos que se unen o que activan a los receptores del factor 2 liberador de corticotropina (CRF₂R) y para regular o potencialmente regular la masa o función musculoesquelética *in vivo*. También se presentan métodos de tamizado para identificar compuestos que prolongan o aumentan la activación del CRF₂Rs o de las rutas de transducción de señal de CRF₂R, se proporciona un aumento en la expresión del CRF₂R o un aumento en la expresión del CRF. Se describen composiciones farmacéuticas que comprenden agonistas del CRF₂R, anticuerpos para el CRF₂R y métodos para aumentar la masa o función musculoesquelética o para el tratamiento de la atrofia musculoesquelética utilizando CRF₂R como el objeto para la intervención, y métodos para el tratamiento de las distrofias musculares.

10

48

63

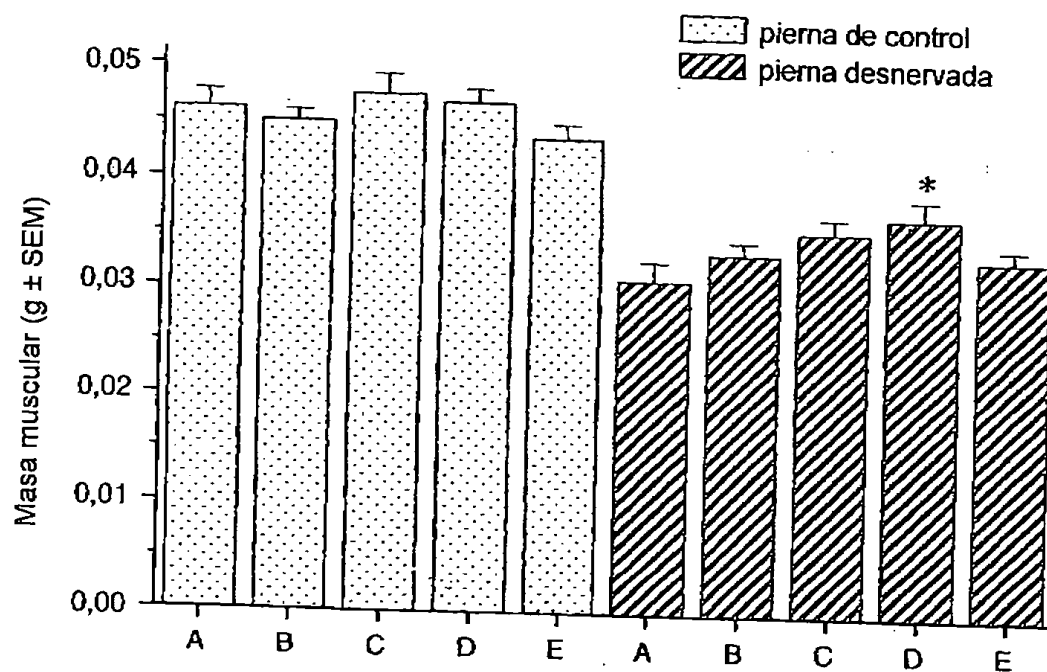


FIG. 1

○

○

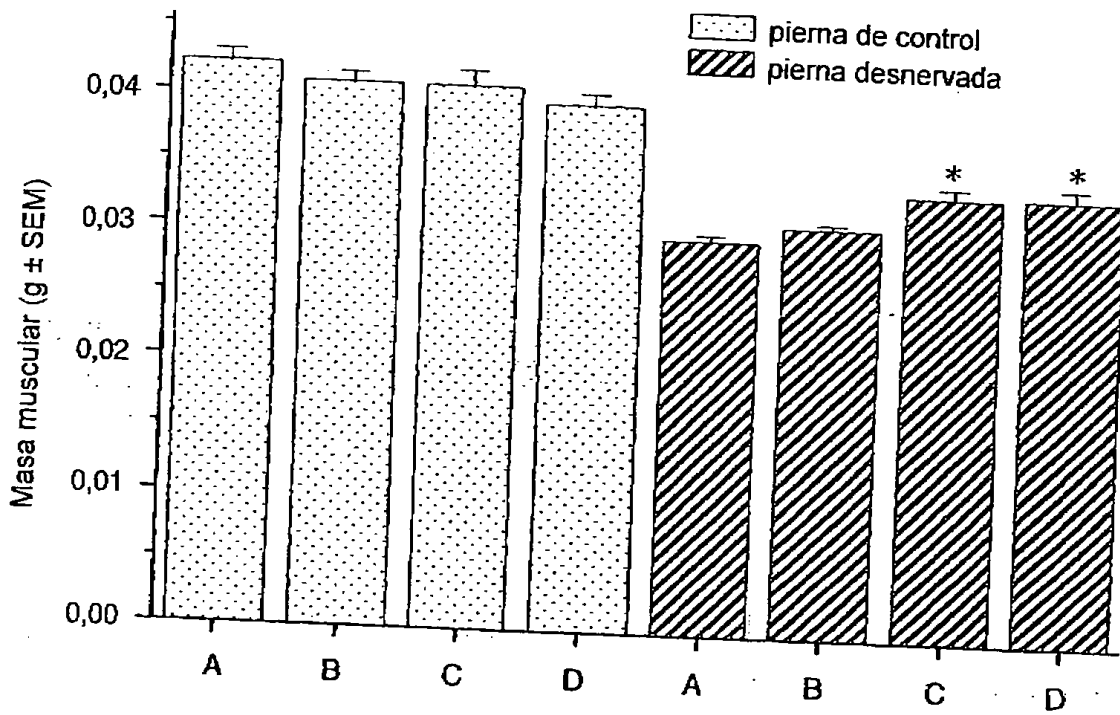


FIG. 2

Masa muscular (g $\pm$ SEM)

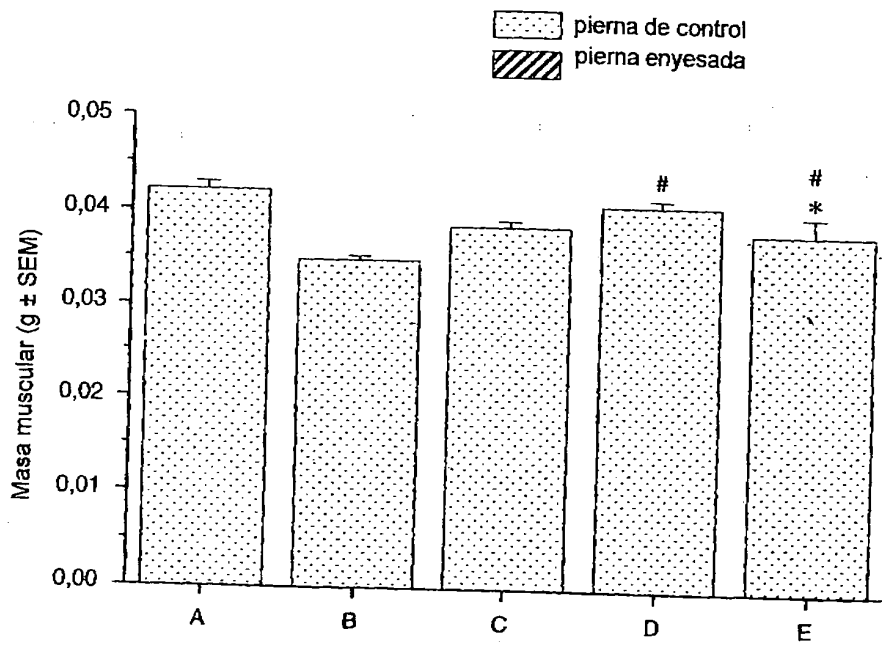


FIG. 3A

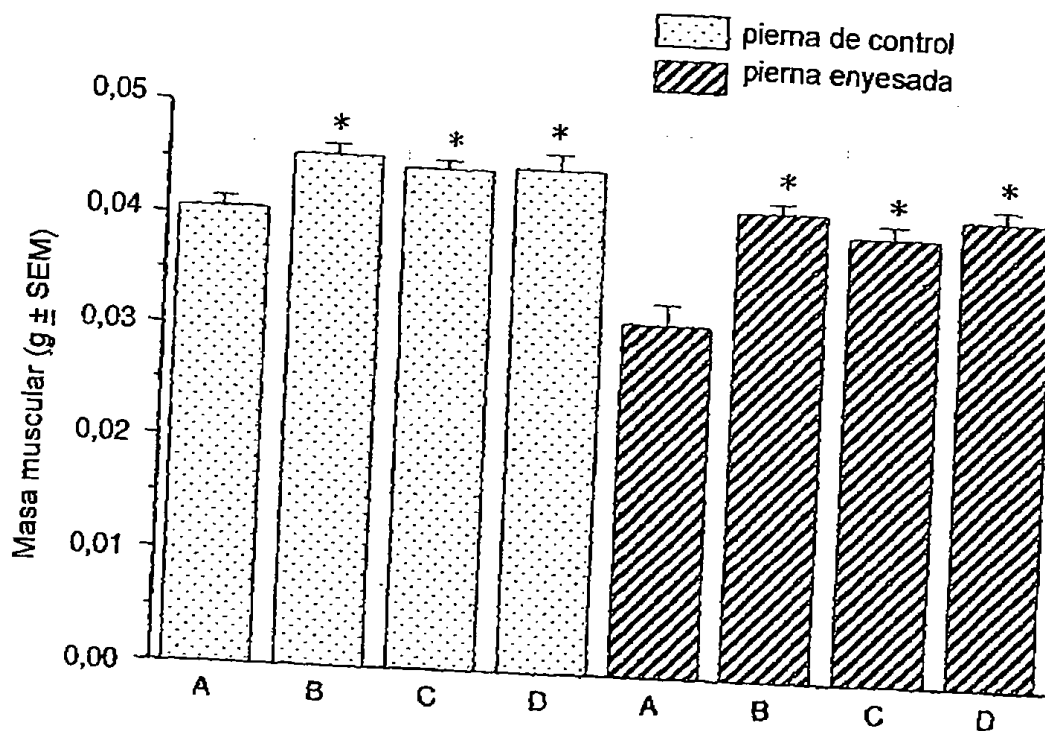


FIG. 4A



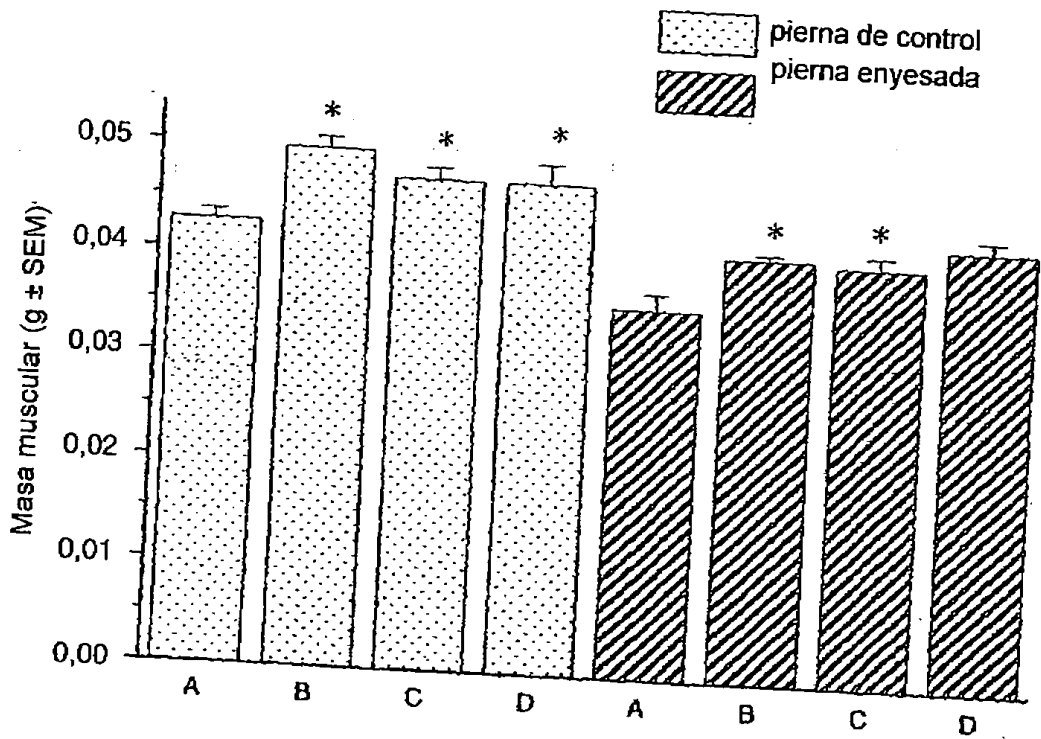


Fig. 4B

88

AUG. 29, 2003

2:55PM

LADDS & PARRY NY 212 246 8959

NO. 950 P. 73/83

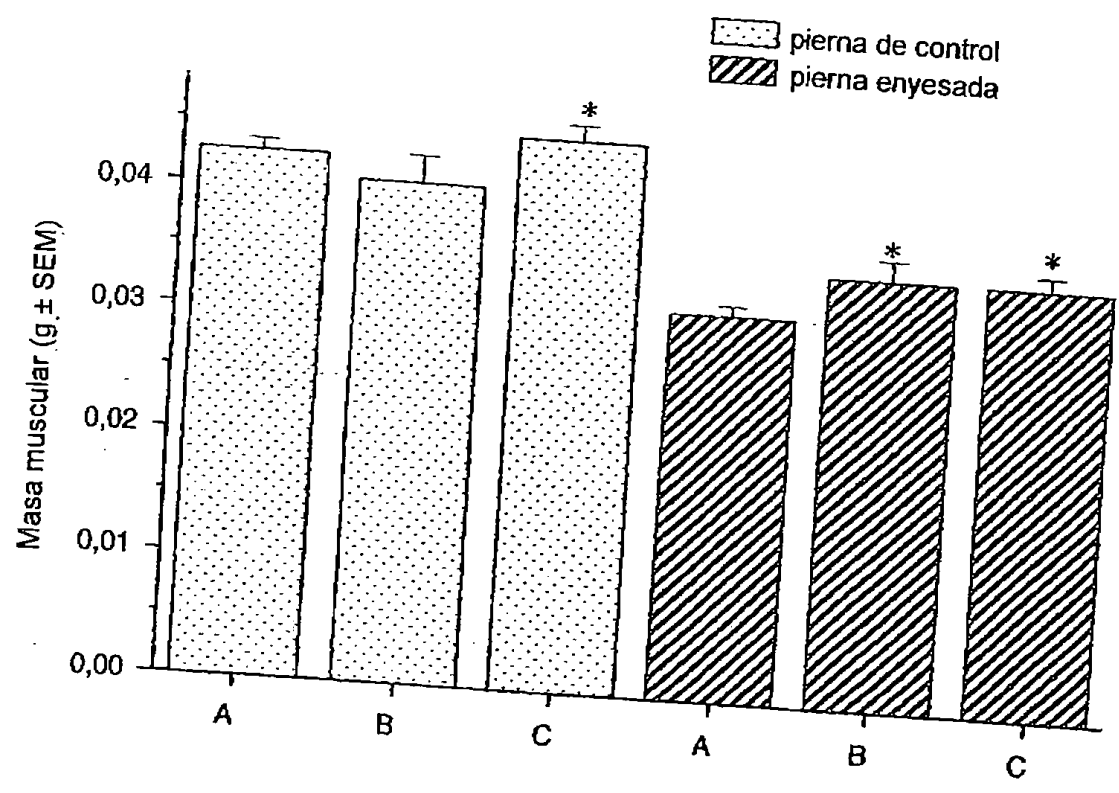


FIG. 5

90

16

90

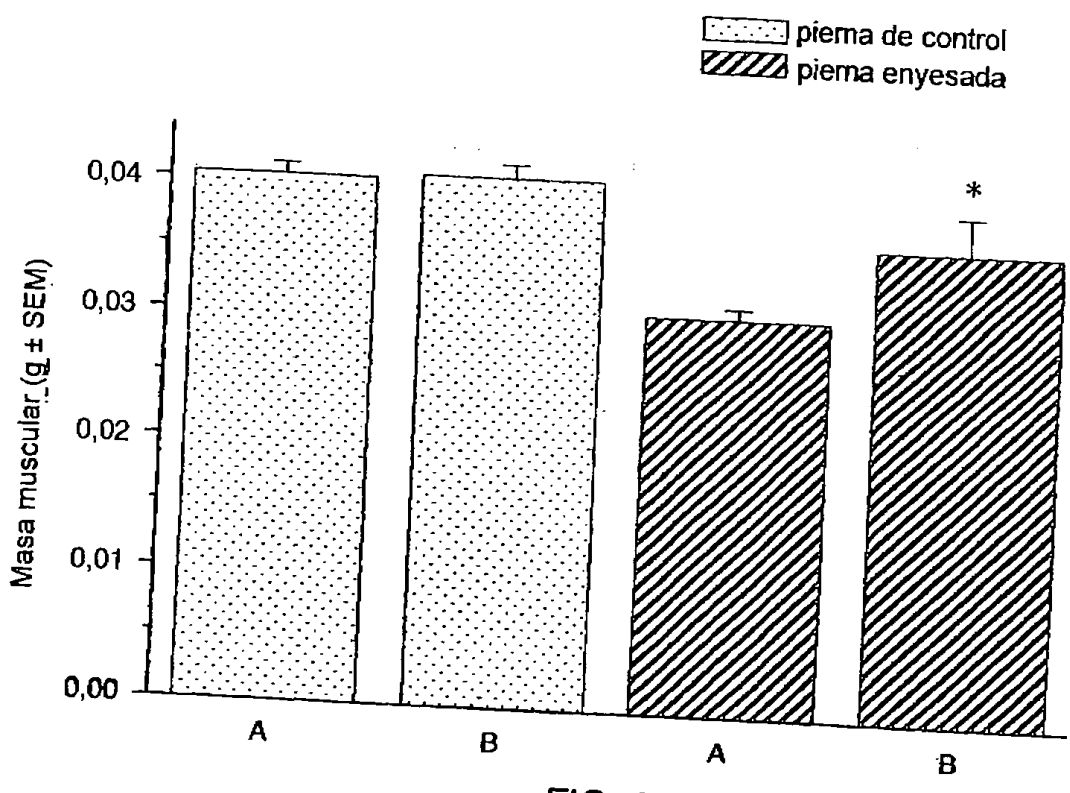


FIG. 6A

○

○

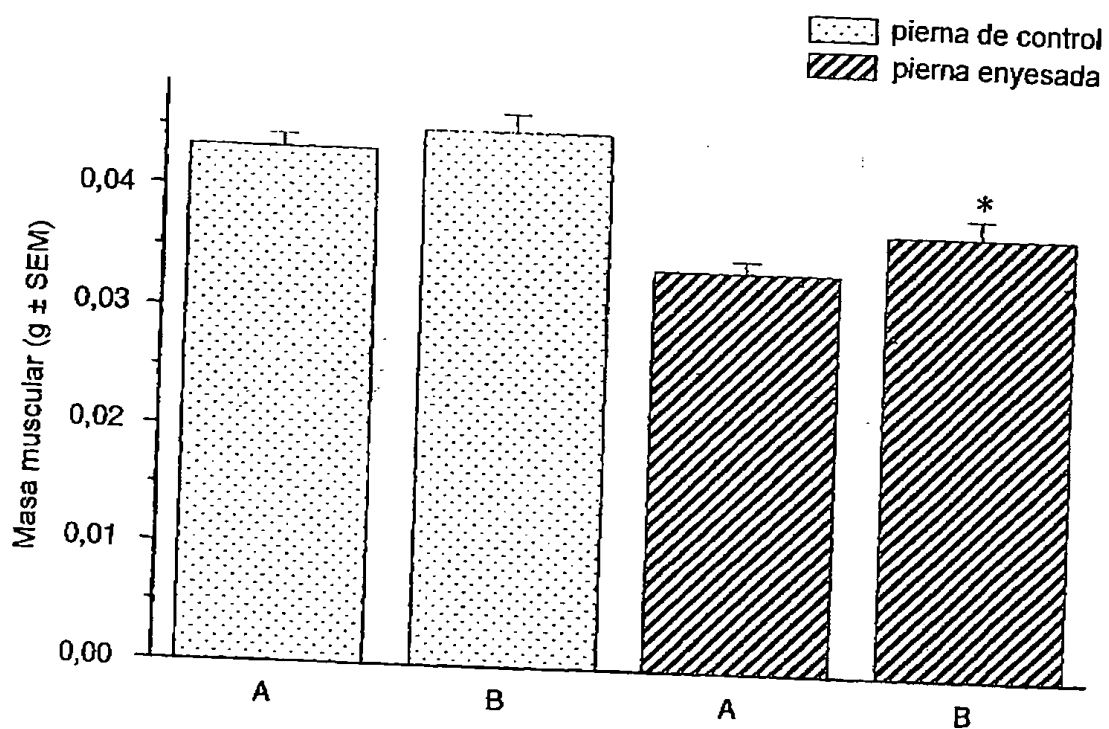


FIG. 6B

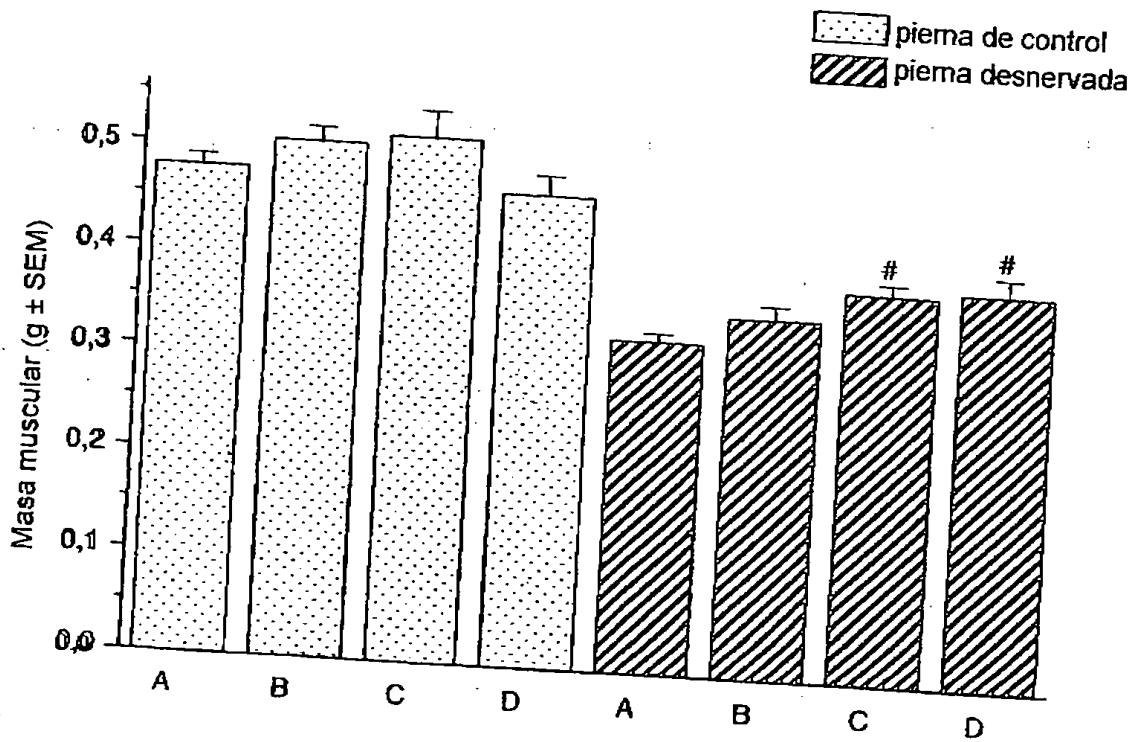


FIG. 7A

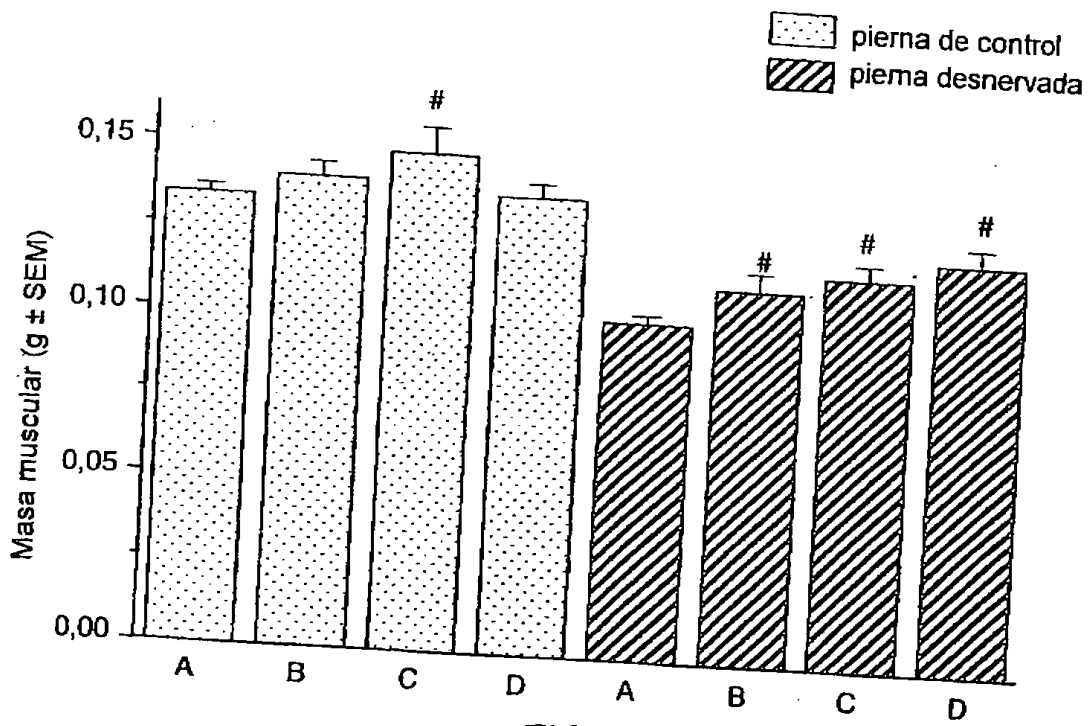


FIG. 7B

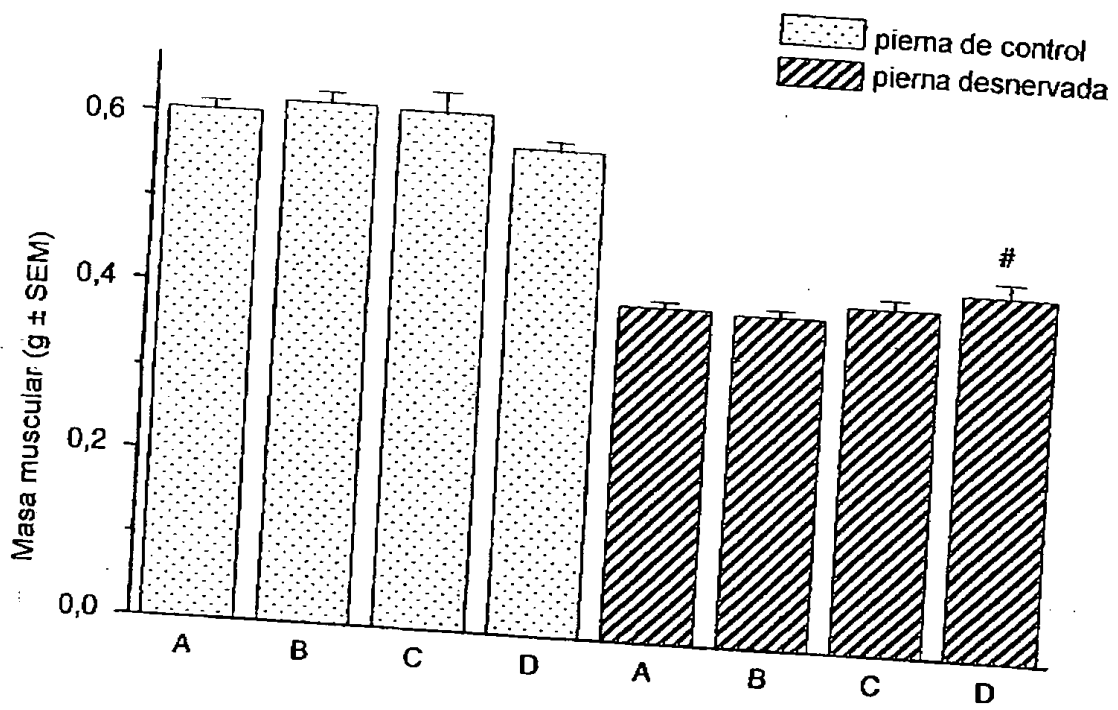


FIG. 7C

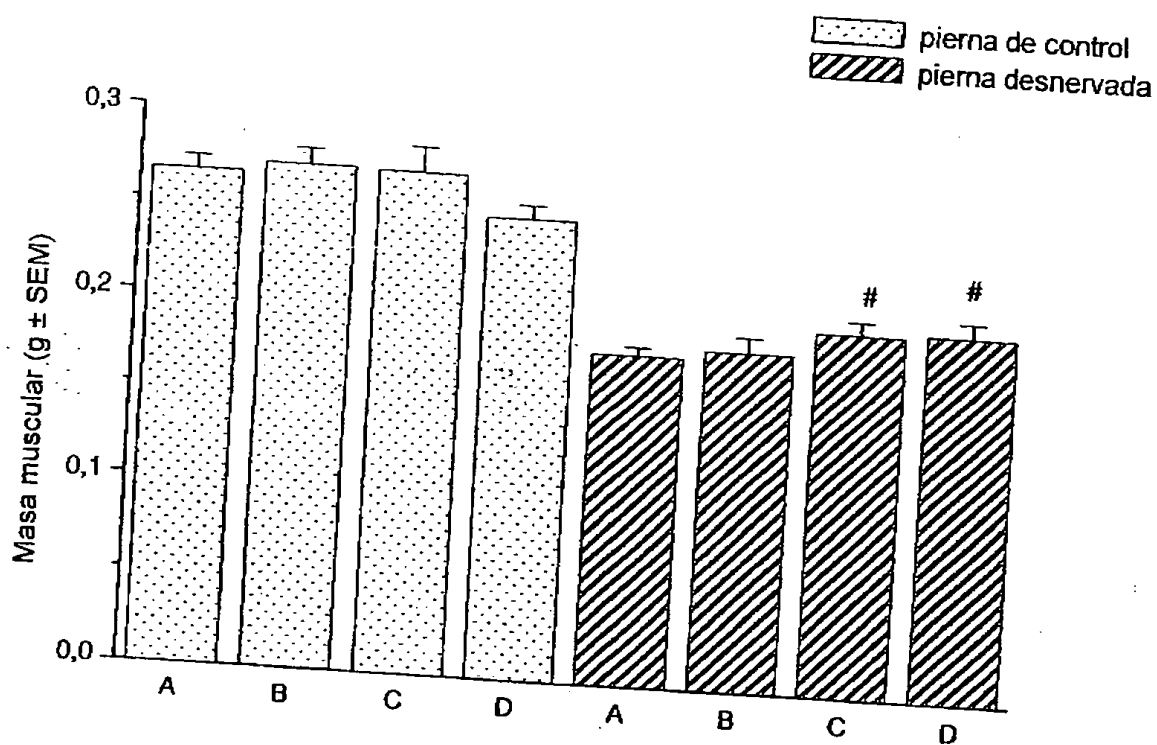


FIG. 7D

96

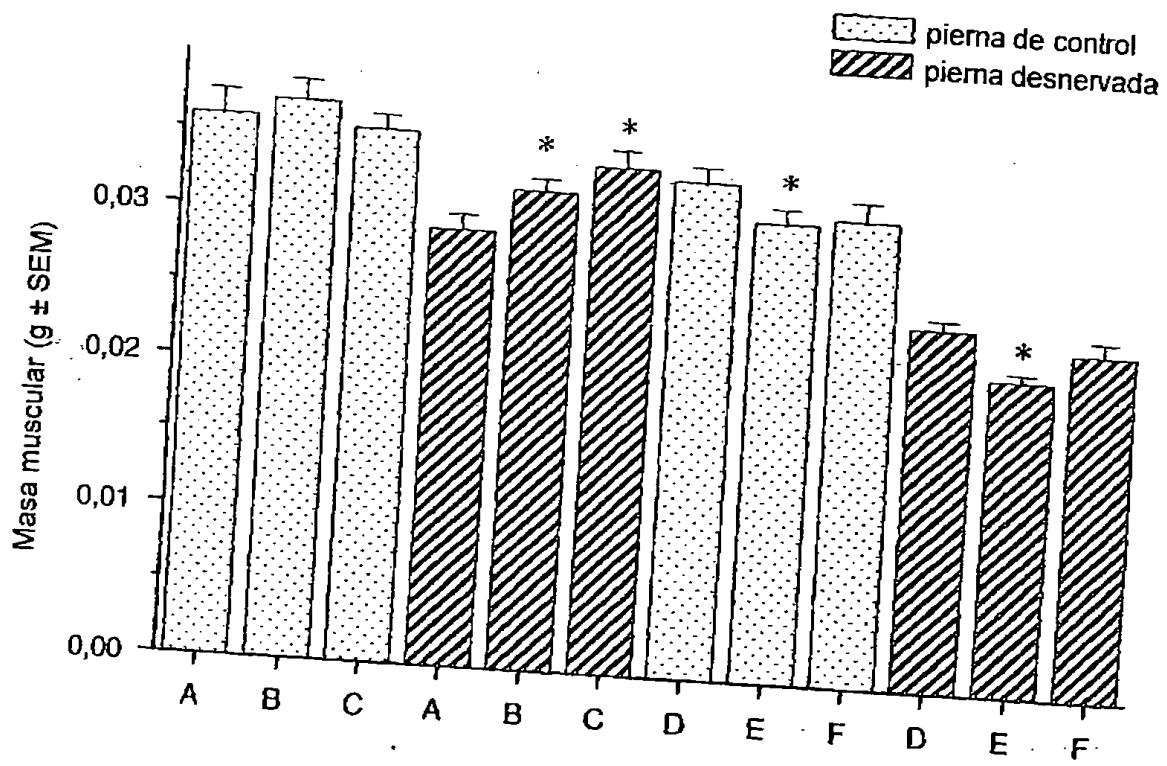


FIG. 8

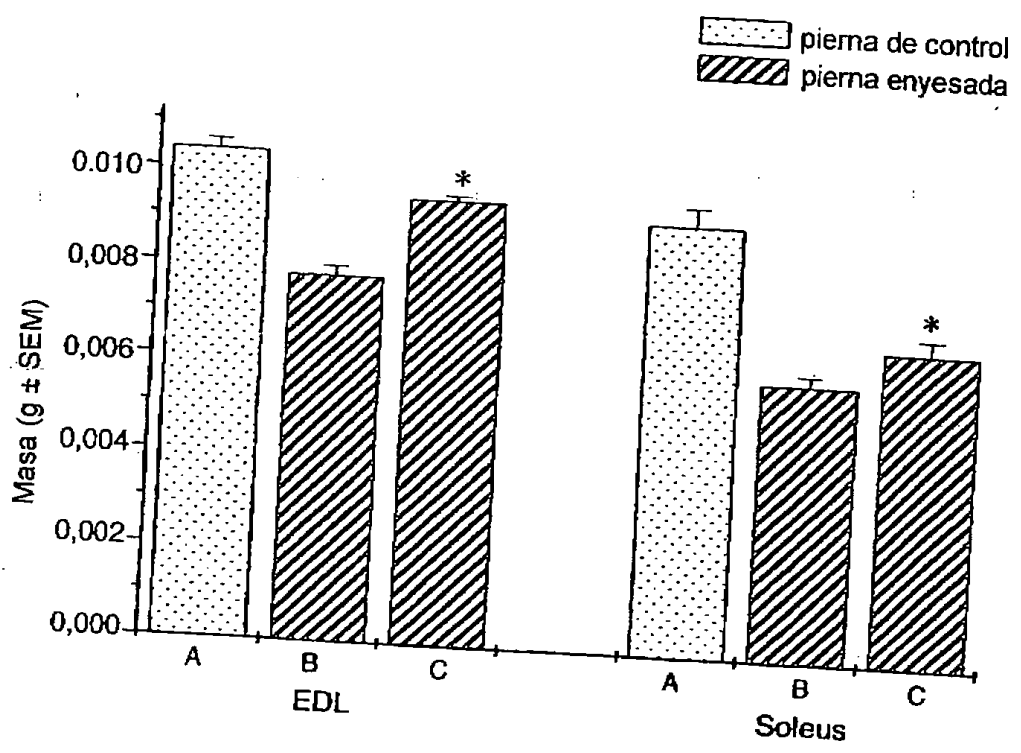


FIG. 9A

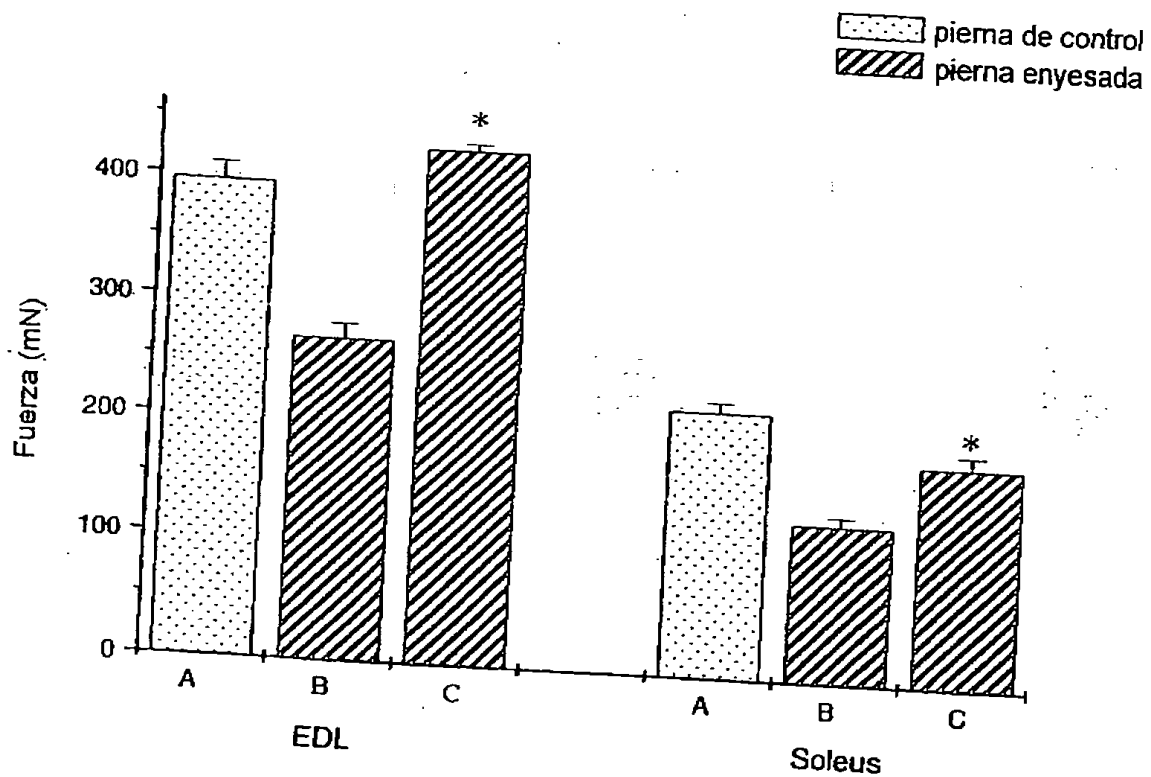


FIG. 9B

100
99

METHODS FOR IDENTIFYING COMPOUNDS FOR REGULATING MUSCLE MASS OR FUNCTION USING CORTICOTROPIN RELEASING FACTOR RECEPTORS

TECHNICAL FIELD

The present invention relates to methods of identifying candidate compounds for regulating skeletal muscle mass or function or regulating the activity or expression of a corticotropin releasing factor-2 receptor (CRF₂R). The invention also relates to methods for the treatment of skeletal muscle atrophy or methods for inducing skeletal muscle hypertrophy using CRF₂R as the target for intervention and to methods of treating muscular dystrophies using CRF₂R and corticotropin releasing factor-1 receptor (CRF₁R) as targets

BACKGROUND

CRFR and ligands

There are two corticotropin releasing factor receptors, identified to date (CRF₁R and CRF₂R) which belong to G-protein coupled receptor (GPCR) class. Agonist activation of CRF₁R or CRF₂R leads to G_α activation of adenylate cyclase. Adenylate cyclase catalyzes the formation of cAMP, which in turn has multiple effects including the activation of protein kinase A, intracellular calcium release and activation of mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). In other studies, the enhancement of intracellular inositol triphosphate synthesis, after agonist activation of CRF receptors, suggests that CRFRs also couple to G_{αq}.

CRF₁R and CRF₂R have been cloned from human, rat, mouse, chicken, cow, catfish, frog and sheep. CRF₁R and CRF₂R each have a unique distribution patterns. In humans three isoforms, alpha, beta and gamma, of the CRF₂R receptor have been cloned. Homologs for alpha and beta CRF₂R have been identified in rat

Several ligands/agonists of the CRFRs are known. Corticotropin releasing factor (or hormone, CRF or CRH) binds to and activates CRF₁R and CRF₂R. CRF is a major modulator of the body's responses to stress. This 41-amino acid peptide presides over a panoply of neuronal, endocrine, and immune processes as the primary regulator of the hypothalamus-pituitary-adrenal hormonal axis (HPA axis). In addition, there is substantial sequence homology between CRF and the amphibian peptide sauvagine as well as the teleostian peptide urotensin, both of which act as agonists of CRF₁R and CRF₂R. These three peptides have similar biological properties as hypotensive agents and ACTH secretagogues. In addition, a mammalian congener of urotensin, urocortin, has been characterized.

101
100

The CRF receptors can be distinguished, from non-CRFRs, pharmacologically through the use of receptor selective agonists and antagonists. These selective agonists and antagonist, along with the CRFR knockout mice, have been useful in determining which CRF receptor mediates specific biological responses.

The role of CRF₁R has been fairly well established. Mice in which the CRF₁R gene has been ablated (CRF₁R knockout) demonstrate an impaired stress response and reduced anxiety-like behavior. CRF₁R is a major mediator of the HPA axis. Specifically, corticotropin releasing factor, which is released from the hypothalamus and transported to the anterior pituitary via the hypothalamic-hypophyseal portal system, interacts with the CRF₁R present on cells located in the anterior pituitary. Agonist activation of the CRF₁R results in release of ACTH from the cells of the anterior pituitary into the systemic circulation. The released ACTH binds the ACTH receptor present on cells located in the adrenal cortex, resulting in the release of adrenal hormones including corticosteroids. Corticosteroids mediate many effects including, but not limited to, immune system suppression via a mechanism which involves thymic and splenic atrophy. Thus activation of the CRF₁R indirectly results in the down-regulation of the immune system via activation of the HPA axis.

The role of CRF₂R is less well developed. Mice in which the CRF₂R gene has been ablated (CRF₂R knockout) demonstrate an impaired food intake reduction following stimulation with urocortin, lack of vasodilation, but a normal stress response. Experiments with CRF₂R demonstrated that CRF₂R is responsible for the hypotensive/vasodilatory effects of CRFR agonists and for the reduction in food intake observed following treatment of mice with CRFR agonists.

Skeletal Muscle Atrophy and Hypertrophy

Skeletal muscle is a plastic tissue which readily adapts to changes in either physiological demand for work or metabolic need. Hypertrophy refers to an increase in skeletal muscle mass while skeletal muscle atrophy refers to a decrease in skeletal muscle mass. Acute skeletal muscle atrophy is traceable to a variety of causes including, but not limited to: disuse due to surgery, bed rest, or broken bones; denervation/nerve damage due to spinal cord injury, autoimmune disease, or infectious disease; glucocorticoid use for unrelated conditions; sepsis due to infection or other causes; nutrient limitation due to illness or starvation; and space travel. Skeletal muscle atrophy occurs through normal biological processes, however, in certain medical situations this normal biological process results in a debilitating level of muscle atrophy. For example, acute skeletal

102
101

muscle atrophy presents a significant limitation in the rehabilitation of patients from immobilizations, including, but not limited to, those accompanying an orthopedic procedure. In such cases, the rehabilitation period required to reverse the skeletal muscle atrophy is often far longer than the period of time required to repair the original injury. Such acute disuse atrophy is a particular problem in the elderly, who may already suffer from substantial age-related deficits in muscle function and mass, because such atrophy can lead to permanent disability and premature mortality.

Skeletal muscle atrophy can also result from chronic conditions such as cancer cachexia, chronic inflammation, AIDS cachexia, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), congestive heart failure, genetic disorders, e.g., muscular dystrophies, neurodegenerative diseases and sarcopenia (age associated muscle loss). In these chronic conditions, skeletal muscle atrophy can lead to premature loss of mobility, thereby adding to the disease-related morbidity.

Little is known regarding the molecular processes which control atrophy or hypertrophy of skeletal muscle. While the initiating trigger of the skeletal muscle atrophy is different for the various atrophy initiating events, several common biochemical changes occur in the affected skeletal muscle fiber, including a decrease in protein synthesis and an increase in protein degradation and changes in both contractile and metabolic enzyme protein isozymes characteristic of a slow (highly oxidative metabolism/slow contractile protein isoforms) to fast (highly glycolytic metabolism/fast contractile protein isoforms) fiber switch. Additional changes in skeletal muscle which occur include the loss of vasculature and remodeling of the extracellular matrix. Both fast and slow twitch muscle demonstrate atrophy under the appropriate conditions, with the relative muscle loss depending on the specific atrophy stimuli or condition. Importantly, all these changes are coordinately regulated and are switched on or off depending on changes in physiological and metabolic need.

The processes by which atrophy and hypertrophy occur are conserved across mammalian species. Multiple studies have demonstrated that the same basic molecular, cellular, and physiological processes occur during atrophy in both rodents and humans. Thus, rodent models of skeletal muscle atrophy have been successfully utilized to understand and predict human atrophy responses. For example, atrophy induced by a variety of means in both rodents and humans results in similar changes in muscle anatomy, cross-sectional area, function, fiber type switching, contractile protein expression, and histology. In addition, several agents have been demonstrated to regulate skeletal muscle atrophy in both rodents and in humans. These agents include anabolic

103
102

steroids, growth hormone, insulin-like growth factor I, and beta adrenergic agonists. Together, these data demonstrate that skeletal muscle atrophy results from common mechanisms in both rodents and humans

While some agents have been shown to regulate skeletal muscle atrophy and are approved for use in humans for this indication, these agents have undesirable side effects such as hypertrophy of cardiac muscle, neoplasia, hirsutism, androgenization of females, increased morbidity and mortality, liver damage, hypoglycemia, musculoskeletal pain, increased tissue turgor, tachycardia, and edema. Currently, there are no highly effective and selective treatments for either acute or chronic skeletal muscle atrophy. Thus, there is a need to identify other therapeutic agents which regulate skeletal muscle atrophy

Muscular Dystrophies

Muscular dystrophies encompass a group of inherited, progressive muscle disorders, distinguished clinically by the selective distribution of skeletal muscle weakness. The two most common forms of muscle dystrophy are Duchenne and Becker dystrophies, each resulting from the inheritance of a mutation in the dystrophin gene, which is located at the Xp21 locus. Other dystrophies include, but are not limited to, limb-girdle muscular dystrophy which results from mutation of multiple genetic loci including the p94 calpain, adhalin, γ -sarcoglycan, and β -sarcoglycan loci; fascioscapulohumeral (Landouzy-Dejerine) muscular dystrophy, myotonic dystrophy, and Emery-Dreifuss muscular dystrophy. The symptoms of Duchenne muscular dystrophy, which occurs almost exclusively in males, include a waddling gait, toe walking, lordosis, frequent falls and difficulty in standing up and climbing stairs. Symptoms start at about 3-7 years of age with most patients confined to a wheelchair by 10-12 years and many die at about 20 years of age due to respiratory complications. Current treatment for Duchenne muscular dystrophy includes administration of prednisone (a corticosteroid drug), which while not curative, slows the decline of muscle strength and delays disability. Corticosteroids, such as prednisone, are believed to act by blocking the immune cell activation and infiltration which are precipitated by muscle fiber damage resulting from the disease. Unfortunately, corticosteroid treatment also results in skeletal muscle atrophy which negates some of the potential benefit of blocking the immune response in these patients. Thus, there is a need to identify therapeutic agents which slow the muscle fiber damage and delay the onset of disability in patients with muscular dystrophies, but cause a lesser degree of skeletal muscle atrophy than current therapies.

One problem associated with identification of compounds for use in the treatment of

104
103

skeletal muscle atrophy or of muscular dystrophies has been the lack of good screening methods for the identification of such compounds. Applicants have now found that CRF₂R are involved in the regulation of skeletal muscle mass or function and that agonists of CRF₂R are able to block skeletal muscle atrophy and/or induce hypertrophy of skeletal muscle. The present invention solves the problem of identifying compounds for the treatment of muscle atrophy by providing screening methods using CRF₂R which can be used to identify candidate compounds useful for the treatment of muscle atrophy. The present invention also solves the problem of finding compounds for treatment of muscle dystrophies by providing a screening method to identify candidate compounds which activate both the CRF₁R and CRF₂R.

SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to the use of CRFRs to identify candidate compounds that are potentially useful in the treatment of skeletal muscle atrophy and or to induce skeletal muscle hypertrophy. In particular, the invention provides *in vitro* methods for identifying candidate compounds for regulating skeletal muscle mass or function comprising contacting a test compound with a cell expressing CRF₂R, or contacting a test compound with isolated CRF₂R, and determining whether the test compound either binds to or activates the CRF₂R. Another embodiment of the invention relates to a method for identifying candidate therapeutic compounds from a group of one or more candidate compounds which have been determined to bind to or activate CRF₂R comprising administering the candidate compound to a non-human animal and determining whether the candidate compound regulates skeletal muscle mass or muscle function in the treated animal.

A further embodiment of the invention relates to a method for identifying candidate compounds for regulating skeletal muscle mass or function comprising, in any order: (i) contacting a test compound with a cell expressing a functional CRF₂R, and determining a level of activation of CRF₂R resulting from the test compound; (ii) contacting a test compound with a cell expressing a functional CRF₁R, and determining the level of activation of CRF₁R resulting from the test compound; followed by (iii) comparing the level of CRF₂R activation and the level of CRF₁R activation, and (iv) identifying those test compounds that show similar activity toward CRF₂R and CRF₁R or show selectivity for CRF₂R as candidate compounds for regulating skeletal muscle mass or function.

The invention further provides methods for identifying candidate compounds that prolong or augment the agonist-induced activation of CRF₂R or of a CRF₂R signal transduction pathway.

105
104

These methods comprise in any order or concurrently: (i) contacting a test compound; with a cell which expresses functional CRF₂R (ii) treating the cell with a CRF₂R agonist for a sufficient time and at a sufficient concentration to cause desensitization of the CRF₂R in control cells; followed by (iii) determining the level of activation of CRF₂R and identifying test compounds that prolong or augment the activation of a CRFR or a CRFR signal transduction pathway as candidate compounds for regulating skeletal muscle mass or function. In a particular embodiment, the present invention relates to a method of identifying candidate therapeutic compounds from a group of one or more candidate compounds determined to prolong or augment the activation of a CRF₂R or of a CRF₂R signal transduction pathway comprising: administering the candidate compound, in conjunction with a CRF₂R agonist, to a non-human animal and determining whether the candidate compound regulates skeletal muscle mass or function in the treated animal.

The invention further provides methods for identifying candidate compounds that increase CRF₂R expression comprising contacting a test compound with a cell or cell lysate containing a reporter gene operatively associated with a CRF₂R gene regulatory element and detecting expression of the reporter gene. Test compounds that increase expression of the reporter gene are identified as candidate compounds for increasing CRF₂R expression. In a particular embodiment, the present invention relates to a method of determining whether those candidate compounds which increase CRF₂R expression can be used to regulate skeletal muscle mass or function *in vivo* by administering a candidate compound to a non-human animal and determining whether the candidate compound regulates skeletal muscle mass or function in the treated animal.

The invention further provides methods for identifying candidate compounds that increase CRF expression comprising contacting a test compound with a cell or cell lysate containing a reporter gene operatively associated with a CRF gene regulatory element and detecting expression of the reporter gene. Test compounds that increase expression of the reporter gene are identified as candidate compounds for increasing CRF expression. In a particular embodiment, the present invention relates to a method of determining whether those candidate compounds which increase CRF expression can be used to regulate skeletal muscle mass or function *in vivo* by administering a candidate compound to a non-human animal and determining whether the candidate compound regulates skeletal muscle mass or function in the treated animal.

The present invention also relates to the use of CRF₂R agonists, expression vectors encoding a functional CRF₂R, expression vectors encoding a constitutively active CRF₂R or compounds that increase expression of CRF₂R, or CRF to treat skeletal muscle atrophy. In

106
103

particular, the invention provides methods of treating skeletal muscle atrophy, in a subject in need of such treatment, comprising administering to the subject a safe and effective amount of a CRF₂R agonist, an expression vector encoding a functional CRF₂R, an expression vector encoding a constitutively active CRF₂R, an expression vector encoding a CRF or CRF analog, or a compound that increases expression of CRF₂R, or CRF. In a particular embodiment, the present invention relates to a method for treating skeletal muscle atrophy in a subject in need of such treatment comprising administering to the subject a safe and effective amount of a CRF₂R agonist in conjunction with a safe and effective amount of a compound that prolongs or augments the agonist-induced activation of CRF₂R, or of a CRF₂R signal transduction pathway.

The present invention also relates to the use of a CRF₂R agonist to increase skeletal muscle mass or function in a subject. In particular, the invention provides methods of increasing skeletal muscle mass or function in a subject in which such an increase is desirable, comprising identifying a subject in which an increase in muscle mass or function is desirable and administering to the subject a safe and effective amount of a CRFR agonist.

The invention further provides for pharmaceutical compositions comprising a safe and effective amount of a CRF₂R agonist and a pharmaceutically-acceptable carrier. In a particular embodiment the pharmaceutical composition comprises a chimeric or human antibody specific for a CRF₂R. In another particular embodiment the pharmaceutical composition comprises a CRF or CRF analog, preferably urocortin II.

The present invention also provides for antibodies to CRF₂R and in particular to chimeric or human antibodies that are agonists of CRF₂R.

Throughout this application various publications are referenced. The disclosures of these publications in their entireties are hereby incorporated by reference in this application in order to more fully describe the state of the art to which this invention pertains.

SEQUENCE LISTING DESCRIPTION

Each of the CRFR nucleotide and protein sequences or CRF analog protein sequence included in the sequence listing, along with the corresponding Genbank or Derwent accession number(s) and animal species from which it is cloned, is shown in Table I. Also shown are accession numbers for related nucleotide sequences that encode identical, or nearly identical, amino acid sequences as the sequence shown in the sequence listing. These related sequences differ mainly in the amount of 5' or 3' untranslated sequence shown.

TABLE I

107
106

Sequence description	SEQ ID NO: nucleotide, amino acid	Species	Genbank (GB) or Derwent (D) Accession No. for nucleotide sequence	Related Genbank (GB) or Derwent (D) Accession Nos.
CRF ₁ R	1, 2	<i>Homo sapiens</i>	X72304 (GB)	E11431 (GB) L23332 (GB) I92584 (D) T37068 (D) T28968 (D) Q81952 (D)
CRF ₁ R variant	3, 4	<i>Homo sapiens</i>	L23333 (GB)	
CRF ₁ R variant	5, 6	<i>Homo sapiens</i>	NM_004382 (GB)	
CRF ₁ R variant	7, 8	<i>Homo sapiens</i>	AF180301 (GB)	
CRF ₂ R alpha	9, 10	<i>Homo sapiens</i>	U34587 (GB) NM_001883 (GB)	E12752 (GB) T12247 (D) T66508 (D)
CRF ₂ R beta	11, 12	<i>Homo sapiens</i>	AF011406 (GB)	
CRF ₂ R gamma	13, 14	<i>Homo sapiens</i>	AF019381 (GB)	
CRF ₁ R	15, 16	<i>Rattus norvegicus</i>	T28970 (D)	L25438 (GB) L24096 (GB) I92586 (D) Q81954 (D) AH006791 (GB)
CRF ₂ R alpha	17, 18	<i>Rattus norvegicus</i>	U16253 (GB)	NM_022714 (GB) X01009 (D) T12243 (D)
CRF ₂ R beta variant	19, 20	<i>Rattus norvegicus</i>	T12244 (D)	
CRF ₁ R	21, 22	<i>Mus musculus</i>	NM_007762 (GB)	X72305 (D)
CRF ₂ R	23, 24	<i>Mus musculus</i>	T28972 (D)	U17858 (GB)
CRF ₂ R	25, 26	<i>Mus musculus</i>	NM_009953 (GB)	
CRF ₁ R	27, 28	<i>Ovis aries</i>	AF054582 (GB)	
CRF ₁ R	29, 30	<i>Xenopus laevis</i>	Y14036 (GB)	
CRF ₂ R	31, 32	<i>Xenopus laevis</i>	Y14037 (GB)	
CRF ₁ R	33, 34	<i>Ameiurus nebulosus</i>	AF229359 (GB)	
CRF ₁ R	35, 36	<i>Ameiurus nebulosus</i>	AF229361 (GB)	
CRF ₂ R	37, 38	<i>Ameiurus nebulosus</i>	AF229360 (GB)	
CRF ₁ R	39, 40	<i>Bos taurus</i>	AB055434 (GB)	
CRF ₁ R	41, 42	<i>Gallus gallus</i>	L41563 (GB)	
Urocortin II	43	<i>Mus musculus</i>	AF331517	
Urocortin-related peptide	44	<i>Homo sapiens</i>	BC002647	

108
107

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

FIG. 1 demonstrates the anti-atrophy effect of the CRF₁R/CRF₂R agonist, sauvagine (administered subcutaneously, 2X daily), on the medial gastrocnemius muscle in the mouse sciatic nerve denervation atrophy model.

FIG. 2 demonstrates the anti-atrophy effect of sauvagine (administered continuously by osmotic minipump) on the tibialis anterior muscle in the mouse sciatic nerve denervation atrophy model.

FIGS. 3A and 3B demonstrate the anti-atrophy effect of sauvagine (administered continuously by osmotic minipump) on glucocorticoid-induced atrophy of the tibialis anterior muscle (FIG 3A) and the medial gastrocnemius muscle (FIG 3B).

FIG 4A demonstrates the anti-atrophy effect of sauvagine (administered subcutaneously, 2X daily) on the casting-induced atrophy of the tibialis anterior muscle and hypertrophy- inducing effect on the non-casted (normal) tibialis anterior muscle. FIG 4B demonstrates the anti-atrophy effect of sauvagine on the casting-induced atrophy of the medial gastrocnemius muscle and the hypertrophy inducing effect of sauvagine on the non-casted (normal) medial gastrocnemius muscle.

FIG. 5 demonstrates the anti-atrophy and hypertrophy inducing effects of sauvagine and urocortin (administered continuously by osmotic minipump) on the tibialis anterior muscle in the mouse sciatic nerve denervation-induced atrophy model.

FIGS. 6A and 6B demonstrate the anti-atrophy effects of urocortin (administered subcutaneously, 2X daily) on the disuse-induced atrophy of the tibialis anterior muscle (FIG 6A) and of the medial gastrocnemius muscle (FIG 6B).

FIG. 7 demonstrates in the anti-atrophy effect of sauvagine (administered subcutaneously, 2X daily), in the adrenalectomized rat sciatic nerve denervation-induced atrophy model, on the denervation-induced atrophy of the tibialis anterior (FIG 7A), extensor digitorum longus (EDL) (FIG. 7B), soleus (FIG. 7C), medial gastrocnemius (FIG. 7D), and plantaris muscles. In addition, sauvagine induced hypertrophy of the non-denervated EDL muscle (FIG. 7B).

109
102

FIG. 8 demonstrates that in the mouse sciatic nerve denervation atrophy model, sauvagine (administered continuously by osmotic minipump) had an anti-atrophy effect on the tibialis anterior muscle in wild-type mice but not in CRF₂R knockout mice.

FIGS. 9A and B demonstrate that in a mouse leg casting disuse atrophy model, sauvagine had an anti-atrophy effect on the EDL and soleus muscle as measured by mass (FIG 9A) or muscle function (FIG 9B).

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

I. Terms and Definitions:

The following is a list of definitions for terms used herein.

"Agonist" means any compound, including, but not limited to, antibodies, that activates a receptor. For example, CRFR agonists include, but are not limited to, CRF and CRF analogs.

"Allelic variant" means a variant form of a given gene or gene product. One of skill in the art recognizes that a large number of genes are present in two or more allelic forms in a population and some genes have numerous alleles.

"Antibody", in its various grammatical forms, means immunoglobulin molecules and immunologically active portions of immunoglobulin molecules, i.e., molecules that contain an antigen binding site which specifically binds an antigen. "Purified antibody" means an antibody which has been partially or completely separated from the proteins and naturally-occurring organic molecules with which it is naturally associated. Preferably, the preparation is at least 60% antibody, more preferably at least 75% antibody, more preferably at least 90% antibody, and most preferably at least 99%, by dry weight, antibody.

"Binding affinity" means the propensity for a ligand to interact with a receptor and is inversely related to the dissociation constant for a specific CRF ligand-CRFR interaction. The dissociation constant can be measured directly via standard saturation, competition, or kinetics binding techniques or indirectly via pharmacological techniques involving functional assays and endpoints.

"Chimeric antibody" means an antibody that contains structural elements from two or more different antibody molecules, i.e., from different animal species. Chimeric antibodies include, but are not limited to, antibodies known as "humanized antibodies" which include, but are not limited

to, chimeric antibodies generated by the technique known as complementarity determining region grafting.

"CRF" means corticotropin releasing factor which is the same as corticotropin releasing hormone (CRH). Exemplary CRF peptides include r/h CRF and ovine CRF (see U.S. Pat. No 4,415,558), and the like.

"CRF analog" means substances which act as ligands of CRFRs. Suitable CRF analogs can be obtained from a variety of vertebrate species and include, but are not limited to, substances such as sauvagine (see, e.g., U.S. Pat. No. 4,605,642), urotensin (see, e.g., U.S. Pat. Nos. 4,908,352; and 4,533,654), mouse urocortin II (SEQ ID NO: 43), human urocortin-related peptide (SEQ ID NO:44) (Reyes, T M. et al., *Proc. Nat'l Acad Sci* 98:2843-2848 (2001)), urocortin (see, e.g., WO 97/00063) and the CRF analogs described in U.S. Pat. Nos: 4,415,558, 4,489,163, 4,594,329; 4,605,642; 5,109,111; 5,235,036; 5,278,146, 5,439,885; 5,493,006; 5,663,292; 5,824,771; 5,844,074; and 5,869,450. Each of which is incorporated herein by reference. Preferred CRF analogs are sauvagine, urocortin, urocortin-related peptide, urocortin-II and urotensin.

"CRFR agonist" means a compound or molecule which has the ability to activate CRF₁R or CRF₂R, or both. Activation of CRFRs can be measured as described hereinafter.

"CRFR" means CRF₁R or CRF₂R.

"CRF₁R" means any isoforms of CRF₁R from any animal species. The CRF₁R has previously been referred to as CRF-RA, PC-CRF, CRF, (Perrin, M.H., et al. *Endocrinology* 133:3058-3061 (1993), Chen, R., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8967-8971 (1993), Chang, C-P. et al., *Neuron* 11:1187-1195 (1993), Kishimoto, T., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92 1108-1112 (1995) and, Vita, N. et al., *FEBS Lett.* 335: 1-5 (1993)) or the CRH receptor.

The definition of CRF₁R includes, but is not limited to, those receptors for which the cDNA or genomic sequence encoding the receptor has been deposited in a sequence database. These sequences include Accession Nos.: X72304, E11431, L23332, I92584, T37068, T28968, Q81952, L23333, NM_004382, AF180301, T28970, L25438, L24096, I92586, Q81954, AH006791, NM_007762, X72305, AF054582, Y14036, AF229359, AF229361, AB055434 and L41563. The nucleotide and protein sequences of these receptors are available from GenBank or Derwent and for convenience representative sequences are given in the sequence listing herein.

117
110

"CRF₂R" means any isoform of CRF₂R from any animal species. CRF₂R has also been referred to as HM-CRF, CRF-RB, (Kishimoto, T., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:1108-1112 (1995) and Perrin, M. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:2969-2973 (1995)).

The definition of CRF₂R receptor includes, but is not limited to, those receptors for which the DNA sequence encoding the receptor has been deposited in a sequence database. These sequences include Accession Nos.: U34587, E12752, NM_001883, T12247, T66508, AF011406, AF019381, U16253, T12244, T28972, U17858, NM_009953, Y14037 and AF229360. The nucleotide and protein sequences of these receptors are available from GenBank or Derwent and for convenience, representative sequences are given in the sequence listing herein.

The term "CRFR" also includes truncated and/or mutated proteins wherein regions of the receptor molecule not required for ligand binding or signaling have been deleted or modified. For example one of skill in the art will recognize that a CRFR with one or more conservative changes in the primary amino acid sequence would be useful in the present invention. It is known in the art that substitution of certain amino acids with different amino acids with similar structure or properties (conservative substitutions) can result in a silent change, i.e., a change that does not significantly alter function. Conservative substitutes are well known in the art. For example, it is known that GPCRs can tolerate substitutions of amino acid residues in the transmembrane alpha-helices, which are oriented toward lipid, with other hydrophobic amino acids, and remain functional. CRF₁Rs differing from a naturally occurring sequence by truncations and/or mutations such as conservative amino acid substitutions are also included in the definition of CRF₁R. CRF₂R differing from a naturally occurring sequence by truncations and/or mutations such as conservative amino acid substitutions are also included in the definition of CRF₂R.

One of skill in the art would also recognize that CRFRs from a species other than those listed above, particularly mammalian species, would be useful in the present invention. One of skill in the art would further recognize that by using probes from the known CRFR species' sequences, cDNA or genomic sequences homologous to the known sequence could be obtained from the same or alternate species by known cloning methods. Such CRF₁R are also included in the definition of CRF₁R and such CRF₂R are also included in the definition of CRF₂R.

In addition, one of skill in the art would recognize that functional allelic variants or functional splice variants of CRFRs might be present in a particular species and that these variants would have utility in the present invention. Splice variants of CRFRs are known, for example U.S. Pat. Nos. 5,888,811; 5,786,203; and 5,728,545, each of which is incorporated herein by reference.

112
111

Such CRF₁R variants are also included in the definition of CRF₁R and such CRF₂R variants are also included in the definition of CRF₂R.

Fusions of a CRF₁R or CRF₂R polypeptide, or a CRF₁R or CRF₂R polypeptide fragment to a non-CRFR polypeptide are referred to as CRFR fusion proteins. Using known methods, one of skill in the art would be able to make fusion proteins of a CRF₁R or a CRF₂R that, while different from native CRF₁R and CRF₂R, would remain useful in the present invention. For example the non-CRFR polypeptide may be a signal (or leader) polypeptide sequence which co-translationally or post-translationally directs transfer of the protein from its site of synthesis to another site (e.g., the yeast α -factor leader). Or the non-CRFR polypeptide may be added to facilitate purification or identification of the CRFR (e.g., poly-His, or Flag peptide). CRF₁R fusion proteins are also included within the definition of CRF₁R and CRF₂R fusion proteins are also included within the definition of CRF₂R.

"CRF₂R signal transduction pathway" means any signaling pathway (e.g., cAMP, MAP kinase) or combination of signaling pathways that are modulated by the binding of endogenous or exogenous ligands to CRF₂R.

"Functional CRFRs" refers to CRFRs, which bind CRF or a CRF analog *in vivo* or *in vitro* and are activated as a result of ligand binding.

"Fusion gene" means two or more DNA coding sequences operably associated so as to encode one hybrid protein. A "fusion protein" is the protein product of a fusion gene.

"Inhibit" means to partially or completely block a particular process or activity. For example, a compound inhibits skeletal muscle atrophy if it either completely or partially prevents muscle atrophy.

As used herein, two DNA sequences are said to be "operably associated" if the nature of the linkage between the two DNA sequences does not (1) result in the introduction of a frame-shift mutation, (2) interfere with the ability of a promoter region to direct the transcription of the coding sequences, or (3) interfere with the ability of the corresponding RNA transcript to be translated into a protein. For example, a coding sequence and regulatory sequences are operably associated when they are covalently linked in such a way as to place the transcription of the coding sequence under the influence or control of the regulatory sequences. Thus, a promoter region is operably associated with a coding sequence when the promoter region is capable of effecting transcription of that DNA sequence such that the resulting transcript is capable of being translated into the desired protein or polypeptide.

H3
112

"Percent identity" means the percentage of nucleotides or amino acids that two sequences have in common, calculated as follows. To calculate the percent identity for a specific sequence (the query), the relevant part of the query sequence is compared to a reference sequence using the BestFit comparison computer program, Wisconsin Package, Version 10.1, available from the Genetics Computer Group, Inc. This program uses the algorithm of Smith and Waterman, *Advances in Applied Mathematics*, Issue 2: 482-489 (1981). Percent identity is calculated with the following default parameters for the BestFit program: the scoring matrix is *blosum62.cmp*, the gap creation penalty is 8 and the gap extension penalty is 2. When comparing a sequence to the reference sequence, the relevant part of the query sequence is that which is derived from a CRFR sequence. For example, where the query is a CRFR/purification tag fusion protein, only the CRFR polypeptide portion of the sequence is aligned to calculate the percent identity score.

"Polypeptide" means any chain of amino acids, regardless of length or post-translational modification (e.g., phosphorylation or glycosylation).

"Promoter" means a DNA sequence which controls the initiation of transcription and the rate of transcription from a gene or coding region.

"Prophylactic treatment" means preventive treatment of a subject, not currently exhibiting signs of skeletal muscle atrophy, in order to completely or partially block the occurrence of skeletal muscle atrophy. One of skill in the art would recognize that certain individuals are at risk for skeletal muscle atrophy as discussed in the background section herein. Furthermore, one of skill in the art would recognize that if the biochemical changes leading to skeletal muscle atrophy are appropriately regulated, that the occurrence of atrophy would be prevented or reduced in at-risk individuals. For example, muscular dystrophy patients beginning treatment with corticosteroids are at risk for developing skeletal muscle atrophy indicating that prophylactic treatment of such patients would be appropriate.

"Regulate" in all its grammatical forms, means to increase, decrease or maintain, e.g., to regulate skeletal muscle mass or function means to increase, decrease or maintain the level of skeletal muscle mass or function.

"Regulation of skeletal muscle mass or function" includes regulation of skeletal muscle mass, skeletal muscle function or both.

"Regulatory element" means a DNA sequence that is capable of controlling the level of transcription from an operably associated DNA sequence. Included within this definition of

regulatory element are promoters and enhancers. E.g., a CRFR gene regulatory element is a DNA sequence capable of controlling the level of transcription from the CRFR gene.

"Reporter gene" means a coding sequence whose product can be detected, preferably quantitatively, wherein the reporter gene is operably associated with a heterologous promoter or enhancer element which is responsive to a signal which is to be measured. The promoter or enhancer element in this context is referred to herein as a "responsive element".

"Selective agonist" means that the agonist has significantly greater activity toward a certain receptor(s) compared with other receptors, not that it is completely inactive with regard to other receptors.

"Skeletal muscle hypertrophy" means an increase in skeletal muscle mass or skeletal muscle function or both.

"Skeletal muscle atrophy" means the same as "muscle wasting" and means a decrease in skeletal muscle mass or skeletal muscle function or both.

"Splice variant" means a mRNA or protein which results from alternative exon usage. One of skill in the art recognizes that, depending on cell type, or even within a single cell type, a mRNA may be expressed in a different form, as a splice variant, and thus the translated protein will be different depending upon the mRNA that is expressed.

A "therapeutically effective amount" of a substance is an amount capable of producing a medically desirable result in a treated patient, e.g., decreases skeletal muscle atrophy, increases skeletal muscle mass or increases skeletal muscle function, with an acceptable benefit: risk ratio, in a human or non-human mammal.

"Therapeutic treatment" means treatment of a subject in which an increase in muscle mass or muscle function is desirable. For example, treatment of a subject currently exhibiting signs of skeletal muscle atrophy in order to partially or completely reverse the skeletal muscle atrophy that has occurred or to completely or partially block the occurrence of further skeletal muscle atrophy would be therapeutic treatment of that subject. The term "therapeutic treatment" also includes, for example, treatment of a subject not exhibiting signs of skeletal muscle atrophy to induce skeletal muscle hypertrophy, e.g., treatment of a livestock animal to increase muscle mass.

The term "treatment" means prophylactic or therapeutic treatment.

Unless otherwise defined, all technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the arts of protein chemistry, pharmacology, or molecular biology. The methods, materials and examples described herein are

115
114

not intended to be limiting. Other methods and materials similar or equivalent to those described herein can be used in the practice or testing of the present invention

II. The Role of CRFRs in Regulation of Skeletal Muscle Mass

One of skill in the art would recognize the utility of the present invention given the information in the prior art and the teachings below. The results described herein demonstrate that administration of a CRF receptor agonist which activates both CRF₁R and CRF₂R (non-selective CRFR agonist) blocks and/or inhibits the skeletal muscle atrophy inducing effect of denervation, disuse or dexamethasone treatment in models of skeletal muscle atrophy. In addition, data show that CRFR agonists do not show this anti-atrophy effect in mice in which CRF₂R has been knocked out. Also, in rats in which the CRF₁R mediated HPA axis has been interrupted by removal of the adrenal glands (surgical adrenalectomy), treatment of these animals with the non-selective CRFR agonists shows an anti-atrophy effect, indicating that the CRF₂R mediates the anti-atrophy effects. Furthermore, results demonstrate that administration of a non-selective CRFR agonist show a hypertrophy inducing effect. Together, these data demonstrate the modulatory role of the CRF₂R in the process of skeletal muscle atrophy. The specific role of CRFRs *in vivo* was investigated using the pharmacological agents, sauvagine (Bachem Biosciences, Inc. King of Prussia, PA) and urocortin (Bachem Biosciences, Inc.), which are selective agonists for CRFRs in various models of skeletal muscle atrophy, described hereinafter. These agents have been well characterized and are described in the scientific literature.

Figures 1-7 and 9 show the results of experiments demonstrating that administration of selective agonists of CRFRs results in statistically significant inhibition of skeletal muscle atrophy. Figure 8 shows that the anti-atrophy effect of the CRFR agonist, sauvagine, is mediated through CRF₂R. CRFR agonists administered twice daily in combination with the phosphodiesterase inhibitor, theophylline, resulted in inhibition of skeletal muscle atrophy in animal models of skeletal muscle atrophy. Theophylline was added to potentiate the duration and magnitude of action of the CRFR agonist therefore resulting in increased efficacy of these compounds. Theophylline administered alone in these atrophy models had no effect, demonstrating that the anti-atrophy effect of the CRFR agonist in combination with theophylline was due to the effect of the CRFR agonist. Furthermore, continuous dosing of the CRFR agonist in the absence of theophylline, via osmotic mini-pump, also resulted in inhibition of skeletal muscle atrophy and/or in skeletal muscle hypertrophy. Statistical significance of the results was determined using ANCOVA (Douglas C.

Montgomery, Design and Analysis of Experiments, John Wiley and Sons, New York (2nd ed. 1984)). Abbreviations used in figures 1-9: g-gram; SEM-standard error of the mean

Specifically, Figure 1 (FIG. 1.) shows that sauvagine inhibits denervation-induced atrophy of the medial gastrocnemius muscle in a mouse sciatic nerve denervation atrophy model. Legend: A - physiological saline (control); B - sauvagine (0.01 mg/kg) + theophylline; C - sauvagine (0.03 mg/kg) + theophylline; D - sauvagine (0.1 mg/kg) + theophylline; E - sauvagine (1.0 mg/kg) + theophylline; * - $p \leq 0.05$ compared to saline. Following denervation of the right sciatic nerve, male mice were injected subcutaneously in the midscapular region twice daily with sauvagine, at the doses indicated above or vehicle control (physiological saline) for nine days. Sauvagine was co-administered with 30 mg/kg theophylline. On day nine, the medial gastrocnemius muscle was removed and weighed to determine the degree of atrophy.

Figure 2 (FIG. 2.) shows that sauvagine inhibits denervation-induced atrophy of the tibialis anterior muscle in a mouse sciatic nerve denervation atrophy model. Legend: A - water (control); B - sauvagine (0.1 mg/kg/d); C - sauvagine (0.3 mg/kg/d); D - sauvagine (1.0 mg/kg/d); * - $p \leq 0.05$ compared to water. Following denervation of the right sciatic nerve, male mice were dosed with either sauvagine or vehicle control (physiological saline) by continuous infusion using an Alzet osmotic minipump at 5 μ l/hr until the end of the experimental period (without additional theophylline). The daily delivered dose of sauvagine is indicated above. Minipump implantation was performed at the time of sciatic nerve denervation. On day nine the tibialis anterior muscle was removed and weighed to determine the degree of atrophy.

Figure 3 (FIG. 3.) demonstrates that sauvagine inhibits glucocorticoid-induced muscle atrophy of the tibialis anterior (FIG 3A) and medial gastrocnemius muscles (FIG 3B) in the mouse glucocorticoid-induced atrophy model. Legend: A - water only with no dexamethasone included in drinking water (non-atrophied control); B - water + dexamethasone (atrophied control); C - sauvagine (0.1 mg/kg/d) + dexamethasone; D - sauvagine (0.3 mg/kg/d) + dexamethasone; E - sauvagine (1.0 mg/kg/d) + dexamethasone; * - $p \leq 0.05$ compared to water, # - $p \leq 0.05$ compared to water + dexamethasone. Following the addition of the glucocorticoid, dexamethasone, to the drinking water (1.2 mg/kg/d), male mice were dosed with the above indicated agents or vehicle control (physiological saline) by continuous infusion using an Alzet osmotic minipump at 5 μ l/hr until the end of the experimental period (without additional theophylline). The daily delivered dose of sauvagine is as indicated above. Minipump implantation was performed at the time of initiation of dexamethasone exposure. Nine days following the initiation of dosing sauvagine, the medial

511
911

gastrocnemius and tibialis anterior muscles were removed and weighed to determine the degree of atrophy.

Figure 4 (FIG. 4.) demonstrates that sauvagine inhibits disuse-induced atrophy of the tibialis anterior (FIG 4A) and medial gastrocnemius (FIG 4B) muscles. In addition, statistically significant hypertrophy of the medial gastrocnemius and tibialis anterior muscles of the non-casted leg was also observed with sauvagine treatment. Legend: A - physiological saline (control); B - theophylline; C - sauvagine (0.03 mg/kg) + theophylline; D - sauvagine (0.1 mg/kg) + theophylline; E - sauvagine (0.3 mg/kg) + theophylline; * - $p \leq 0.05$ compared to saline. Following casting of the right hind leg, male mice were injected subcutaneously in the midscapular region twice daily, with sauvagine or vehicle control (physiological saline) for ten days at the daily delivered dose indicated. Sauvagine was co-administered with twice daily intra-peritoneal dosing of the phosphodiesterase inhibitor theophylline (30 mg/kg). On day ten, the medial gastrocnemius and tibialis anterior muscles were removed and weighed to determine the degree of atrophy.

Figure 5 (FIG. 5.) demonstrates that both sauvagine and urocortin inhibit denervation-induced atrophy of the tibialis anterior muscle, in a mouse sciatic nerve denervation atrophy model. In addition, hypertrophy of the non-denervated leg was observed with urocortin treatment. Legend A - water (control); B - sauvagine (1 mg/kg/d); C - urocortin (1.0 mg/kg/d); * - $p \leq 0.05$ compared to water. Following denervation of the right sciatic nerve, male mice were dosed with the above indicated agents or vehicle control (physiological saline) by continuous infusion using an Alzet osmotic minipump at 5 μ l/hr until the end of the experimental period (without additional theophylline). The daily delivered dose of the agents is indicated above. Minipump implantation was performed at the same time as the sciatic nerve denervation. On day nine the tibialis anterior muscle was removed and weighed to determine the degree of atrophy.

Figure 6 (FIG. 6.) demonstrates that urocortin inhibits disuse-induced atrophy of the tibialis anterior (FIG 6A) and medial gastrocnemius (FIG 6B) muscles in the mouse leg casting disuse atrophy model. Legend: A - physiological saline (control); B - urocortin (0.3 mg/kg) + theophylline; * - $p \leq 0.05$ compared to saline. Following casting of the right hind leg, male mice were injected subcutaneously in the midscapular region twice daily, with urocortin or vehicle control (physiological saline) for ten days. Urocortin was administered at the doses indicated in the description of Figures 6A and 6B. Urocortin was co-administered with twice daily intra-peritoneal dosing of the phosphodiesterase inhibitor theophylline (30 mg/kg). On day ten, the medial

118
117

gastrocnemius and tibialis anterior muscles were removed and weighed to determine the degree of atrophy.

Figure 7 (FIG. 7) demonstrates that sauvagine inhibits denervation-induced atrophy of the tibialis anterior (FIG. 7A), EDL (FIG. 7B), soleus (FIG. 7C), medial gastrocnemius (FIG. 7D), and plantaris muscles. In addition, sauvagine caused statistically significant hypertrophy of the non-denervated EDL muscle (FIG. 7B). Legend: A - physiological saline (control); B - sauvagine (0.003 mg/kg) + theophylline; C - sauvagine (0.01 mg/kg) + theophylline; D - sauvagine (0.03 mg/kg) + theophylline; # - $p \leq 0.05$ compared to corresponding controls. Following denervation of the right sciatic nerve, male adrenalectomized rats (adrenalectomized rats were used to remove the skeletal muscle atrophy-inducing effects of activation of the HPA axis via agonists of the CRF₁R) were injected subcutaneously in the midscapular region twice daily, with either sauvagine or vehicle control (physiological saline) for nine days at the doses shown above. Sauvagine was co-administered with 30 mg/kg theophylline. On day nine, the tibialis anterior, extensor digitorum longus (EDL), soleus, medial gastrocnemius, and plantaris muscles were removed and weighed to determine the degree of atrophy.

Figure 8 (FIG. 8.) demonstrates that sauvagine inhibits the atrophy observed in wild-type but not CRF₂R knockout mice in the mouse sciatic nerve denervation atrophy model. Legend: A-C - wild-type mice; D-F - CRF₂R knockout mice. A and D - water (control); B and E - sauvagine (0.3 mg/kg/d); C and F - sauvagine (1.0 mg/kg/d); * - $p \leq 0.05$ compared to saline. Following denervation of the right sciatic nerve, female wild-type and CRF₂R knockout mice were dosed with sauvagine or vehicle control by continuous infusion using an Alzet osmotic minipump at 5 μ l/hr for nine days at the daily delivered dose indicated above. On day nine, the tibialis anterior muscle was removed and weighed to determine the degree of atrophy.

Figure 9 (FIG. 9) demonstrates that sauvagine inhibits disuse-induced loss of EDL and soleus muscle mass (FIG. 9A) and inhibits loss of muscle function as assessed by measurement of absolute force (FIG. 9B) in the mouse leg casting disuse atrophy model. Legend: A - non casted muscle control; B - casted muscle, saline control; C - casted muscle, sauvagine (0.3 mg/kg) + theophylline (30 mg/kg); * - $p \leq 0.05$ compared to saline. Following casting of the right hind leg, male mice were injected subcutaneously in the midscapular region twice daily, with either sauvagine or vehicle control (physiological saline) for ten days at the doses indicated above. Sauvagine was co-administered 30 mg/kg theophylline. On day ten, the EDL and soleus muscles were removed and absolute force and mass measurements taken to determine the degree of atrophy.

119
118

III. Preparation of CRFRs, CRF or CRF Analogs, or Cell Lines Expressing CRFRs

CRF₁R, CRF₂R, CRF and CRF analogs can be prepared for a variety of uses, including, but not limited to, the generation of antibodies, use as reagents in the screening assays of the present invention, and use as pharmaceutical reagents for the treatment of skeletal muscle atrophy. It will be clear to one of skill in the art that, for certain embodiments of the invention, purified polypeptides will be most useful, while for other embodiments cell lines expressing the polypeptides will be most useful. For example, in situations where it is important to retain the structural and functional characteristics of the CRFR, e.g., in a screening method to identify candidate compounds which activate CRFRs, it is desirable to use cells which express functional CRFRs.

Because CRF and CRF analogs are short polypeptides, the skilled artisan will recognize that these polypeptides will be most conveniently provided by direct synthesis, rather than by recombinant means, using techniques well known in the art. In addition, many of these molecules are commercially available.

Where the source of CRFRs is a cell line expressing the polypeptide, the cells may, for example, endogenously express CRFR, have been stimulated to increase endogenous CRFR expression or have been genetically engineered to express a CRFR. Methods for determining whether a cell line expresses a polypeptide of interest are known in the art, for example, detection of the polypeptide with an appropriate antibody, use of a DNA probe to detect mRNA encoding the protein (e.g., northern blot or PCR techniques), or measuring binding of an agent selective for the polypeptide of interest (e.g., a radiolabeled selective agonist).

The use of recombinant DNA technology in the preparation of CRF₁R, CRF₂R, or of cell lines expressing these polypeptides is particularly contemplated. Such recombinant methods are well known in the art. To express recombinant CRF₁R or CRF₂R, an expression vector that comprises a nucleic acid which encodes the polypeptide of interest under the control of one or more regulatory elements, is prepared. Genomic or cDNA sequences encoding CRF₁R and CRF₂R from several species have been described and are readily available from the GenBank database (available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) or Derwent database (available at <http://www.derwent.co.uk/geneseq/index.html>) as well as in the sequence listing for this application. The accession numbers for CRF₁R and CRF₂R sequences and corresponding SEQ ID NOS. are shown in Table I. Using this publicly available sequence information, one means of isolating a nucleic acid molecule encoding a CRF₁R or CRF₂R is to screen a genomic DNA or

120
119

cDNA library with a natural or artificially synthesized DNA probe, using methods well known in the art, e.g., by PCR amplification of the sequence from an appropriate library. Another method is to use oligonucleotide primers specific for the receptor of interest to PCR amplify the cDNA directly from mRNA isolated from a particular tissue (such as skeletal muscle). Such isolated mRNA is commercially available. One of skill in the art would also recognize that by using nucleic acid probes corresponding to portions of the known CRFR receptor sequences the homologous cDNAs or genomic sequences from other species can be obtained using known methods. Particularly useful in the methods of the present invention are CRFR receptors from the species including, but not limited to, human, mouse, rat, pig, monkey, chimpanzee, marmoset, dog, cow, sheep, cat, chicken and turkey. By methods well known in the art, the isolated nucleic acid molecule encoding the CRFR of interest is then ligated into a suitable expression vector. The expression vector, thus prepared, is expressed in a host cell and the host cells expressing the receptor are used directly in a screening assay or the receptor is isolated from the host cells expressing the receptor and the isolated receptor is used in a screening assay.

The host-expression vector systems that may be used for purposes of the invention include, but are not limited to: microorganisms such as bacteria (e.g., *E. coli*, *B. subtilis*) transformed with recombinant bacteriophage DNA, plasmid DNA, or cosmid DNA expression vectors containing CRFR nucleotide sequences; yeast (e.g., *Saccharomyces*, *Pichia*) transformed with recombinant yeast expression vectors containing CRFR nucleotide sequences; insect cell systems infected with recombinant virus expression vectors (e.g., baculovirus) containing CRFR nucleotide sequences; plant cell systems infected with recombinant virus expression vectors (e.g., cauliflower mosaic virus, tobacco mosaic virus) or transformed with recombinant plasmid expression vectors (e.g., Ti plasmid) containing CRFR nucleotide sequences; or mammalian cell systems (e.g., COS, CHO, HEK293, NIH3T3) harboring recombinant expression constructs containing promoters derived from the genome of mammalian cells (e.g., metallothionein promoter) or from mammalian viruses (e.g., retrovirus LTR) and also containing CRFR nucleotide sequences.

The host cell is used to produce the polypeptide of interest. Because the CRFR is a membrane bound molecule, it is purified from the host cell membranes or the CRFR is utilized while anchored in the cell membrane, i.e., whole cells or membrane fractions of cells are used. Purification or enrichment of the CRFRs from such expression systems is accomplished using appropriate detergents and lipid micelles by methods well known to those skilled in the art.

121
120

In bacterial systems, a number of expression vectors may be advantageously selected depending upon the use intended for the gene product being expressed. For example, when a large quantity of such protein is produced for the generation of antibodies to CRFRs, vectors which direct the expression of high levels of protein products are desirable. One skilled in the art is able to generate such vector constructs and purify the proteins by a variety of methodologies including selective purification technologies such as fusion protein selective columns and antibody columns, and non-selective purification technologies.

In an insect protein expression system, the baculovirus *A. californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV), is used as a vector to express foreign genes in *S. frugiperda* cells. In this case, CRFR nucleotide sequences are cloned into non-essential regions of the virus and placed under the control of an AcNPV promoter. The recombinant viruses are then used to infect cells in which the inserted gene is expressed and the protein is purified by one of many techniques known to one skilled in the art.

In mammalian host cells, a number of viral-based expression systems may be utilized. Utilization of these expression systems often requires the creation of specific initiation signals in the vectors for efficient translation of the inserted nucleotide sequences. This is particularly important if a portion of the CRFR gene is used which does not contain the endogenous initiation signal. The placement of this initiation signal, in frame with the coding region of the inserted nucleotide sequence, as well as the addition of transcription and translation enhancing elements and the purification of the recombinant protein, are achieved by one of many methodologies known to one skilled in the art. Also important in mammalian host cells is the selection of an appropriate cell type which is capable of the necessary post translational modifications of the recombinant protein. Such modifications, for example, cleavage, phosphorylation, glycosylation, etc., require the selection of the appropriate host cell which contains the modifying enzymes. Such host cells include, but are not limited to, CHO, HEK293, NIH3T3, COS, etc. and are known by those skilled in the art.

For long term, high expression of recombinant proteins, stable expression is preferred. For example, cell lines that stably express CRFRs may be engineered. One of skill in the art, following known methods such as electroporation, calcium phosphate transfection, or liposome-mediated transfection, can generate a cell line that stably expresses CRFRs. This is usually accomplished by transfecting cells using expression vectors which contain appropriate expression control elements (e.g., promoter sequences, enhancer sequences, transcriptional termination sequences,

122
121

polyadenylation sites, translational start sites, etc.), a selectable marker, and the gene of interest. The selectable marker may either be contained within the same vector, as the gene of interest, or on a separate vector, which is co-transfected with the CRFR sequence containing vector. The selectable marker in the expression vector may confer resistance to the selection and allows cells to stably integrate the vector into their chromosomes and to grow to form foci which in turn can be cloned and expanded into cell lines. Alternatively, the expression vector may allow selection of the cell expressing the selectable marker utilizing a physical attribute of the marker, i.e., expression of Green Fluorescent Protein (GFP) allows for selection of cells expressing the marker using fluorescence activated cell sorting (FACS) analysis.

One of skill in the art is able to select an appropriate cell type for transfection in order to allow for selection of cells into which the gene of interest has been successfully integrated. For example, where the selectable marker is herpes simplex virus thymidine kinase, hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase or adenine phosphoribosyltransferase, the appropriate cell type would be tk-, hgprrt- or aprrt- cells, respectively. Or, normal cells can be used where the selectable marker is dhfr, gpt, neo or hygromycin which confer resistance to methotrexate, mycophenolic acid, G-418 or hygromycin, respectively. Such recombinant cell lines are useful for identification of candidate compounds that affect the CRFR activity.

IV. Preparation of CRFR Antibodies

Antibodies that selectively recognize one or more epitopes of a CRFR are also encompassed by the invention. Such antibodies include, e.g., polyclonal antibodies, monoclonal antibodies, chimeric antibodies, human antibodies, single chain antibodies, Fab fragments, F(ab')₂ fragments, molecules produced using a Fab expression library, human antibodies (polyclonal or monoclonal) produced in transgenic mice and epitope binding fragments of any of the above. For therapeutic uses, chimeric or human antibodies are preferred; human antibodies are most preferred.

The antibodies can be utilized in conjunction with the compound screening schemes described herein for the evaluation of test compounds, e.g., for immobilization of CRFR polypeptides or such antibodies can be used in conjunction with gene therapy techniques to evaluate, for example, the expression of CRFRs either in cells or directly in patient tissues in which these genes have been introduced. In addition, antibodies of the present invention are useful in the treatment of skeletal muscle atrophy. Antibodies selective for the CRFR can be screened by the methods of the present invention to identify a subset of the antibodies that are CRFR agonists. In

123
122

addition, anti-idiotypic antibodies generated against antibodies specific for CRF or a CRF analog may be useful as CRFR agonists and like anti-CRFR antibodies may be screened for their ability to activate the CRFR by methods of the present invention.

For the production of antibodies, a variety of host animals may be immunized by injection with CRFR, CRF or a CRF analog, anti-CRF antibody, anti-CRF analog antibody, or immunogenic fragments thereof by methods well known in the art. For preparation of an anti-idiotypic antibody the immunogen is an anti-CRF antibody or anti-CRF analog antibody. Production of anti-idiotypic antibodies is described, for example, in US Patent No. 4,699,880, incorporated herein by reference. Suitable host animals include, but are not limited to, rabbits, mice, goats, sheep and horses. Immunization techniques are well known in the art. Polyclonal antibodies can be purified from the serum of the immunized animals, or monoclonal antibodies can be generated by methods that are well known in the art. These techniques include, but are not limited to, the well-known hybridoma techniques of Kohler and Milstein, human B-cell hybridoma techniques, and the EBV hybridoma technology. Monoclonal antibodies may be of any immunoglobulin class, including IgG, IgE, IgM, IgA, and IgD containing either kappa or lambda light chains.

Because of the immunogenicity of non-human antibodies in humans, chimeric antibodies are preferred to non-human antibodies when used for therapeutic treatment of human patients. Techniques of producing and using chimeric antibodies are known in the art, and are described in, for example, U.S. Pat. Nos. 5,807,715, 4,816,397; 4,816,567; 5,530,101; 5,585,089; 5,693,761, 5,693,762; 6,180,370; and 5,824,307, all incorporated herein by reference.

Completely human antibodies are particularly desirable for therapeutic treatment of human patients because they are less immunogenic than non-human antibodies or chimeric antibodies. Such antibodies can be produced using transgenic mice which are substantially incapable of expressing endogenous immunoglobulin heavy and light chain genes, but which can express human heavy and light chain genes. The transgenic mice are immunized in the normal fashion with a selected antigen, e.g., all or a portion of CRF₂R. Monoclonal antibodies directed against the antigen are obtained using conventional hybridoma technology from these immunized transgenic mice. This technology is described in detail in U.S. Pat. Nos. 5,874,299; 5,877,397; 5,569,825; 5,661,016; 5,770,429; and 6,075,181, all incorporated herein by reference. As an alternative to obtaining human immunoglobulins directly from the culture of the hybridoma cells, the hybridoma cells can be used as a source of rearranged heavy chain and light chain loci for subsequent

124
123

expression or genetic manipulation. Isolation of genes from such antibody-producing cells is straightforward since high levels of the appropriate mRNAs are available. The recovered rearranged loci can be manipulated as desired. For example, the constant region can be eliminated or exchanged for that of a different isotype or the variable regions can be linked to encode single chain Fv regions. Such techniques are described in WO 96/33735 and WO 96/34096, all incorporated herein by reference.

V. Selection of Test Compounds

Compounds that can be screened in accordance with the assays of the invention include but are not limited to, libraries of known compounds, including natural products, such as plant or animal extracts, synthetic chemicals, biologically active materials including proteins, peptides such as soluble peptides, including but not limited to members of random peptide libraries and combinatorial chemistry derived molecular library made of D- or L- configuration amino acids, phosphopeptides (including, but not limited to, members of random or partially degenerate, directed phosphopeptide libraries), antibodies (including, but not limited to, polyclonal, monoclonal, chimeric, human, anti-idiotypic or single chain antibodies, and Fab, F(ab')₂ and Fab expression library fragments, and epitope-binding fragments thereof), organic and inorganic molecules.

In addition to the more traditional sources of test compounds, computer modeling and searching technologies permit the rational selection of test compounds by utilizing structural information from the ligand binding site of CRFR or from already identified agonists of CRFRs. Such rational selection of test compounds can decrease the number of test compounds that must be screened in order to identify a candidate therapeutic compound. CRFRs are GPCRs, and thus knowledge of the CRFR protein sequence allows for the generation of a model of its binding site that can be used to screen for potential ligands. This process can be accomplished in several manners well known in the art. Briefly, the most robust approach involves generating a sequence alignment of the CRFR sequence to a template (derived from the bacterio-rhodopsin or rhodopsin crystal structures or other GPCR model), conversion of the amino acid structures and refining the model by molecular mechanics and visual examination. If a strong sequence alignment cannot be obtained then a model may also be generated by building models of the hydrophobic helices. These are then fitted together by rotating and translating each helix relative to the others starting from the general layout of the known rhodopsin structures. Mutational data that point towards residue-residue contacts may also be used to position the helices relative to each other so that these contacts

125
124

are achieved. During this process, docking of the known ligands into the binding site cavity within the helices may also be used to help position the helices by developing interactions that would stabilize the binding of the ligand. The model may be completed by refinement using molecular mechanics and loop building of the intracellular and extracellular loops using standard homology modeling techniques. General information regarding GPCR structure and modeling can be found in Schoneberg, T. et. al., *Molecular and Cellular Endocrinology*, 151:181-193 (1999), Flower, D., *Biochimica et Biophysica Acta*, 1422:207-234 (1999), and Sexton, P.M., *Current Opinion in Drug Discovery and Development*, 2(5):440-448 (1999).

Once the model is completed, it can be used in conjunction with one of several existing computer programs to narrow the number of compounds to be screened by the screening methods of the present invention. The most general of these is the DOCK program (UCSF Molecular Design Institute, 533 Parnassus Ave, U-64, Box 0446, San Francisco, California 94143-0446). In several of its variants it can screen databases of commercial and/or proprietary compounds for steric fit and rough electrostatic complementarity to the binding site. It has frequently been found that molecules that score well within DOCK have a better chance of being ligands. Another program that can be used is FLEXX (Tripos Inc., 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144-2913 (www.tripos.com)). This program, being significantly slower, is usually restricted to searches through smaller databases of compounds. The scoring scheme within FLEXX is more detailed and usually gives a better estimate of binding ability than does DOCK. FLEXX is best used to confirm DOCK suggestions, or to examine libraries of compounds that are generated combinatorially from known ligands or templates.

VI. Screening Assays to Identify Candidate Compounds for the Regulation of Skeletal Muscle Mass or Function

The finding that CRF₂R plays a role in regulating skeletal muscle atrophy enables various methods of screening one or more test compounds to identify candidate compounds that ultimately may be used for prophylactic or therapeutic treatment of skeletal muscle atrophy. This invention provides methods for screening test compounds for their ability to bind to CRF₂R, activate CRF₂R, prolong or augment the agonist-induced activation of CRF₂R or of a CRF₂R signal transduction pathway or increase expression of CRF₂R or CRF genes.

Because CRF₂R and CRF₁R are homologous proteins, it is expected that a certain proportion of agonists for CRF₂R will also function as agonists of CRF₁R. As discussed above,

126
125

activation of CRF₁R induces activation of the HPA axis and concomitant production of corticosteroids. In most cases in which an increase in muscle mass or function is desired, it is not desirable to activate the HPA axis. Therefore, in addition to screening test compounds for their ability to activate CRF₂R, the invention also provides for the use of CRF₂R and CRF₁R to screen for selective agonists of CRF₂R. When selecting candidate compound useful for the treatment of acute or chronic muscle atrophy, which is not related to muscular dystrophy, it is preferable that the candidate compounds be selective for CRF₂R. Preferably the candidate compound exhibits 10-fold selectivity for CRF₂R versus CRF₁R (i.e., 10-fold more active against CRF₂R than against CRF₁R), more preferably 100-fold selectivity and most preferably 1000-fold or greater selectivity. As published studies have demonstrated a benefit of corticosteroid therapy in the treatment of muscular dystrophies, it may be beneficial that a CRF₂R agonist retain some level of CRF₁R agonism when used to treat muscular dystrophies. Thus, for the treatment of muscular dystrophies, a compound of lower selectivity that activates the CRF₂R as well as the CRF₁R, over a similar concentration range, is preferred. Preferably the candidate compound is 100-fold selective for CRF₂R versus CRF₁R, more preferably 10-fold selective and most preferably not selective for CRF₂R versus CRF₁R (i.e., the activity of the candidate compound is substantially similar for CRF₂R and CRF₁R). Also, in this case, it may be more preferable that the compound is full agonist for CRF₂R while being a partial agonist for CRF₁R. Such a candidate compound would therefore have a built-in limit to the maximum degree of cortisol elevation and potential for muscle atrophy, while the anti-atrophy effect mediated through the CRF₂R could be enhanced by increasing the dose. One of skill in the art would be able to readily determine whether a candidate compound is a full or partial agonist of the CRF₁R or CRF₂R using methods known in the art.

For screening for compounds which ultimately will be used to regulate skeletal muscle mass or function through CRF₂R in humans, it is preferred that the initial *in vitro* screen be carried out using a CRF₂R with an amino acid sequence that is greater than 80% identical to SEQ ID NO:10 and more preferably greater than 90% identical to SEQ ID NO:10. More preferably the test compounds will be screened against a human, mouse or rat CRF₂R, with the most preferable being human. For screening for compounds which ultimately will be used to regulate skeletal muscle mass or function through CRF₂R in a non-human species it is preferable to use the CRF₂R from the species in which treatment is contemplated.

For screening to determine the level of activity that a test or candidate compound has toward CRF₁R to determine what, if any, selectivity a candidate compound exhibits for CRF₂R

127
126

versus CRF₁R, it is preferred that the initial screen be carried out using a CRF₁R with an amino acid sequence that is greater than 80% identical to SEQ ID NO.2 and more preferably greater than 90% identical to SEQ ID NO.2. More preferably the test compounds will be screened against a human, mouse or rat CRF₁R, with the most preferable being human. For screening for compounds which ultimately will be used to regulate skeletal muscle mass or function in a non-human species, it is preferable to use the CRF₁R from the species in which treatment is contemplated.

The methods of the present invention are amenable to high throughput applications; however, the use of as few as one test compound in the method is encompassed by the term "screening". Test compounds which bind to CRF₂R, activate CRF₂R, prolong or augment the agonist-induced activation of CRF₂R or of a CRF₂R signal transduction pathway, or increase expression of CRF₂R or CRF genes, as determined by a method of the present invention, are referred to herein as "candidate compounds." Such candidate compounds can be used to regulate skeletal muscle mass or function. However, more typically, this first level of *in vitro* screen provides a means by which to select a narrower range of compounds, i.e., the candidate compounds, which merit further investigation in additional levels of screening. The skilled artisan will recognize that a utility of the present invention is to identify, from a group of one or more test compounds, a subset of compounds which merit further investigation. One of skill in the art will also recognize that the assays of the present invention are useful in ranking the probable usefulness of a particular candidate compound relative to other candidate compounds. For instance, a candidate compound which activates CRF₂R at 1000 nM (but not at 10 nM) is of less interest than one which activates CRF₂R at 10 nM. Using such information the skilled artisan may select a subset of the candidate compounds, identified in the first level of screening, for further investigation. By the way of example only, compounds which activate CRF₂R at concentrations of less than 200 nM might be further tested in an animal model of skeletal muscle atrophy, whereas those above that threshold would not be further tested. The skilled artisan will also recognize that, depending on how the group of test compounds is selected, and how the positives are selected, only a certain proportion of test compounds will be identified as candidate compounds, and that this proportion may be very small.

The assay systems described below may be formulated into kits comprising CRF₂R or cells expressing the CRF₂R which can be packaged in a variety of containers, e.g., vials, tubes microtitre well plates, bottles and the like. Other reagents can be included in separate containers and provided with the kit, e.g., positive control samples, negative control samples, buffers and cell culture media.

128
129

In one embodiment, the invention provides a method for screening one or more test compounds to identify candidate compounds that bind to CRF₂R. Methods of determining binding of a compound to a receptor are well known in the art. Typically, the assays include the steps of incubating a source of the CRF₂R with a labeled compound, known to bind to the receptor, in the presence or absence of a test compound and determining the amount of bound labeled compound. The source of CRF₂R may either be cells expressing CRF₂R or some form of isolated CRF₂R, as described herein. The labeled compound can be CRF or any CRF analog labeled such that it can be measured, preferably quantitatively (e.g., ¹²⁵I-labeled, europium labeled, fluorescein labeled, GFP labeled, ³⁵S-methionine labeled). Such methods of labeling are well known in the art. Test compounds that bind to the CRFR cause a reduction in the amount of labeled ligand bound to the receptor, thereby reducing the signal level compared to that from control samples (absence of test compound). Variations of this technique have been described in which receptor binding in the presence and absence of G-protein uncoupling agents can discriminate agonists from antagonists (e.g., binding in the absence and presence of a guanine nucleotide analog i.e., GpppNHp). See Keen, M., *Radioligand Binding Methods for Membrane Preparations and Intact cells in Receptor Signal Transduction Protocols*, R.A.J. Challis, (ed), Humana Press Inc., Totoway N.J. (1997).

Because it is desirable to discriminate between compounds which bind specifically to CRF₂R, as compared with CRF₁R, the assays described above should be conducted using a cell, or membrane from a cell, which expresses only CRF₂R or the assays can be conducted with a recombinant source of CRF₂R. Cells expressing both forms of CRFR may be modified using homologous recombination to inactivate or otherwise disable the CRF₁R gene. Alternatively, if the source of CRFR contains more than one CRFR type, the background signal produced by the receptor which is not of interest must be subtracted from the signal obtained in the assay. The background response can be determined by a number of methods, including elimination of the signal from the CRFR which is not of interest by use of antisense, antibodies or selective antagonists. Known antagonists of CRFRs include antalarmin (CRF₁R selective), antisauvagine-30 (CRF₂R selective) and astressin (nonselective for CRF₁R / CRF₂R).

In another embodiment, the invention provides methods for screening test compounds to identify candidate compounds which activate CRF₂R and/or CRF₁R. Typically, the assays are cell-based; however, cell-free assays are known which are able to differentiate agonist and antagonist binding as described above. Cell-based assays include the steps of contacting cells which express

129
128

CRF₁R or CRF₂R with a test compound or control and measuring activation of the CRFR by measuring the expression or activity of components of the CRFR signal transduction pathways.

As described in the background section above, CRFRs appear to couple through several different pathways including G_{αs}, G_{αq} or G_{αi}, depending upon the cell type. It is thought that agonist activation of CRFR allows the receptor to signal via any of these pathways, provided that the necessary pathway components are present in the particular cell type. Thus, to screen for CRFR activation, an assay can use any of the signal transduction pathways as the readout even if the relevant cell type for treatment, *in vivo*, couples CRFR to skeletal muscle atrophy via a different pathway. One of ordinary skill in the art would recognize that a screening assay would be effective for identifying useful CRFR agonists independent of the pathway by which receptor activation was measured. Assays for measuring activation of these signaling pathways are known in the art.

For example, after contact with the test compound, lysates of the cells can be prepared and assayed for induction of cAMP. cAMP is induced in response to G_{αs} activation. Because G_{αs} is activated by receptors other than CRFR and because a test compound may be exerting its effect through CRFRs or by another mechanism, two control comparisons are relevant for determining whether a test compound increases levels of cAMP via activation of a CRFR. One control compares the cAMP level of cells contacted with a test compound and the cAMP level of cells contacted with a control compound (i.e., the vehicle in which the test compound is dissolved). If the test compound increases cAMP levels relative to the control compound this indicates that the test compound is increasing cAMP by some mechanism. The other control compares the cAMP levels of a CRFR expressing cell line and a cell line that is essentially the same except that it does not express the CRFR, where both of the cell lines have been treated with test compound. If the test compound elevates cAMP levels in the CRFR expressing cell line relative to the cell line that does not express CRFRs, this is an indication that the test compound elevates cAMP via activation of the CRFRs.

In a specific embodiment of the invention, cAMP induction is measured with the use of DNA constructs containing the cAMP responsive element linked to any of a variety of reporter genes can be introduced into cells expressing CRFRs. Such reporter genes include, but are not limited to, chloramphenicol acetyltransferase (CAT), luciferase, glucuronide synthetase, growth hormone, fluorescent proteins (e.g., Green Fluorescent Protein), or alkaline phosphatase. Following exposure of the cells to the test compound, the level of reporter gene expression can be

130
124

quantitated to determine the test compound's ability to increase cAMP levels and thus determine a test compounds ability to activate the CRFR.

The cells useful in this assay are the same as for the CRFR binding assay described above, except that cells utilized in the activation assays preferably express a functional receptor which gives a statistically significant response to CRF or one or more CRF analog. In addition to using cells expressing full length CRFRs, cells can be engineered which express CRFRs containing the ligand binding domain of the receptor coupled to, or physically modified to contain, reporter elements or to interact with signaling proteins. For example, a wild-type CRFR or CRFR fragment can be fused to a G-protein resulting in activation of the fused G-protein upon agonist binding to the CRFR portion of the fusion protein (Siefert, R. et al., *Trends Pharmacol. Sci* 20: 383-389 (1999)). The cells should also preferably possess a number of characteristics, depending on the readout, to maximize the inductive response by CRF or the CRF analog, for example, for detecting a strong induction of a CRE reporter gene; (a) a low natural level of cAMP; (b) G proteins capable of interacting with CRFRs; (c) a high level of adenylyl cyclase; (d) a high level of protein kinase A; (e) a low level of phosphodiesterases; and (f) a high level of cAMP response element binding protein would be advantageous. To increase the response to CRF or a CRF analog, host cells could be engineered to express a greater amount of favorable factors or a lesser amount of unfavorable factors. In addition, alternative pathways for induction of the CRE reporter could be eliminated to reduce basal levels.

In some instances, G protein-coupled receptor responses subside, or become desensitized, after prolonged exposure to an agonist. Another embodiment of the invention provides methods for identifying compounds that prolong or augment the agonist-induced activation of CRF₂R, or the CRF₂R signal transduction pathway, in response to a CRF₂R agonist. Such compounds may be used, for example, in conjunction with a CRF₂R agonist for the treatment of skeletal muscle atrophy. Typically the method uses a cell based assay comprising in any order or concurrently (i) contacting the cells with a test compound; (ii) treating cells expressing functional CRF₂R with a CRF₂R agonist at a concentration of agonist and for a period of agonist-receptor exposure sufficient to allow desensitization of the receptor; followed by (iii) determining the level of activation of the CRF₂R. One of skill in the art will recognize that several mechanisms contribute to receptor desensitization including, but not limited to, receptor phosphorylation, receptor internalization or degradation and CRFR signal transduction pathway down-modulation. One of skill in the art can determine the appropriate time (i.e., before, during or after agonist treatment) for

131
130

contacting the cells with the test compounds depending upon which mechanism of desensitization is targeted. For example, contacting the cells with test compounds following agonist treatment, can detect test compounds which block receptor desensitization which occurs as a result of phosphorylation of the receptor.

In another embodiment, the invention provides a method of screening one or more test compound to identify candidate compounds which regulate transcription from the CRF₂R gene or regulate CRF₂R expression. Candidate compounds which regulate transcriptional activity of CRFR genes may be identified using a reporter gene operably associated with a CRF₂R regulatory region (reporter gene construct). Such methods are known in the art. In one such method, the reporter gene construct is contacted with a test compound in the presence of a source of cellular factors and the level of reporter gene expression is determined. A test compound which causes an increase in the level of expression, compared to a control sample, is indicative of a candidate compound which increases transcription of the CRF₂R gene. To provide the cellular factors required for *in vitro* or *in vivo* transcription, appropriate cells or cell extracts are prepared from any cell type that normally expresses CRF₂R.

Candidate compounds which regulate CRF₂R expression can also be identified in a method wherein a cell is contacted with a test compound and the expression of CRFR is determined. The level of expression of CRF₂R in the presence of the test compound is compared with the level of expression in the absence of the test compound. Test compounds which increase the expression of CRF₂R are identified as candidate compounds for increasing muscle mass or muscle function. Such a method detects candidate compounds which increase the transcription or translation of the CRF₂R or which increase the stability of the mRNA or CRF₂R protein.

In another embodiment, this invention provides methods for screening one or more test compounds to identify candidate compounds which regulate the expression of the CRF or a CRF analog. Such assays are performed essentially as described above for the assays to identify candidate compounds which regulate expression of CRFRs with the following modifications. To identify candidate compound which regulate transcription from the CRF gene or a CRF analog gene, the reporter gene is operably associated with the regulatory region of the CRF gene or CRF analog gene of interest and the source of cellular factors should be from a cell type that expresses the gene of interest.

VII. Screening of candidate compounds using models of skeletal muscle atrophy

132
131

Candidate compounds selected from one or more test compounds by an *in vitro* assay, as described above, can be further tested for their ability to regulate skeletal muscle mass or function in model systems of skeletal muscle atrophy and/or hypertrophy. Such models of skeletal muscle atrophy or hypertrophy include both *in vitro* cell culture models and *in vivo* animal models of skeletal muscle atrophy. Such additional levels of screening are useful to further narrow the range of candidate compounds that merit additional investigation, e.g., clinical trials.

Cell Culture Models of Muscle Atrophy

In vitro models of skeletal muscle atrophy are known in the art. Such models are described, for example, in Vandeburgh, H.H., *In Vitro* 24:609-619 (1988), Vandeburgh, H.H. et al., *J of Biomechanics*, 24 Suppl 1:91-99 (1991), Vandeburgh, H.H. et al., *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 24(3):166-174 (1988), Chromiak, J.A., et al., *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 34(9):694-703 (1998), Shansky, J., et al., *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 33(9):659-661 (1997), Perrone, C.E. et al., *J. Biol. Chem.* 270(5):2099-2106 (1995), Chromiak, J.A. and Vandeburgh, H.H., *J. Cell. Physiol.* 159(3):407-414 (1994), and Vandeburgh, H.H. and Karlisch, P., *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 25(7):607-616 (1989). Such models are useful, but not required, following the *in vitro* screening described above in order to further narrow the range of candidate compounds that merit testing in an animal model. Cell culture models are treated with candidate compounds and the response of the model to the treatment is measured by assessing changes in muscle markers such as: muscle protein synthesis or degradation, changes in skeletal muscle mass or contractile function. Those compounds which induce significant changes in the muscle markers are typically screened further in an animal model of skeletal muscle atrophy.

Animal Models of Skeletal Muscle Atrophy

The candidate compounds are administered to non-human animals and the response of the animals is monitored, for example, by assessing changes in markers of atrophy or hypertrophy such as: skeletal muscle mass, skeletal muscle function, muscle or myofiber cross-sectional area, contractile protein content, non-contractile protein content or a biochemical or genetic marker that correlates with skeletal muscle mass or function changes. Candidate compounds which induce skeletal muscle hypertrophy or prevent any aspect of skeletal muscle atrophy should be considered as prospective therapeutic candidates for treatment of human skeletal muscle atrophy, and are referred to herein as candidate therapeutic compounds. In addition to assessing the ability of a

133
132

candidate compound to regulate skeletal muscle atrophy, undesirable side effects such as toxicity may also be detected in such a screen. The absence of unacceptably high levels of side effects may be used as a further criterion for the selection of candidate therapeutic compounds.

A variety of animal models for skeletal muscle atrophy are known in the art, such as those described in the following references: Herbison, G.J., et al. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 60:401-404 (1979), Appell, H-J. *Sports Medicine* 10:42-58 (1990), Hasselgren, P-O. and Fischer, J.E. *World J. Surg.* 22:203-208 (1998), Agbenyega, E.T. and Warcham, A.C. *Comp. Biochem. Physiol.* 102A:141-145 (1992), Thomason, D.B. and Booth, F.W. *J. Appl. Physiol.* 68:1-12 (1990), Fitts, R.H., et al. *J. Appl. Physiol.* 60:1946-1953 (1986), Bramanti, P., et al. *Int. J. Anat. Embryol.* 103:45-64 (1998), Cartee, G.D. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 50:137-141 (1995), Cork, L.C., et al. *Prog. Clin. Biol. Res.* 229:241-269 (1987), Booth, F.W. and Gollnick, P.D. *Med. Sci. Sports Exerc.* 15:415-420 (1983), Bloomfield, S.A. *Med. Sci. Sports Exerc.* 29:197-206 (1997). Preferred animals for these models are mice and rats. These models include, for example, models of disuse-induced atrophy such as casting or otherwise immobilizing limbs, hind limb suspension, complete animal immobilization, and reduced gravity situations. Models of nerve damage induced atrophy include, for example, nerve crush, removal of sections of nerves which innervate specific muscles, toxin application to nerves and infection of nerves with viral, bacterial or eukaryotic infectious agents. Models of glucocorticoid-induced atrophy include application of atrophy-inducing doses of exogenous glucocorticoid to animals, and stimulation of endogenous corticosteroid production, for example, by application of hormones that activate the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis. Models of sepsis-induced atrophy include, for example, inoculation with sepsis-inducing organisms such as bacteria, treatment of the animal with immune-activating compounds such as bacterial cell wall extract or endotoxin, and puncture of intestinal walls. Models of cachexia-induced atrophy include, for example, inoculation of an animal with tumorigenic cells with cachexia forming potential, infection of an animal with infectious agents (such as viruses which cause AIDS) which result in cachexia and treatment of an animal with hormones or cytokines such as CNTF, TNF, IL-6, IL-1, etc. which induce cachexia. Models of heart failure-induced atrophy include the manipulation of an animal so that heart failure occurs with concomitant skeletal muscle atrophy. Neurodegenerative disease-induced atrophy models include autoimmune animal models such as those resulting from immunization of an animal with neuronal components. Muscular dystrophy-induced models of atrophy include natural or man-

134
133

made genetically-induced models of muscular dystrophy such as the mutation of the dystrophin gene which occurs in the Mdx mouse.

Animal models of skeletal muscle hypertrophy include, for example, models of increased limb muscle use due to inactivation of the opposing limb, reweighting following a disuse atrophy inducing event, reutilization of a muscle which atrophied because of transient nerve damage, increased use of selective muscles due to inactivation of a synergistic muscle (e.g., compensatory hypertrophy), increased muscle utilization due to increased load placed on the muscle and hypertrophy resulting from removal of the glucocorticoid after glucocorticoid-induced atrophy. Preferred animal atrophy models include the sciatic nerve denervation atrophy model, glucocorticoid-induced atrophy model, and the leg casting disuse atrophy model that are described in further detail below.

The sciatic nerve denervation atrophy model involves anesthetizing the animal followed by the surgical removal of a short segment of either the right or left sciatic nerve, e.g., in mice the sciatic nerve is isolated approximately at the midpoint along the femur and a 3-5 mm segment is removed. This denervates the lower hind limb musculature resulting in atrophy of these muscles. Typically, innervation to the biceps femoris is left intact to provide satisfactory motion of the knee for virtually normal ambulation. Typically, in untreated animals, muscle mass of the denervated muscles is reduced 30-50% ten days following denervation. Following denervation, test compounds are administered e.g., by injection or by continuous infusion, e.g., via implantation of an osmotic minipump (e.g., Alzet, Palo Alto, CA), to determine their effect on denervation induced skeletal muscle atrophy. At various times following denervation, the animals are euthanized and lower leg muscles are dissected rapidly from both the denervated and nondenervated legs, the muscles, cleaned of tendons and connective tissue, are weighed. The extent of atrophy in the affected muscles is analyzed, for example, by measuring muscle mass, muscle cross-sectional area, myofiber cross-sectional area or contractile protein content.

The glucocorticoid-induced atrophy model involves the administration of a glucocorticoid to the test animal, e.g., 1.2 mg/kg/day of dexamethasone in the drinking water. Typically, in untreated animals, skeletal muscle mass is reduced 30-50% following ten days of dexamethasone administration. Concomitantly with, or following glucocorticoid administration, test compounds are administered e.g., by injection or by continuous infusion to determine their effect on glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy. At various times following glucocorticoid

125
134

administration, the extent of atrophy in the affected muscles is analyzed as described above for the denervation model.

The leg casting disuse atrophy model involves casting one hind leg of an animal from the knee down through the foot. Typically, muscle mass is reduced 20-40% after ten days of casting. Following casting, test compounds are administered by injection or by continuous infusion via implantation of an osmotic minipump (e.g., Alzet, Palo Alto, CA) to determine their effect on leg casting induced skeletal muscle atrophy. At various times following leg casting, the extent of atrophy in the affected muscles is analyzed as described above for the denervation model.

One of skill in the art would recognize that in screening for compounds for human use, because there are differences between the human CRF₂R and the CRF₂R from other animal species, there may be some false positive or negative results which arise when the screen is carried out using non-human CRF₂R. Thus, it is preferable to do the initial *in vitro* screen using human CRF₂R. In certain circumstances, identified candidate compounds may be active toward only the human receptor and not toward a non-human receptor. In such circumstances, it may still be desirable to determine whether these candidate compounds are able to regulate skeletal muscle mass or function in a second level of screening. Because these candidates do not activate non-human CRF₂R, a standard *in vivo* screen with non-human animal is not advised. In such circumstances the second level of screening for these candidates may be performed in transgenic animals that express human CRFRs.

Animals of any species, especially mammals, including, but not limited to, mice, rats, rabbits, guinea pigs, pigs, goats, dogs and non-human primates may be used to generate CRFR transgenic animals. Mice and rats are preferred, mice are most preferred. A variety of techniques are known in the art and may be used to introduce the human CRFR transgenes into animals to produce the founder lines of transgenic animals. Such techniques include, but are not limited to, pronuclear microinjection, retrovirus-mediated gene transfer into germ lines, gene targeting in embryonic stem cells, electroporation of embryos and sperm-mediated gene transfer.

VIII. Gene Therapy Methods for the Treatment of Skeletal Muscle Atrophy

The overall activity of CRF₂R can be increased by overexpressing a gene for CRF₂R (to increase expression of CRF₂R) or a constitutively active CRF₂R in the appropriate tissue. CRF levels can be increased, *in vivo*, by likewise overexpressing a CRF gene. Overexpression of these genes will increase the total cellular CRF₂R activity, thus, regulating skeletal muscle atrophy. The

136
(35)

gene or genes of interest are inserted into a vector suitable for expression in the subject. These vectors include, but are not limited to, adenovirus, adenovirus associated virus, retrovirus and herpes virus vectors in addition to other particles that introduced DNA into cells (e.g., liposome, gold particles, etc) or by direct injection of the DNA expression vector, containing the gene of interest, into human tissue (e.g., muscle).

IX Pharmaceutical Formulations and Methods for Use

Candidate compounds or candidate therapeutic compounds identified by screening methods described herein, can be administered to individuals to treat skeletal muscle atrophy, or to induce skeletal muscle hypertrophy. To this end, the present invention encompasses methods and compositions for modulating skeletal muscle atrophy, including, but not limited to, skeletal muscle atrophy induced by disuse due to surgery, bed rest, broken bones; denervation/nerve damage due to spinal cord injury; autoimmune disease; infectious disease; glucocorticoid use for unrelated conditions; sepsis due to infection or other causes; nutrient limitation due to illness or starvation; cancer cachexia; chronic inflammation; AIDS cachexia; COPD; congestive heart failure, sarcopenia and genetic disorders; e.g., muscular dystrophies, neurodegenerative diseases. Agonists of CRF₂R can be used to inhibit skeletal muscle atrophy. It is not necessary that effective compounds demonstrate absolute specificity for CRFR. It is contemplated that specific antagonist of other affected receptors can be co-administered with an effective, but nonspecific, agonist. Alternately, this lack of specificity may be addressed by modulation of dose alone, or the dosing regimen.

The candidate compounds or candidate therapeutic compounds identified by the screening methods of the present invention may be administered in conjunction with compounds which prolong or augment the activation of a CRF₂R or of a CRF₂R signal transduction pathway. These may be known compounds, for example, theophylline, or these compounds may be identified by the screening methods of this invention to prolong or augment the activation of a CRF₂R receptor or of a CRF₂R signal transduction pathway.

Dose Determinations

Safety and therapeutic efficacy of compounds which agonize CRFR can be determined by standard procedures using either *in vitro* or *in vivo* technologies. Compounds which exhibit large therapeutic indices are preferred, although compounds with lower therapeutic indices are useful if

137
136

the level of side effects is acceptable. The data obtained from the *in vitro* and *in vivo* toxicological and pharmacological techniques can be used to formulate the human range of doses which may be useful. The preferred dose lies in the range in which the circulating concentration of the compound is therapeutically maximal with acceptable safety. The circulating concentration of the compound may vary depending on the dose form, time after dosing, route of administration, etc. Doses outside this range are also useful provided the side effects are acceptable. Such matters as age and weight of the patient, and the like, can be used to determine such matters in the conventional manner. Pharmacogenetic approaches may be useful in optimizing compound selection, doses and dosing regimen in clinical populations.

Formulation and Use

Pharmaceutical compositions for use in the modulation of skeletal muscle atrophy in accordance with the present invention may be formulated using conventional methodologies using pharmaceutically acceptable carriers and excipients. The compositions of this invention are preferably provided in unit dosage form. As used herein, a "unit dosage form" is a composition of this invention containing an amount of a CRF₂R agonist that is suitable for administration to an animal, preferably a mammal, more preferably a human subject, in a single dose, according to good medical practice. Pharmaceutical compositions may be formulated for delivery by, for example, intranasal, transdermal, inhalation, parenteral, cutaneous, oral or rectal administration. For oral administration, the pharmaceutical composition may take the form of tablets or capsules containing the pharmacologically active compound and additives including, but not limited to, binding agents, fillers, lubricants, disintegrants, or wetting agents. The tablets may be coated. Liquid preparations for oral administration include, but are not limited to, syrups, suspensions or dry products which are reconstituted with liquid vehicle before use, containing the pharmacologically active compound and additives including, but not limited to, suspending agents, emulsifying agents, non-aqueous vehicles, preservatives, buffer salts, flavoring, coloring, sweetening agents, etc. Pharmaceutical compositions for oral administration may be formulated for controlled release of the pharmacologically active compounds either in the mouth, stomach or intestinal tract.

For inhalation administration, the compounds for use according to the present invention may be delivered by, but not limited to, the following forms: liquid, powder, gel or in the form of an aerosol spray utilizing either pressurized or non-pressurized propellants in either premeasured or non-premeasured doses. The pharmacologically active compound may be formulated with

138
137

appropriate fillers, vehicles, preservatives, buffers, etc. For parenteral administration, the pharmacologically active compound may be formulated with acceptable physiological carriers, preservatives, etc. and be prepared as suspensions, solutions, emulsion, powders ready for constitution, etc. for either bolus injection or infusion. Doses of these compounds may be administered by a variety of technologies including hypodermic needles, high pressure devices, etc. For rectal administration, the pharmacologically active compound may be formulated with acceptable physiological carriers, preservatives, etc. for delivery as suppositories, enemas, etc. For cutaneous administration, the pharmacologically active compound may be formulated with acceptable physiological carriers including lotions, emollients, etc. or incorporated into a patch type device. For long term administration, the pharmacologically active compound and appropriate additives such as, but limited to, polymers, hydrophobic materials, resins, etc. may be formulated as a depot preparation for either injection or implantation at multiple sites including but not limited to intramuscular and subcutaneous locations. In addition, the pharmacologically active compound may be administered by a dispensing device.

Monitoring of Effects During Clinical Trials

Monitoring the influence of compounds (e.g., drugs) on the expression or activity of CRF₂R can be employed not only in basic drug screening, but also in clinical trials. For example, the effectiveness of a compound determined by a screening assay to increase CRF₂R receptor activity or CRF₂R receptor expression can be assessed in clinical trials of patients with, or at risk for, skeletal muscle atrophy. At various times following administration of the test compound or placebo, the effect of the compound on the patient can be determined, for example, by observing the change in skeletal muscle mass, skeletal muscle function, biochemical markers of muscle breakdown or quality of life measures. Methods of measuring skeletal muscle mass in human subjects are known in the art and include, for example: measuring the girth of a limb; measuring muscle thickness with for instance, computer tomography, MRI or supersonics; or muscle biopsy to examine morphological and biochemical parameters (e.g., cross-section fiber area, fiber diameter or enzyme activities). Furthermore, because skeletal muscle mass is correlated with skeletal muscle function, muscle function can be used as a surrogate marker of mass and muscle mass changes can be assessed using functional measurements, e.g., strength, the force of a group of synergist muscles, or contraction characteristics found in electromyographic recordings. In addition, muscle protein loss as a result of muscle atrophy can be measured by quantitating levels of amino acids or amino acids derivatives, i.e., 3-methyl histidine, in the urine or blood of a subject. For a review of

139
138

such methods see Appell, *Sports Med.* 10:42-58 (1990). Quality of life measures include, but are not limited to, the ease of getting out of a chair, number of steps taken before tiring or ability to climb stairs.

EXAMPLES

Example 1 Construction of vectors for human CRF₂R receptor expression.

The human CRF₂R (hCRF₂R) DNA sequence, Accession No. E12752, is retrieved and two oligonucleotides including one containing the 5' end of the gene beginning at the initiation codon (5' oligonucleotide) and one containing the 3' end of the gene containing the stop codon (3' oligonucleotide) are synthesized. These oligonucleotides are designed to contain restriction endonuclease sites which are not present in the hCRF₂R gene with one unique site in the 5' oligonucleotide and a different unique restriction endonuclease site in the 3' oligonucleotide. In addition, the 3' oligonucleotide contains a polyadenylation addition signal sequence. Double stranded cDNA from human skeletal muscle is purchased from the Universal QUICK-Clone cDNA collection (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA). Using the above 5' and 3' oligonucleotides, the hCRF₂R cDNA is amplified by PCR of the human skeletal muscle cDNA using the AdvanTaq PCR kit (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA). The hCRF₂R gene PCR product is purified from PCR artifacts by agarose gel electrophoresis and the hCRF₂R gene DNA fragment is purified from the agarose gel using a purification product such as NucleoTrap (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA).

Cloning of the hCRF₂R PCR product into the pIRESneo vector (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA) is accomplished by first cutting the hCRF₂R PCR product and the pIRESneo vector with the appropriate restriction endonucleases so that the 5' and 3' restriction endonuclease sites are ready for ligation. The pIRESneo vector DNA is ligated to the hCRF₂R PCR product DNA using DNA ligase, from the AdvantAge™ PCR Cloning Kit (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA), according to the manufacturer's recommendations. The ligated vector and insert construct (pIRESneo/ hCRF₂R) is then used to transform TOP10F' competent E. coli cells (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA). Transformed cells are plated on LB/X-gal/IPTG plus ampicillin containing agar. White colonies (positive clones) are selected and individually cultured in LB medium. Plasmid DNA is isolated using NucleoBond DNA Purification System (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA). The insert from at least one clone is sequenced to ensure that the hCRF₂R sequence is correct. HEK293 cells containing a stably integrated Mercury CRE-LUC plasmid (Clontech Inc.,

140
139

Palo Alto, CA, USA) are transfected with purified pIRESneo/ hCRF₂R DNA, having the correct sequence insert, utilizing the CalPhos™ Mammalian Transfection Kit (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA). Cells stably transfected with pIRESneo/ hCRF₂R DNA are selected by culturing the cells in G418. The stably transfected cells (HEK293/CRE-LUC/pIRESneo/ hCRF₂R cells) are propagated in DMEM (Life Technologies, Rockville, MD) containing 10% fetal bovine serum (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA), penicillin/streptomycin solution (Life Technologies, Rockville, MD), L-glutamine (Life Technologies, Rockville, MD), and non-essential amino acid (Life Technologies, Rockville, MD) at 37°C in a 5% carbon dioxide/95% air atmosphere. The clones are characterized for both CRF binding and CRE-LUC activation following exposure to CRF as described in Example 2 and Example 3. Cells expressing the hCRF₂R receptor at an appropriate level and which are appropriately coupled to the CRE-LUC reporter system are then utilized for further analysis.

Example 2. Receptor Binding Assays

Receptor binding analysis of compounds is performed in whole cells by plating the HEK293/CRE-LUC/pIRESneo/ hCRF₂R cells from Example 1 in a 96 well polylysine coated plate. Cells are seeded in DMEM medium containing 10% fetal bovine serum, penicillin/streptomycin solution, L-glutamine, and non-essential amino acid at 37°C in a 5% carbon dioxide/95% air atmosphere and incubated overnight. The culture medium is removed and the appropriate amount of CRF covalently labeled with Europium (Eu-CRF) in MEM (Life Technologies, Rockville, MD) + 10% Seablock (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA) is added. The cells are incubated with the Eu-CRF for 90 minutes at room temperature then washed 4 times with phosphate buffered saline lacking magnesium and calcium (Life Technologies, Rockville, MD). Following the final wash, enhancement solution is added (Wallac Inc., Gaithersburg, MD) and the plate is read on a Wallac plate reader (Wallac Inc., Gaithersburg, MD) using the BioWorks Europium program. For saturation binding analysis, log doses of Eu-CRF ranging from 10⁻¹² to 10⁻³ M are added to the cells and binding analyzed both in the absence and the presence of a saturating concentration of unlabeled CRF for evaluation of non-specific binding. For competitive binding, a concentration of Eu-CRF is added which is half maximal, in terms of binding, in addition to varying concentrations of the compound of interest.

Example 3. Receptor Activation Assay

T41
140

Receptor activation analysis is performed by seeding the HEK293/CRE-LUC/pIRESneo/ hCRF₂R cells of Example 1 into Packard View Plate-96 (Packard Inc., CA). Cells are seeded in DMEM medium containing 10% fetal bovine serum, penicillin/streptomycin solution, L-glutamine, and non-essential amino acid at 37°C in a 5% carbon dioxide/95% air atmosphere and incubated overnight. The medium is then removed and replaced with DMEM (Life Technologies, Rockville, MD) containing 0.01% bovine albumin fraction V (SIGMA, St. Louis, MO) containing the compound of interest. The cells are then incubated for four hours at 37°C in a 5% carbon dioxide/95% air atmosphere after which the medium is removed and the cells are washed twice with Hanks Balanced Salt Solution (Life Technologies, Rockville, MD). Lysis Reagent (Promega Inc., Madison, WI) is then added to the washed cells and the cells are incubated for 20 minutes at 37°C in a 5% carbon dioxide/95% air atmosphere. The cells are then placed at -80°C for 20 minutes followed by a 20 minute incubation at 37°C in a 5% carbon dioxide/95% air atmosphere. After this incubation, Luciferase Assay Buffer and Luciferase Assay Substrate (Promega Inc., Madison, WI) are added to the cell lysates and luciferase activity quantitated using a luminometer. Relative activity of a compound is evaluated by comparing the increase following exposure to compound to the level of luciferase in HEK cells which contain the CRE-LUC construct without the hCRF₂R following exposure to compound. Specificity of response is also checked by evaluating luciferase response of hCRF₂R /CRE-LUC HEK cells to compound in the presence and absence of a 10-fold excess of hCRF₂R antagonist.

Example 4. Screen to identify candidate compounds that prolong or augment the activation of CRF₂R and/or a CRF₂R receptor signal transduction pathway.

Identification of compounds that prolong or augment the agonist-induced activation of the CRF₂R or of a CRF₂R signal transduction pathway, involves a variation of the Receptor Activation Assay described in Example 3. Specifically, this assay is performed by seeding the HEK293/ CRE-LUC/pIRESneo/hCRF₂R receptor cells into Packard View Plate-96 (Packard Inc., CA). Cells are seeded in DMEM medium containing 10% fetal bovine serum, penicillin/streptomycin solution, L-glutamine, non-essential amino acid, and saturating amounts of CRF at 37°C in a 5% carbon dioxide/95% air atmosphere and incubated for 48 hours. The medium is then removed and replaced with DMEM (Life Technologies, Rockville, MD) containing 0.01% bovine albumin fraction V (SIGMA, St. Louis, MO) and CRF in addition to the compound of interest. The cells are then incubated for four hours at 37°C in a 5% carbon dioxide/95% air atmosphere after which

142
141

the medium is removed and the cells are washed twice with Hanks Balanced Salt Solution (Life Technologies, Rockville, MD). Lysis Reagent (Promega Inc., Madison, WI) is then added to the washed cells and the cells are incubated for 20 minutes at 37°C in a 5% carbon dioxide/95% air atmosphere. The cells are then placed at -80°C for 20 minutes followed by a 20 minute incubation at 37°C in a 5% carbon dioxide/95% air atmosphere. After this incubation, Luciferase Assay Buffer and Luciferase Assay Substrate (Promega Inc., Madison, WI) are added to the cell lysates and luciferase activity is quantitated using a luminometer. Test compounds which stimulate fluorescence significantly above the levels of control untreated cells, after correction for variations in cell density, are considered candidate compounds for regulating skeletal muscle mass or function. The compounds of most interest are those that induce relatively higher levels of fluorescence.

○ Example 5. Screen to identify candidate compounds specific for CRF₂R.

Compounds that activate CRF₂R are identified as in Example 3. To select those compounds which show selectivity for CRF₂R over CRF₁R, these compounds also are screened against CRF₁R. HEK293/CRE-LUC/pIRESneo/hCRF₁R cells are generated essentially as described in Example 1 except that the human CRF₁R (hCRF₁R) DNA sequence, Accession No. X72304, is used for the initial PCR amplification. To determine how active the compounds are against CRF₁R, an activation assay is performed essentially as described in Example 3 except that HEK293/CRE-LUC/pIRESneo/hCRF₁R cells are used to seed the plates. The amount of fluorescence stimulated by the compound in CRF₂R expressing cells is compared with the amount of fluorescence stimulated by the compound in CRF₁R expressing cells. Those compounds which demonstrate a 10-fold better response (on a molar basis) in CRF₂R expressing cells than in CRF₁R expressing cells are then checked further for specificity of response to eliminate differences due to clonal variation. HEK293/CRE-LUC/pIRESneo/hCRF₂R cells are assayed with the compound in the presence or absence of a 10-fold excess of the CRF₂R antagonist, antisauvagine-30. Those compounds that show greater than 10-fold selectivity for CRF₂R and whose activity is inhibited by antisauvagine-30 are selected as candidate compounds.

○ Example 6. Screens to identify candidate compounds that increase hCRF₂R expression

The sequence containing the promoter region of the hCRF₂R gene, beginning far enough upstream of the transcriptional initiation site to contain all the regulatory elements necessary for physiological expression of the hCRF₂R gene in the appropriate tissue is retrieved from the human

143
142

genome database. Two oligonucleotides, one containing the 5' end of the promoter region (5' oligonucleotide) and one containing the 3' end of the promoter region including the transcriptional start site (3' oligonucleotide) are synthesized. These oligonucleotides also contain restriction endonuclease sites which are not present in the hCRF₂R gene regulatory region with one unique site in the 5' oligonucleotide and a different unique restriction endonuclease site in the 3' oligonucleotide. The 5' and 3' oligonucleotides are used for PCR amplification of the hCRF₂R gene regulatory region from human DNA (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA) using the PCR kit, Advantage® Genomic PCR kit (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA). The hCRF₂R gene regulatory region PCR product is purified from PCR artifacts by agarose gel electrophoresis and the hCRF₂R gene regulatory region DNA fragment is purified from the agarose gel using a purification product such as NucleoTrap (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA). Cloning of the hCRF₂R gene regulatory region PCR product into the pECFP-1 vector (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA) is accomplished by first cutting the hCRF₂R gene regulatory region PCR product and the pECFP-1 vector with the appropriate restriction endonucleases so that the 5' and 3' restriction endonuclease sites are ready for ligation. Ligation of the pECFP-1 vector DNA to the hCRF₂R gene regulatory region PCR product DNA is accomplished using DNA ligase from the Advantage™ PCR Cloning Kit (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations. The ligated vector and insert construct is then used to transform TOP10F' competent E. coli cells (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA). The cells are plated on LB plus kanamycin containing agar and kanamycin resistant colonies are selected for further analysis. Kanamycin resistant clones are cultured in LB containing kanamycin medium and plasmid DNA is isolated using NucleoBond DNA Purification System (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA) and the construct containing the hVPAC₂ gene regulatory region is analyzed by DNA sequencing to ensure construct correctness and integrity. Purified construct plasmid DNA containing the hCRF₂R gene regulatory region is then transfected into the HEK293 cells utilizing calcium phosphate-mediated transfection utilizing the CalPhos™ Mammalian Transfection Kit (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA). Transfected cell clones are selected using G418, isolated and propagated in DMEM (Life Technologies, Rockville, MD) containing 10% fetal bovine serum (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA), penicillin/streptomycin solution (Life Technologies, Rockville, MD), L-glutamine (Life Technologies, Rockville, MD), non-essential amino acid (Life Technologies, Rockville, MD) and G418 (Life Technologies, Rockville, MD) at 37°C in a 5% carbon dioxide/95% air atmosphere. G418 resistant clones are characterized by Southern blotting

144
143

to ensure that they contain the hCRF₂R gene promoter sequence; in addition activation of the hCRF₂R gene regulatory region is analyzed using an appropriate stimulating agent. Cells expressing the hCRF₂R gene regulatory region-ECFP at an appropriate level are then used in assays designed to evaluate compounds which can modulate the activity of the hCRF₂R gene regulatory region as follows. The regulatory region activation analysis is performed by seeding the hCRF₂R gene regulatory region-ECFP containing HEK293 cells at an appropriate density into black with clear bottom 96 well microtiter plates and allowed to grow overnight. The following day, the medium is removed and the test compound added in fresh growth medium. The cells are incubated for 16 hours at 37°C in a 5% carbon dioxide/95% air atmosphere followed by measurement of fluorescence (excitation at 433 (453) nm by detecting emission at 475(501) nm using a fluorometer (biolumin™ 960, Molecular Dynamics/Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Test compounds which stimulate fluorescence significantly above the levels of control untreated cells, after correction for variations in cell density, are considered candidate compounds for regulating skeletal muscle mass or function. The compounds of most interest are those which induce relatively higher levels of fluorescence.

Example 7. Screens to identify compounds that increase human CRF expression

The methods for identifying compounds that increase human CRF (hCRF) expression are essentially identical to those for identifying compounds which increase hVPAC₂ receptor expression except the regulatory region used is that for the hCRF gene. The sequence containing the regulatory region of the hCRF gene, beginning far enough upstream of the transcriptional initiation site to contain all the regulatory elements necessary for physiological expression of the hCRF gene in the appropriate tissue is retrieved from the human genome database. Two oligonucleotides, one containing the 5' end of the regulatory region (5' oligonucleotide) and one containing the 3' end of the regulatory region including the transcriptional start site (3' oligonucleotide) are synthesized. These oligonucleotides also contain restriction endonuclease sites which are not present in the hCRF gene regulatory region with one unique site in the 5' oligonucleotide and a different unique restriction endonuclease site in the 3' oligonucleotide. The 5' and 3' oligonucleotides are used for PCR amplification of the hCRF gene regulatory region from human DNA (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA) using the Advantage® Genomic PCR kit (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA). The hCRF gene regulatory region PCR product is purified from PCR artifacts by agarose gel electrophoresis and the hCRF gene regulatory region DNA fragment is purified from the agarose

145
144

gel using the purification product, NucleoTrap (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA). Cloning of the hCRF gene regulatory region PCR product into the pECFP-1 vector (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA) is accomplished by first cutting the hCRF gene regulatory region PCR product and the pECFP-1 vector with the appropriate restriction endonucleases so that the 5' and 3' restriction endonuclease sites are ready for ligation. Ligation of the pECFP-1 vector DNA to the hCRF gene regulatory region PCR product DNA is accomplished using DNA ligase from AdvantAge™ PCR Cloning Kit (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations. The ligated vector and insert construct is then used to transform TOP10F' competent E. coli cells (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA). The cells are plated on LB plus kanamycin containing agar and kanamycin resistant colonies are selected for further analysis. Kanamycin resistant clones are cultured in LB containing kanamycin medium and plasmid DNA is isolated using NucleoBond DNA Purification System (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA) and the construct containing the hCRF gene regulatory region is analyzed by DNA sequencing to ensure construct correctness and integrity. Purified construct plasmid DNA containing the hCRF gene regulatory region is then transfected into the HEK293 cells utilizing calcium phosphate-mediated transfection utilizing the CalPhos™ Mammalian Transfection Kit (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA). Transfected cell clones are selected using G418, isolated and propagated in DMEM (Life Technologies, Rockville, MD) containing 10% fetal bovine serum (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA), penicillin/streptomycin solution (Life Technologies, Rockville, MD), L-glutamine (Life Technologies, Rockville, MD), non-essential amino acid (Life Technologies, Rockville, MD) and G418 (Life Technologies, Rockville, MD) at 37°C in a 5% carbon dioxide/95% air atmosphere. G418 resistant clones are characterized by Southern blotting to ensure that they contain the hCRF gene regulatory region sequence; in addition activation of the hCRF gene regulatory region is analyzed using an appropriate stimulating agent. Cells expressing the hCRF gene regulatory region-ECFP at an appropriate level are then used in assays designed to evaluate compounds which can modulate the activity of the hCRF gene regulatory region as follows. The regulatory region activation analysis is performed as in Example 5 except that clones containing the hCRF gene regulatory region construct are used.

Example 8. Method of making human antibodies which activate the hCRF₂R.

Fully human monoclonal antibodies which activate the hCRF₂R are produced by first generating recombinant hCRF₂R protein as follows. The procedure from Example 1 is followed to

T46
145

obtain the hCRF₂R PCR product. This hCRF₂R PCR product is then cloned into the pHAT20 vector (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA) by first cutting the hCRF₂R gene PCR product and the pHAT20 vector with the appropriate restriction endonucleases so that the 5' and 3' restriction endonuclease sites are ready for ligation. Ligation of the pHAT20 vector DNA to the hCRF₂R gene PCR product DNA is accomplished using DNA ligase from the AdvantAge™ PCR Cloning Kit (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations. The ligated vector/insert construct is then used to transform TOP10F' competent E. coli cells (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA). Transformed cells are plated on LB plus ampicillin containing agar and ampicillin resistant colonies are selected for further analysis. Positive clones are cultured in LB medium containing ampicillin and plasmid DNA is isolated using NucleoBond DNA Purification System (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA) and the construct containing the hCRF₂R gene is analyzed by DNA sequencing to ensure construct correctness and integrity. The hCRF₂R -pHAT20 vector DNA is then used for additional PCR cloning by utilizing a 5' oligonucleotide containing the beginning of the HAT sequence and a unique restriction endonuclease site not present in the hCRF₂R -pHAT20 construct and the 3' hCRF₂R oligonucleotide utilized previously. The oligonucleotide primers are used to PCR amplify the HAT- hCRF₂R fusion gene from the hCRF₂R -pHAT20 construct and the PCR product is purified as described above. The HAT- hCRF₂R fusion gene PCR product is then utilized for cloning into the pBacPAK8 vector using the BacPAK Baculovirus Expression System from Clontech (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA). The ligation of the HAT- hCRF₂R fusion gene into the pBacPAK8 vector is essentially as described above. The hCRF₂R /HAT-pBacPAK8 construct is then transfected into TOP10F' competent E. coli cells, ampicillin resistant cells are selected and plasmid DNA is isolated and checked for construct integrity as described above. This construct is then cotransfected with linearized BacPAK6 DNA into Sf21 insect host cells utilizing the CalPhos™ Mammalian Transfection Kit (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA). The insect cells are then incubated for 2-3 days followed by harvest of virus from individual clear plaques. The virus is then amplified in Sf21 cells, the harvested virus titered, and the titered virus used for large scale infection of Sf21 cells utilizing BacPAK Insect Cell Media - all according to the manufacturers recommendations (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA). Recombinant HAT-CRF₂R fusion protein is then purified using the TALON® CellThru Purification Kit from Clontech (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA) using conditions recommended by the manufacturer. Briefly, infected Sf21 cells are harvested 48 hours after infection and sonicated in extraction/loading buffer. The

147
146

cell lysate is then put through a TALON® CellThru column. The column is washed twice with extraction/loading buffer and the bound HAT- hCRF₂R protein is eluted with elution buffer. The eluted protein is analyzed by SDS-PAGE for integrity and protein concentration is quantitated using the Bio-Rad SDS-PAGE system and protein quantitation systems according to the manufacturer's recommendations (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Ca). Purified HAT- hCRF₂R fusion protein is then used for immunizing XenoMouse animals (Abgenix Inc., Fremont, CA) for human monoclonal antibody production as follows 10 µg of purified recombinant HAT- hCRF₂R fusion protein in combination with 25 µg of adjuvant monophosphoryl lipid A (Sigma, St. Louis, MO) is used to vaccinate 10 XenoMouse animals multiple times over an eight week period. Serum is obtained from vaccinated animals and utilized in an antigen capture ELISA utilizing purified HAT- hCRF₂R fusion protein to detect antibodies to the HAT- hCRF₂R protein by coating polystyrene ELISA plates (Corning Glass Works, Corning, NY) with HAT- hCRF₂R fusion protein, blocked with PBS-1% BSA, washed and incubated at 37°C for 1 hour with a 1:50 dilution of the serum samples. After washing 5 times with PBS, the plates are incubated at 37°C for 1 hour with alkaline phosphatase-conjugated goat antibodies to human immunoglobulin G. The plates are then washed 5X with PBS and antibodies detected with p-nitrophenyl phosphate substrate (Sigma, St. Louis, MO) in buffer. Optical densities at 405 nm were measured using a plate reader and signal quantitated. Mice with demonstrated high antibody production are used for hybridoma formation. Hybridomas are generated by fusion of splenic cells from the XenoMouse animals with nonsecreting myeloma cell line NSA-bcl 2 using a 4:1 ratio of spleen cells to NSA-bcl2 cells in the presence of 30% polyethylene glycol PEG1450. Fused cells are individually cloned by limiting dilution into 96 well plates and cultured in RPMI-1640 medium containing 10% fetal bovine serum, nonessential amino acids, sodium pyruvate, L-glutamine, 100 u/ml penicillin-streptomycin and hypoxanthine-aminopterin-thymidine (all from Life Technologies, Rockville, MD). Supernatants from the hypoxanthine-aminopterin-thymidine selected hybridomas were screened for human antibody production by ELISA as described previously. Hybridomas which produce human antibodies to the HAT- hCRF₂R fusion protein are selected for large scale antibody production. Monoclonal antibodies are purified by Protein G-Sepharose chromatography. Briefly, the supernatant from cultured hybridoma clones is loaded onto a Protein G-Sepharose column (SIGMA, St. Louis, MO) in loading buffer, washed 3 times and the IgG is eluted with elution buffer. These antibodies are then used for screening to evaluate hCRF₂R activation (agonism) potential. This is accomplished using the methodology as outlined in Example 3. Those human

148
147

monoclonal antibodies which demonstrate agonist activity toward the hCRF₂R are designated candidate compounds.

Example 9. Determination of absolute force measurement of a muscle.

The extensor digitorum longus (EDL) and soleus muscles are removed, tendon-to-tendon from the casted mouse leg. A silk suture is tied to each tendon of the isolated muscles and the muscles are placed into a plexiglass chamber filled with Ringer solution (137 mM sodium chloride, 24 mM sodium bicarbonate, 11 mM glucose, 5 mM potassium chloride, 1 mM magnesium sulfate, 1 mM sodium phosphate, 0.025 mM tubocurarine, all at pH 7.4 and oxygenated with 95% oxygen/5% carbon dioxide) constantly bubbled with 95% oxygen/5% carbon dioxide maintained at 25° C. Muscles are aligned horizontally between a servomotor lever arm (Model 305B-LR Cambridge Technology Inc., Watertown MA, USA) and the stainless steel hook of a force transducer (Model BG-50; Kulite Semiconductor Products Inc., Leonia, NJ, USA) and field stimulated by pulses transmitted between two platinum electrodes placed longitudinally on either side of the muscle. Square wave pulses (0.2 ms duration) generated by a personal computer with a Labview board (Model PCI-MIO 16E-4), Labview Inc., Austin, TX, USA) are amplified (Acurus power amplifier model A25, Dobbs Ferry, NY, USA) to increase titanic contraction. Stimulation voltage and muscle length (Lo) are adjusted to obtain maximum isometric twitch force. Maximum titanic force production (Po) is determined from the plateau of the frequency-force relationship.

Example 10. Therapeutic treatment of skeletal muscle atrophy using a human antibody that is an agonist of the hCRF₂R receptor.

A human male subject weighing 50 kg and having significant muscular atrophy of the arms and legs due to prolonged bed rest, is treated to reverse the skeletal muscle atrophy. Once each week for a period of 3 months, 15 mls of an aqueous solution of pH 6 comprising an activating antibody of the CRF₂R receptor is administered to the subject via intravenous injection. The solution comprises the following:

<u>Component</u>	<u>Concentration (mg/ml)</u>
CRF ₂ R receptor agonist antibody	20
L-histidine HCl	0.47
L-histidine	0.3

149
143

α , α -trehalose dihydrate	20
Polysorbate 20	0.1
Bacteriostatic Sterile water	qs to 1 mL

At the end of the treatment period, the subject exhibits measurable increases of muscle mass, strength and mobility of the arms and legs.

Example 11. Prophylactic treatment of skeletal muscle atrophy using a human antibody that is an agonist of the hCRF₂R receptor.

A human female subject weighing 55 kg is scheduled for hip joint replacement surgery in one month. The subject is treated to enhance skeletal muscle mass prior to and following surgery to ultimately reduce the level of skeletal muscle atrophy due to muscle disuse during post-surgery recovery. Specifically, once each week for a period of 1 month prior to surgery and for 2 months post-surgery, 18 ml of an aqueous solution of pH 6.0 comprising an activating antibody of the CRF₂R receptor, is administered to the subject via intravenous injection. The solution comprises the following:

<u>Component</u>	<u>Concentration (mg/ml)</u>
CRF ₂ R activating antibody	20
L-histidine HCl	0.47
L-histidine	0.3
α , α -trehalose dihydrate	20
Polysorbate 20	0.1
Bacteriostatic Sterile water	qs to 1 mL

At the end of the treatment period, the subject exhibits measurable preservation of muscle mass, strength and mobility of the arms and legs as compared to the subject's expected status without antibody therapy.

Example 12. Prophylactic treatment of skeletal muscle atrophy using a human antibody that is an agonist of the CRF₂R receptor.

150
149

A human female subject weighing 45 kg undergoes a casting procedure to treat a simple fracture of the humerus after a fall. The subject is treated to prevent atrophy of the skeletal muscle of the affected arm and shoulder due to disuse and limited use during fracture healing. Specifically, once each week starting on the day of casting, 13 ml of pH 6.0 comprising the anti-hCRF₂R receptor is administered to the subject via intravenous injection. The solution comprises the following:

<u>Component</u>	<u>Concentration (mg/ml)</u>
CRFR activating antibody	20
L-histidine HCl	0.47
L-histidine	0.3
α, α-trehalose dihydrate	20
Polysorbate 20	0.1
Bacteriostatic Sterile water	qs to 1 mL

At the end of the treatment period, the subject exhibits measurable preservation of muscle mass, strength and mobility of the affected arm and shoulder and a reduced course of physical therapy as compared to the subject's expected status and follow-up treatment without antibody therapy.

Example 13. Prophylactic treatment of skeletal muscle atrophy using urocortin-II

A human female subject weighing 60 kg is admitted to the hospital in a comatose state. The subject is treated by this method to prevent atrophy of the skeletal muscle of the entire body due to disuse in the comatose state. Specifically, once each day while in the coma, the subject is administered, via slow intravenous infusion, approximately 500 ml of an aqueous solution that is prepared by addition of 5 ml of the following stock solution to 500 ml of sterile saline:

<u>Component</u>	<u>Concentration (mg/ml)</u>
Urocortin-II	12
Sodium phosphate buffer, pH 7.4	140

As a result of treatment, the subject exhibits measurable preservation of skeletal muscle mass and function, and reduced physical therapy needs during the coma and after regaining consciousness, as

151
150

compared to the subject's status without drug therapy.

Example 14. Therapeutic treatment of a patient with Duchenne Muscular dystrophy using CRF

A male subject weighing 40 kg with an existing diagnosis of Duchenne's Muscular Dystrophy is treated with a compound that exhibits CRF1-R and CRF2-R agonism over a similar dose range. The subject is treated with a sustained-release, depot formulation of the compound in order to improve or retain muscle strength and function over the progression of the disease. Specifically, once each month the subject is administered, via intramuscular injection, 3 ml of an aqueous solution of pH 6.0 comprising the following:

<u>Component</u>	<u>Concentration (mg/ml)</u>
CRH (Corticotropin-Releasing Hormone)	4
D,L lactic and glycolic acid copolymer	5

As a result of the treatment, the subject experiences either an improvement or an attenuation of the decline of muscle strength or muscle function in timed-function evaluations as compared to that exhibited during the natural progression of the disease.

The present invention is not to be limited in scope by the specific embodiments described which are intended solely as illustrations of individual aspects of the invention, and functionally equivalent methods and components are within the scope of the invention. These include, but are not limited to, species of test animal, nature and type of CRFR agonists, sex of the animal, model of atrophy, method of activating CRFR including genetic methodologies, etc. Various modifications of the invention, in addition to those shown and described herein will be apparent to those skilled in the art upon reading foregoing description and accompanying figures. Such modifications are intended to fall within the scope of the appended claims.

152
151

What is claimed is.

1. A method for identifying candidate compounds for regulating skeletal muscle mass or function, comprising:

- (a) contacting a test compound with a CRF₂R;
- (b) determining whether the test compound binds to the CRF₂R; and
- (c) identifying those test compounds which bind to the CRF₂R as candidate compounds for regulating skeletal muscle mass or function.

2. A method for identifying candidate compounds for regulating skeletal muscle mass or function, comprising:

- (a) contacting a test compound with a cell expressing a functional CRF₂R,
- (b) determining whether the test compound activates the CRF₂R; and
- (c) identifying those test compounds which activate the CRF₂R as candidate compounds for regulating skeletal muscle mass or function.

3. The method for identifying candidate compounds according to Claim 2, the method further comprising generating a list of candidate compounds.

4. The method for identifying candidate compounds according to Claim 2, in which the CRF₂R is expressed on a eukaryotic cell.

5. The method for identifying candidate compounds according to Claim 4 wherein the CRF₂R has an amino acid sequence that is greater than 80% identical to the sequence of SEQ ID NO: 10.

6. The method for identifying candidate compounds according to Claim 4 wherein the CRF₂R has an amino acid sequence that is greater than 90% identical to the sequence of SEQ ID NO: 10.

7. The method for identifying candidate compounds according to Claim 4 wherein the CRF₂R has the amino acid sequence corresponding to the amino acid sequence of SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:32 or SEQ ID NO:38

153
152

8. The method for identifying candidate compounds according to Claim 4, wherein the CRF₂R is from a species selected from the group consisting of human, mouse and rat.

9. The method for identifying candidate compounds according to Claim 8, wherein the CRF₂R is human.

10. The method for identifying candidate compounds according to Claim 4, the cell having a cellular cAMP level, in which determining whether the test compound activates the CRF₂R involves measuring the cellular cAMP level.

11. The method for identifying candidate compounds according to Claim 10, in which the cell further comprises a reporter gene operatively associated with a cAMP responsive element and measuring the cellular cAMP level involves measuring expression of the reporter gene.

12. The method for identifying candidate compounds according to Claim 11, in which the reporter gene is alkaline phosphatase, chloramphenicol acetyltransferase, luciferase, glucuronide synthetase, growth hormone, placental alkaline phosphatase or Green Fluorescent Protein.

13. A method for identifying candidate compounds for regulating skeletal muscle mass or function comprising, in any order:

(a) contacting a test compound with a cell expressing a functional CRF₂R, and determining a level of activation of CRF₂R resulting from the test compound;

(b) contacting a test compound with a cell expressing a functional CRF₁R, and determining the level of activation of CRF₁R resulting from the test compound; followed by

(c) comparing the level of CRF₂R activation and the level of CRF₁R activation; and

(d) identifying those test compounds that show similar activity toward CRF₂R and CRF₁R or show selectivity for CRF₂R as candidate compounds for regulating skeletal muscle mass or function.

14. The method according to claim 13 wherein the candidate compound exhibits a 100-fold or greater selectivity for CRF₂R.

154
153

15. The method according to claim 14 wherein the candidate compound exhibits a 1000-fold or greater selectivity for CRF₂R.

16. The method according to claim 13 wherein the candidate compound exhibits between 1-fold and 100-fold selectivity for CRF₂R.

17. A method for identifying candidate therapeutic compounds from a group of one or more candidate compounds which have been previously determined to bind to or activate the CRF₂R comprising:

- (a) administering the candidate compound to a non-human animal, and
- (b) determining whether the candidate compound regulates skeletal muscle mass or function in the treated animal.

18. A method for identifying candidate compounds that prolong or augment the agonist-induced activation of a CRF₂R or of a CRF₂R signal transduction pathway, comprising, in any order or concurrently:

- (a) contacting a test compound with a cell which expresses a functional CRF₂R,
- (b) treating the cell with a CRF₂R agonist for a sufficient time and at a sufficient concentration to cause desensitization of the CRF₂R in control cells; followed by
- (c) determining the level of activation of the CRF₂R; and
- (d) identifying those test compounds that prolong or augment the activation of a CRF₂R or of a CRF₂R signal transduction pathway as candidate compounds for regulating skeletal muscle mass or function

19. A method for identifying candidate therapeutic compounds from a group of one or more candidate compounds which have been previously determined to prolong or augment the activation of a CRF₂R or of a CRF₂R signal transduction pathway comprising:

- a) administering the candidate compound, in conjunction with a CRF₂R agonist, to a non-human animal; and
- b) determining whether the candidate compound regulates skeletal muscle mass or function in the treated animal.

155
194

20 A method for identifying candidate compounds for increasing CRF₂R or CFR expression, comprising:

- (a) contacting a test compound with a cell or cell lysate containing a reporter gene operatively associated with a CRF₂R regulatory element or a CRF regulatory element;
- (b) detecting expression of the reporter gene, and
- (c) identifying those test compounds that increase expression of the reporter gene as candidate compounds for regulating skeletal muscle mass or function.

21. A method for increasing skeletal muscle mass or function in a subject in which such an increase is desirable, comprising:

- (a) identifying a subject in which an increase in muscle mass or function is desirable; and
- (b) administering to the subject a safe and effective amount of a CRF₂R agonist.

22. A method for treating skeletal muscle atrophy in a subject in need of such treatment, comprising:

- (a) identifying a subject in need of treatment for skeletal muscle atrophy; and
- (b) administering to the subject a safe and effective amount of a compound selected from the group consisting of a CRF₂R agonist, an expression vector encoding a functional CRF₂R, an expression vector encoding a constitutively active CRF₂R, an expression vector encoding a CRF and a compound that increases expression of CRF₂R or CRF.

23. A method for treating skeletal muscle atrophy according to claim 22 wherein the compound is a CRF₂R agonist.

24. The method for treating skeletal muscle atrophy according to Claim 23, wherein the CRF₂R agonist is identified by a method for identifying candidate compounds for regulating skeletal muscle mass or function, comprising:

- (a) contacting a test compound with a CRF₂R,
- (b) determining whether the test compound activates the CRF₂R, and
- (c) identifying those test compounds that activate the CRF₂R as candidate compounds for regulating skeletal muscle mass or function.

156
155

25. The method for treating skeletal muscle atrophy according to Claim 23, wherein the CRF₂R agonist is a chimeric or human antibody.
26. The method according to claim 25 wherein the CRF₂R agonist is selective for CRF₂R over CRF₁R.
27. The method according to claim 26 wherein the CRF₂R agonist exhibits selectivity for CRF₂R greater than or equal to 100-fold.
28. The method according to claim 23 wherein the subject has muscular dystrophy and the CRF₂R agonist exhibits between 1-fold and 100-fold selectivity for CRF₂R.
29. The method for treating skeletal muscle atrophy according to Claim 23, further comprising: administering to the subject a safe and effective amount of a compound that prolongs or augments the activation of CRF₂R or the activation of a CRF₂R signal transduction pathway.
30. A purified antibody specific for a CRF₂R, wherein the antibody is a chimeric or human antibody.
31. The antibody of Claim 30, wherein the antibody is an agonist of a CRF₂R.
32. The antibody of Claim 31, wherein the antibody is a human antibody.
33. A pharmaceutical composition, comprising:
 (a) a safe and effective amount of a CRF₂R agonist; and
 (b) a pharmaceutically-acceptable carrier.
34. The pharmaceutical composition according to Claim 33 wherein the CRF₂R agonist is a chimeric or human antibody specific for a CRF₂R.
35. The pharmaceutical composition according to Claim 33 wherein the CRF₂R agonist is urocortin II.

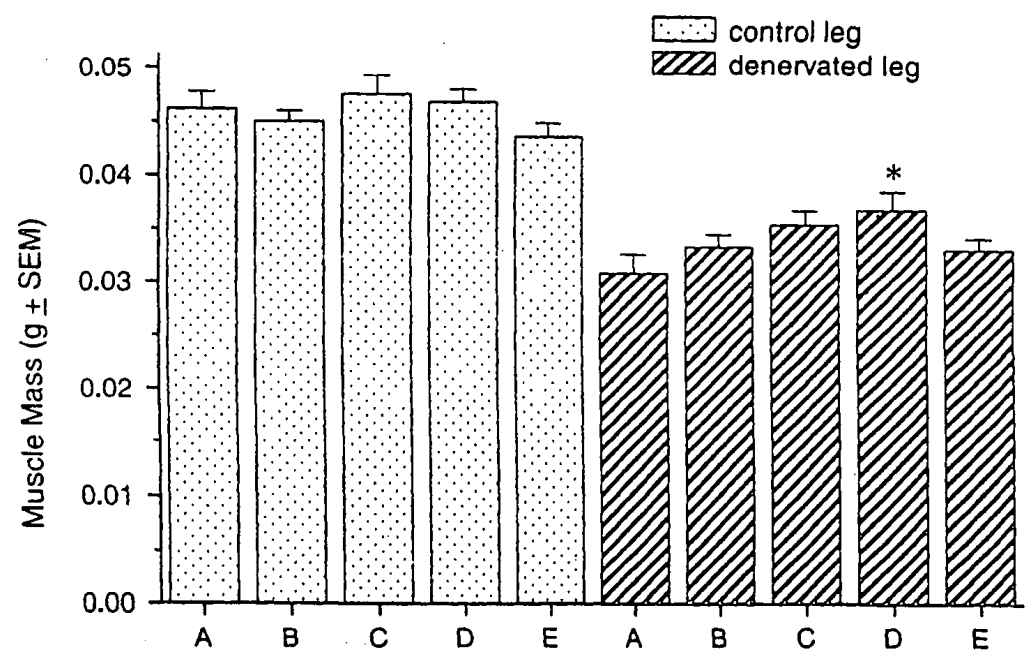


FIG. 1

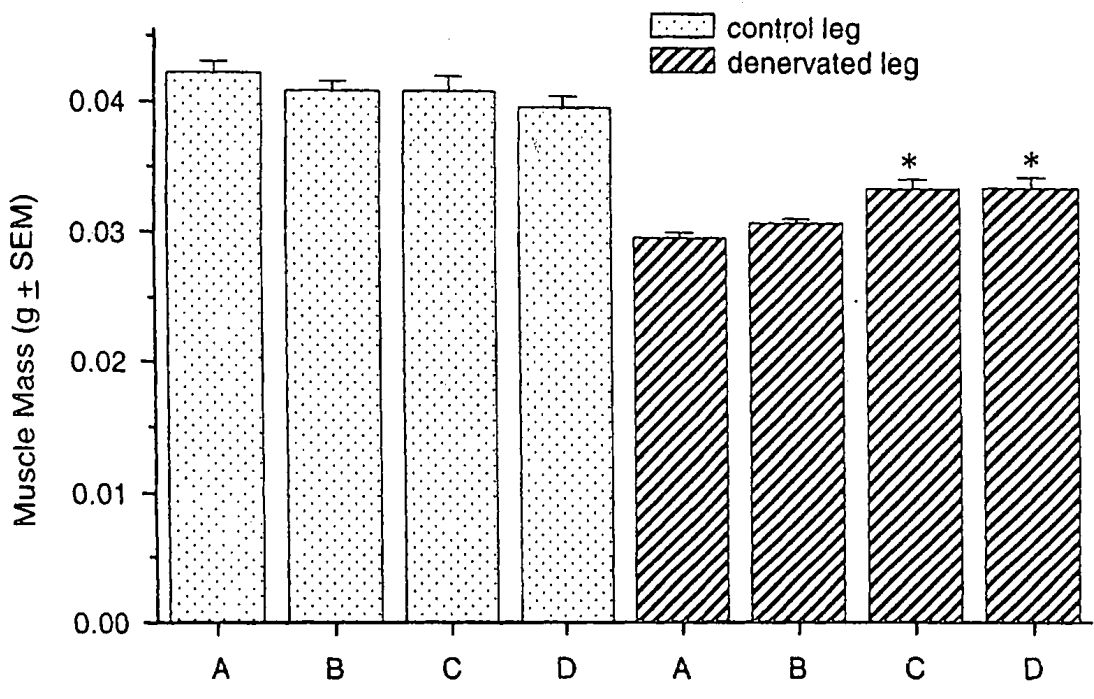


FIG. 2

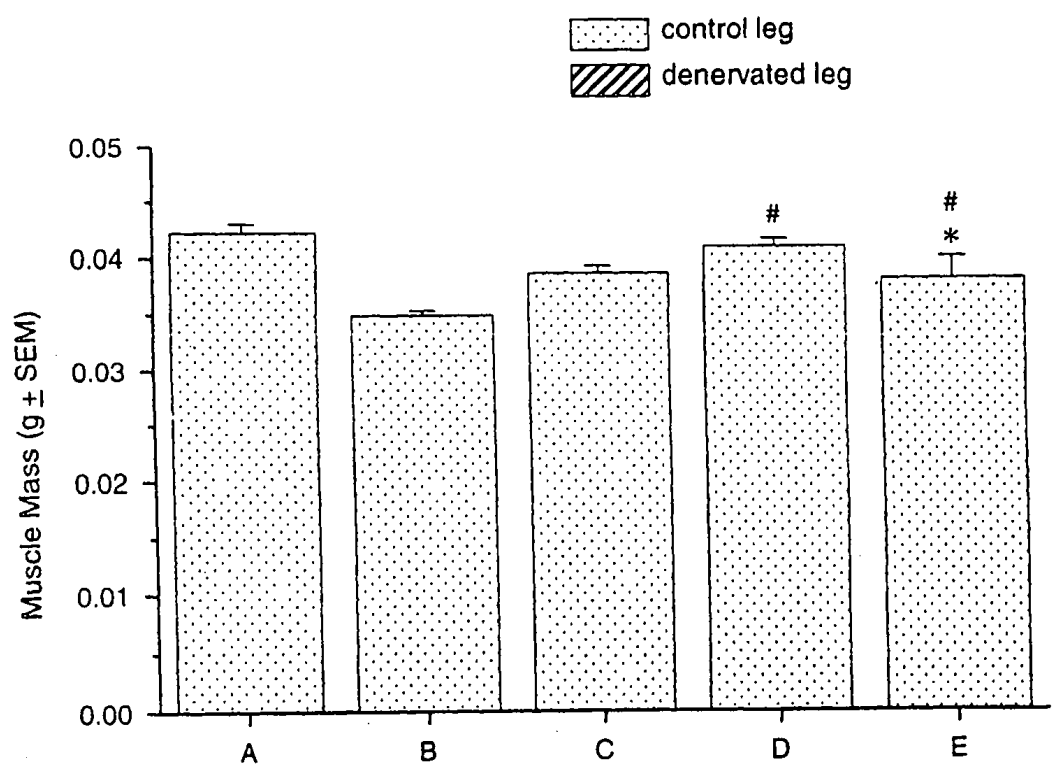


FIG. 3A

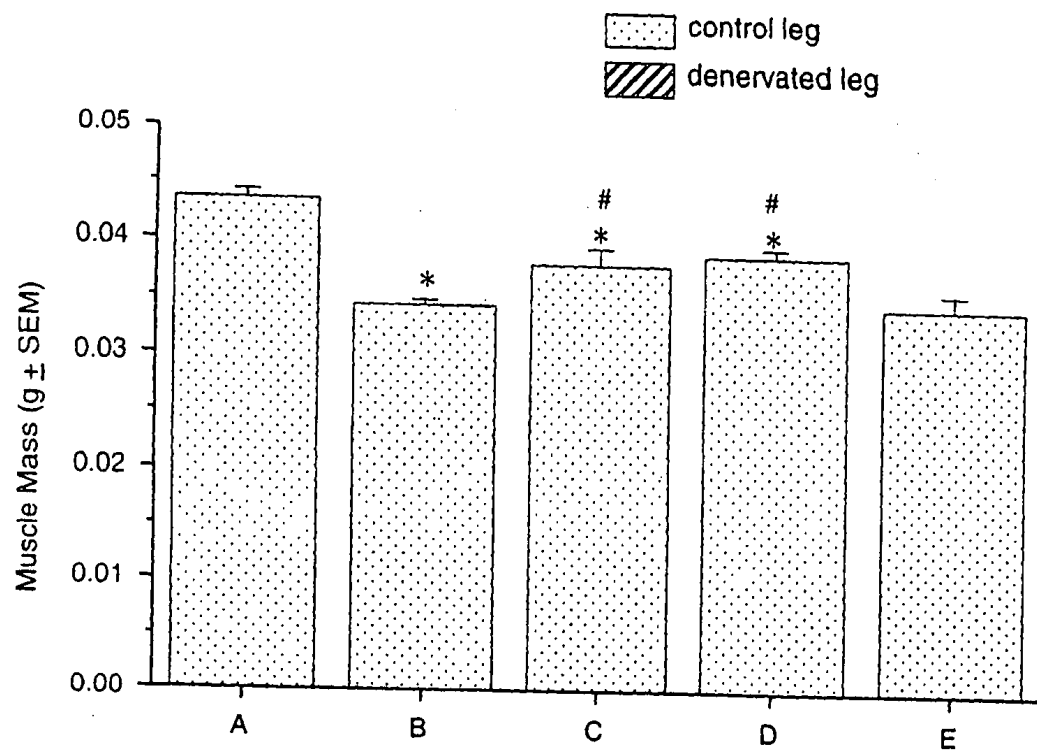


FIG. 3B

160

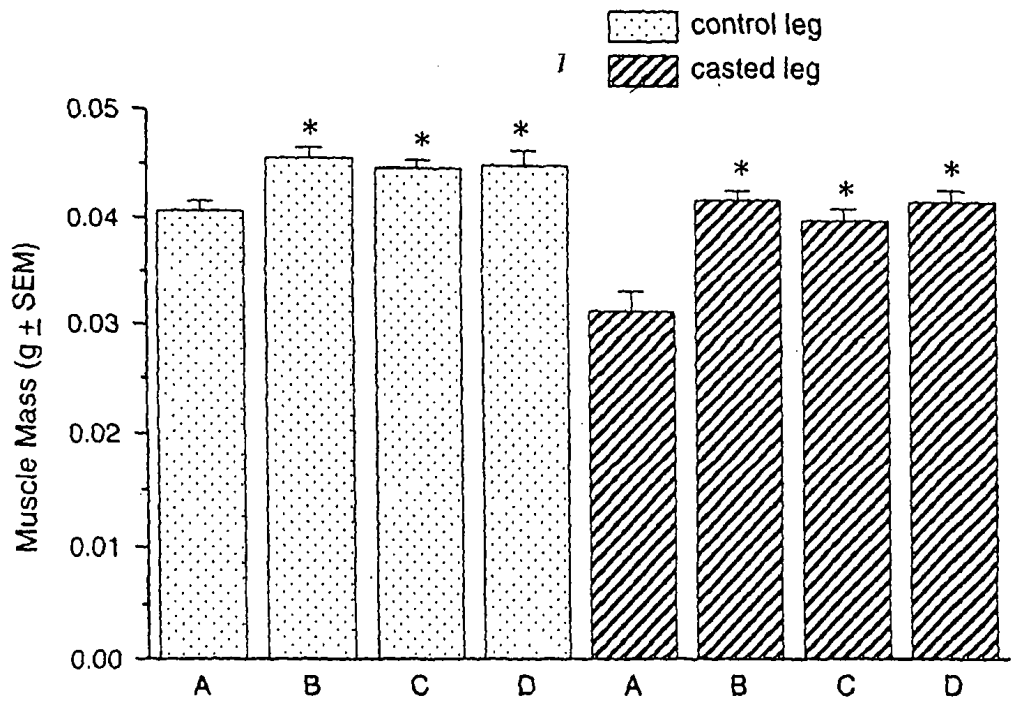


FIG. 4A

161

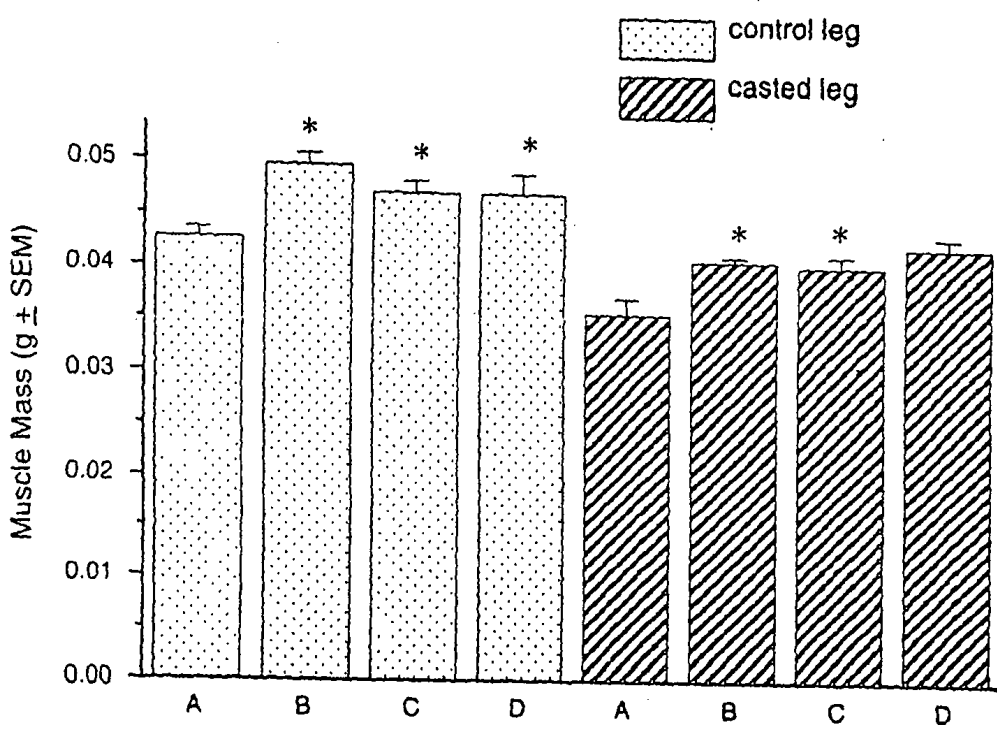


Fig. 4B

182

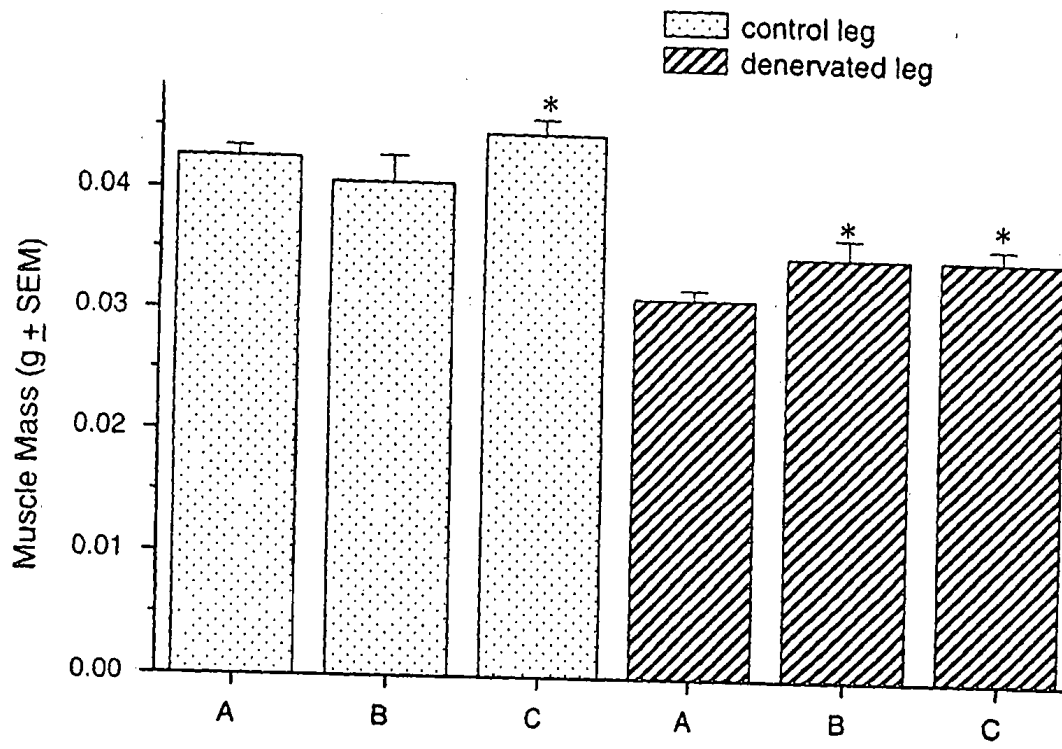


FIG. 5

163

164

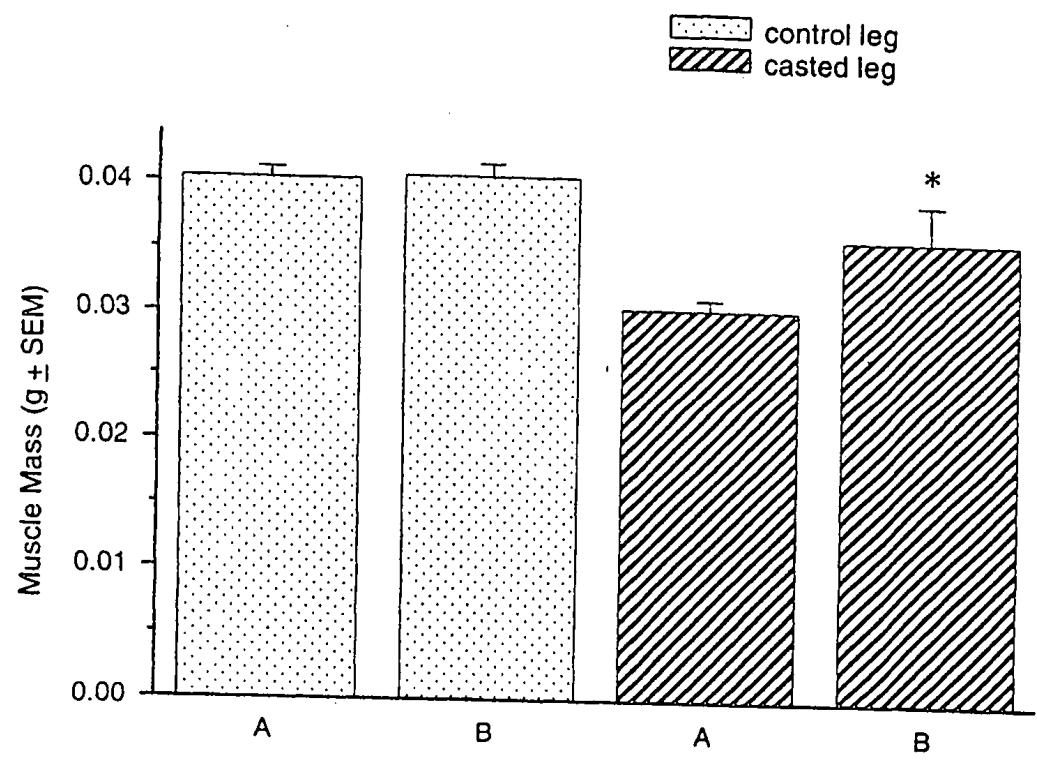


FIG. 6A

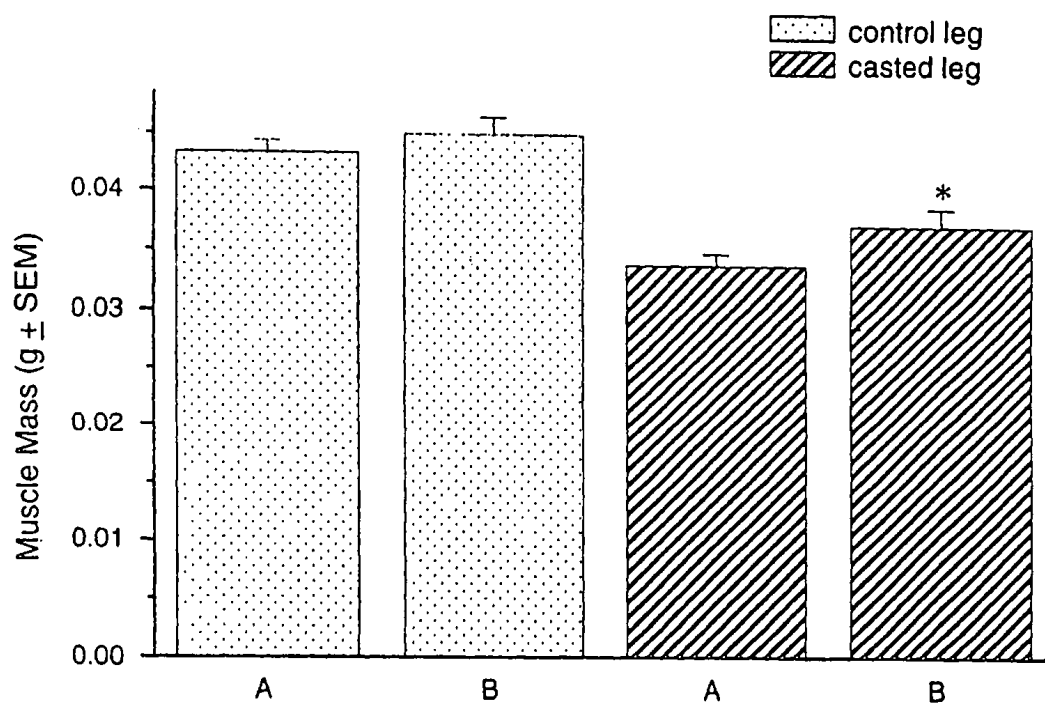


FIG. 6B

165

166

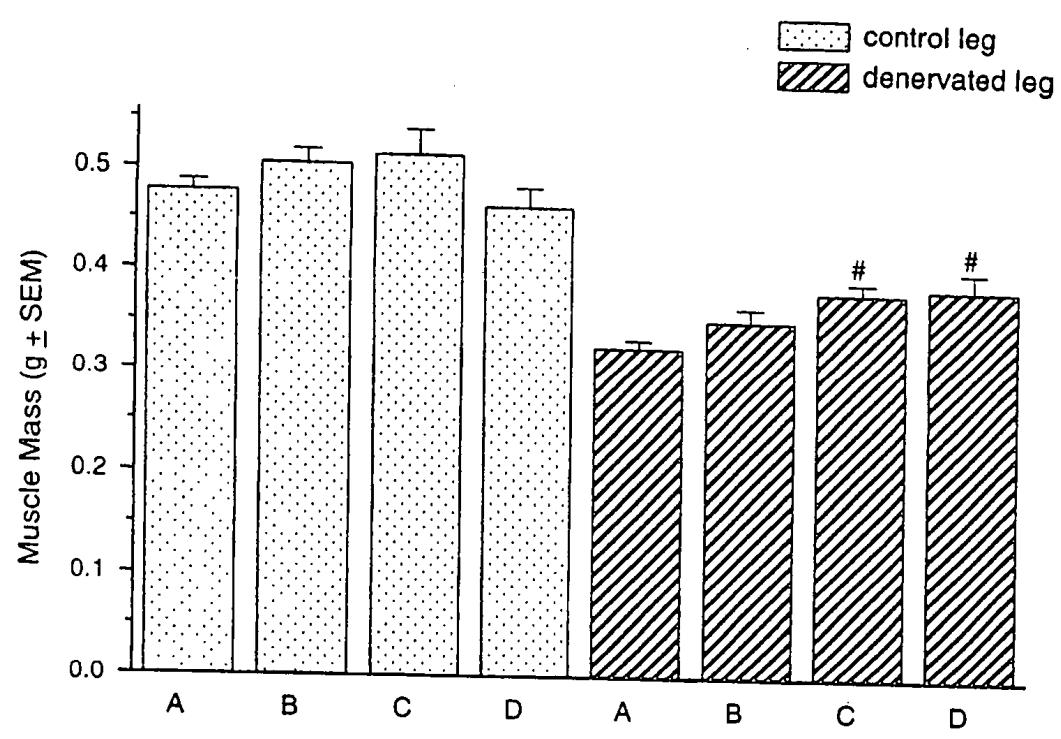


FIG. 7A

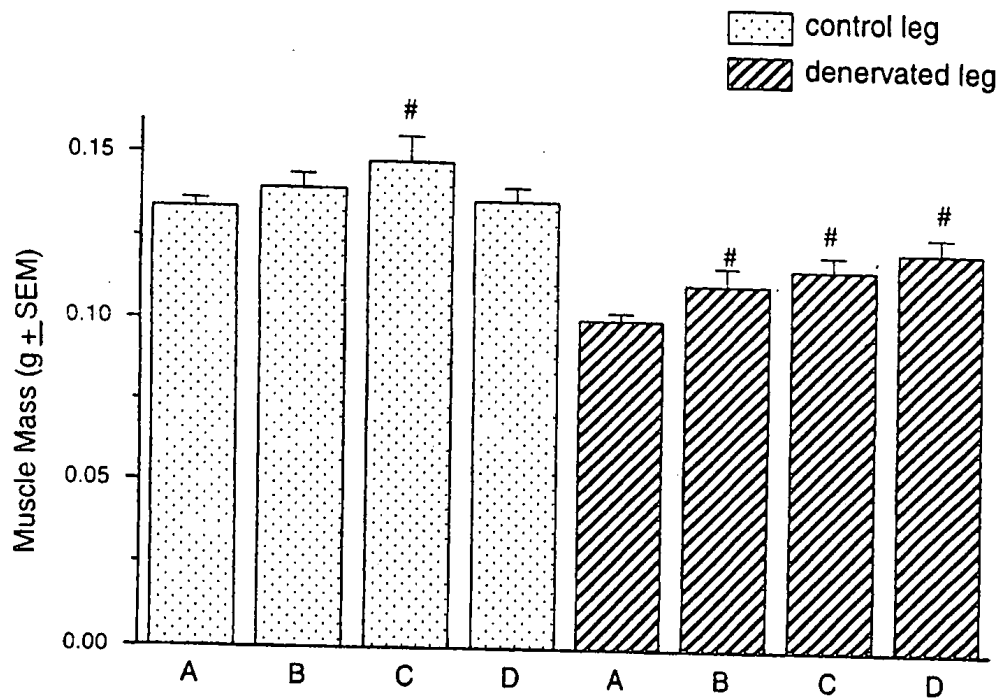


FIG. 7B

[Handwritten signature]

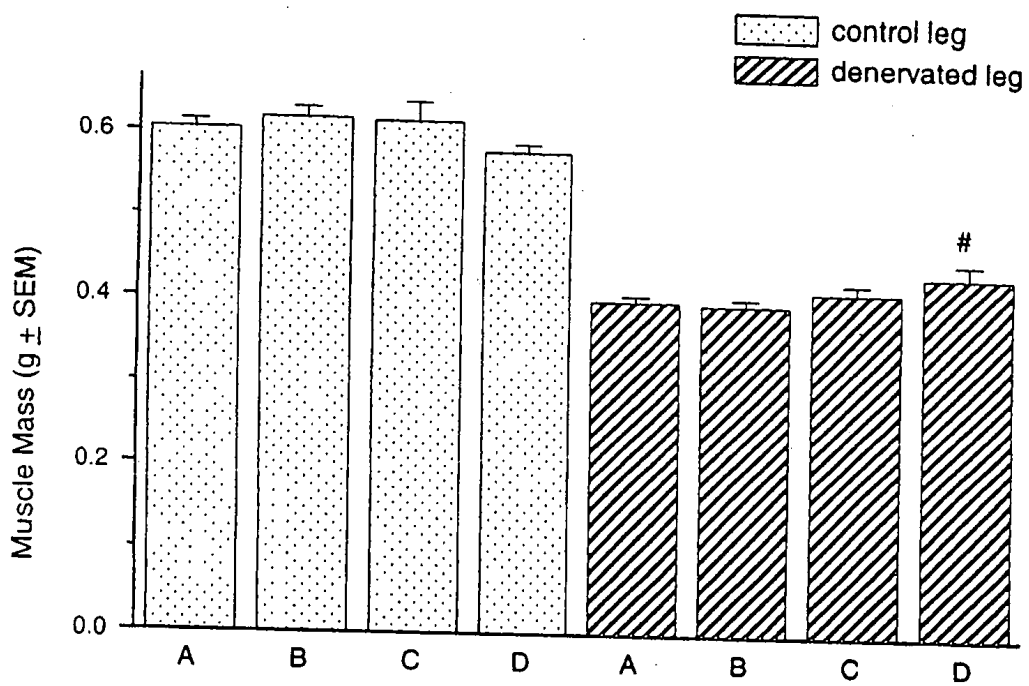


FIG. 7C

199

○

○

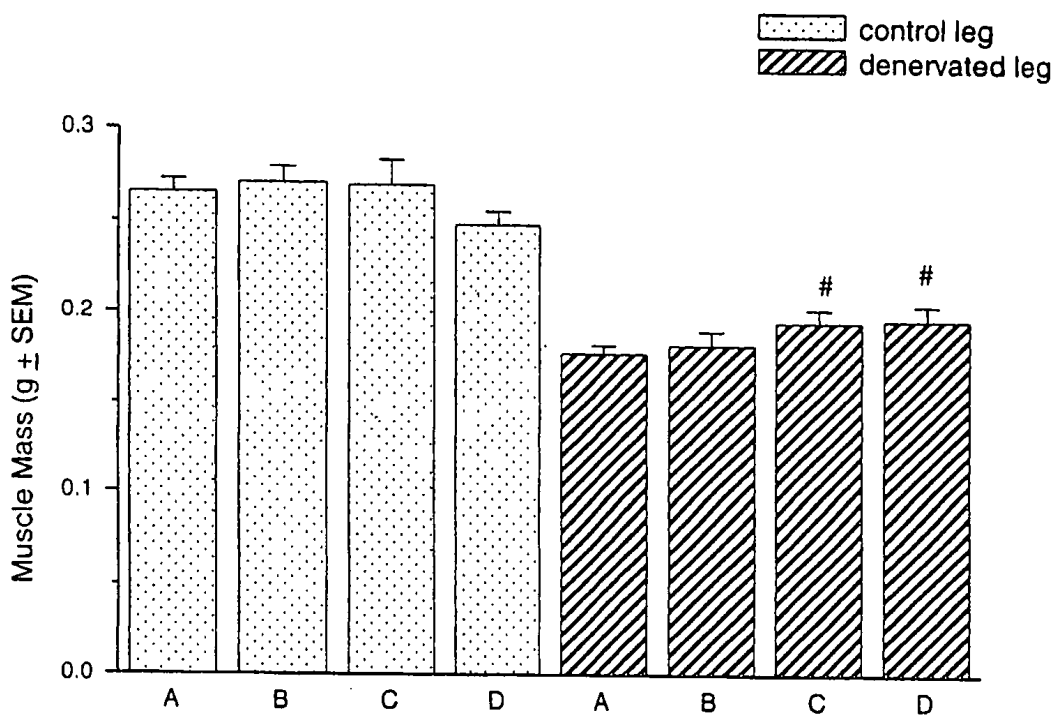


FIG. 7D

168

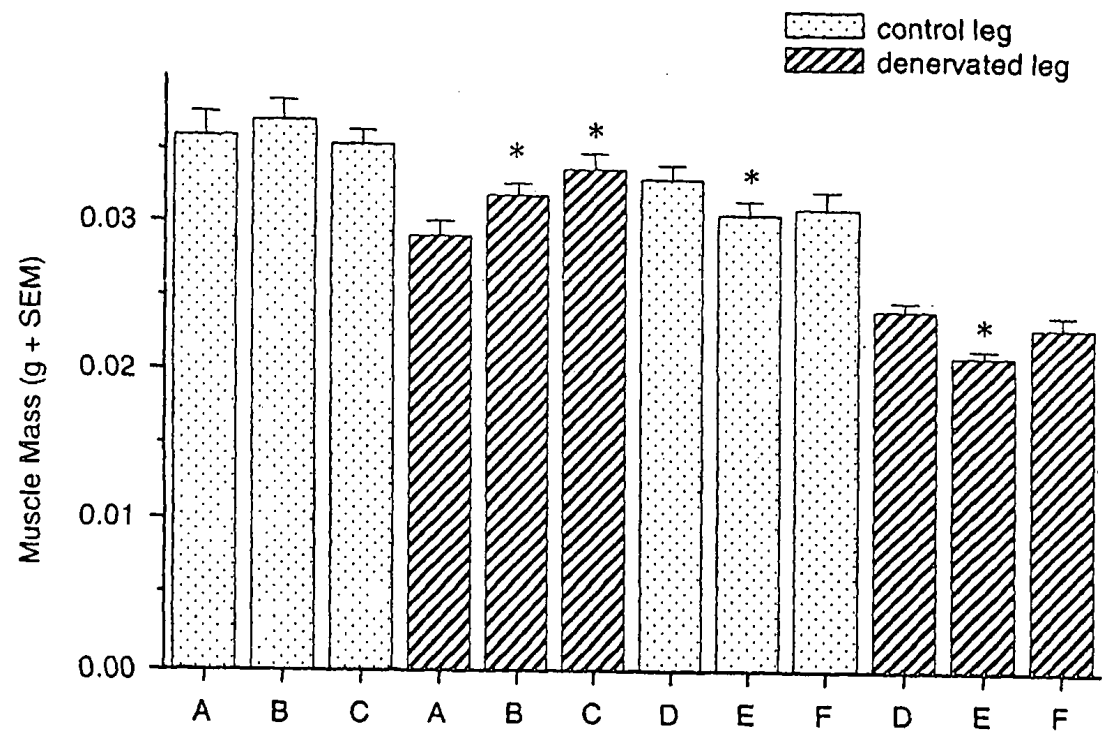


FIG. 8

1.01 70

147

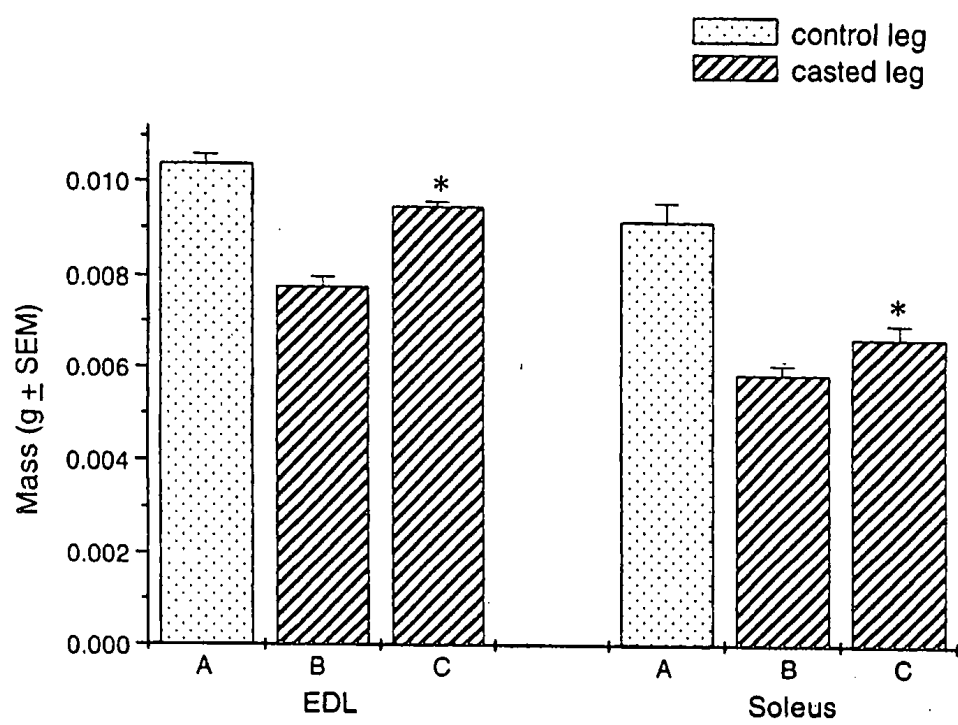


FIG. 9A

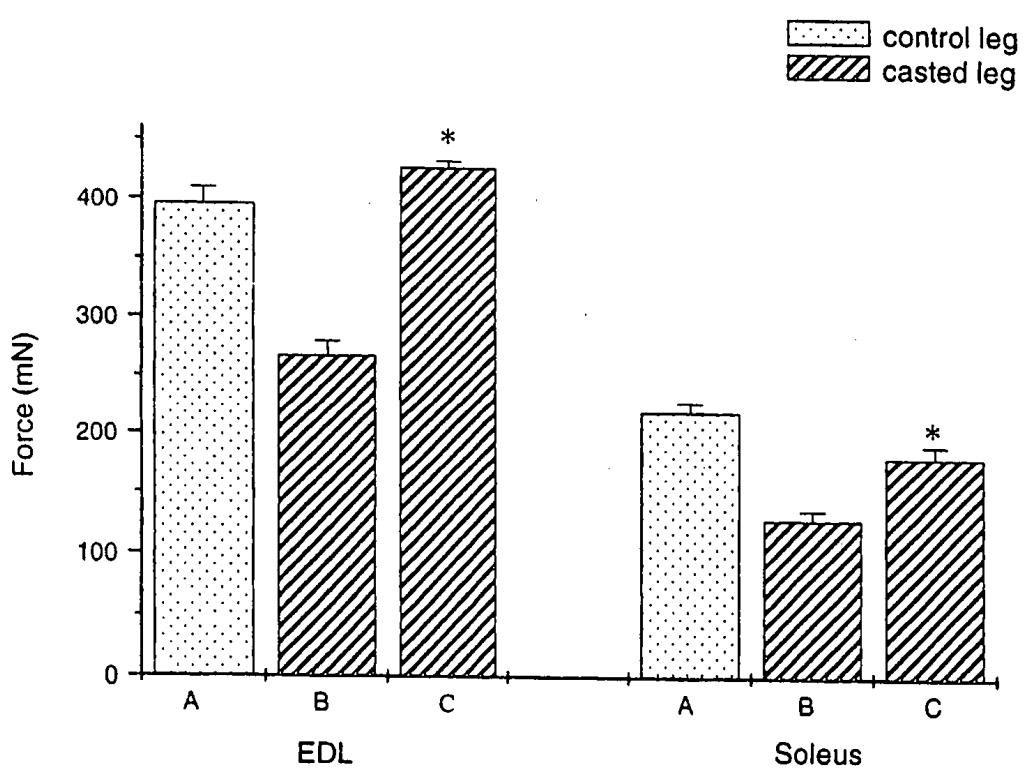


FIG. 9B

173
172

SEQUENCE LISTING

<110> The Procter & Gamble Company

<120> Methods for Identifying Compounds for Regulating Muscle Mass or Function Using Corticotropin Releasing Factor Receptors

<130> P&G Case No. 8448/VB

<160> 44

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 2536

<212> DNA

<213> homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (227)..(1474)

<400> 1

ggggaaacg cgccagact tccccgggaa ggggcgagcg agagccgggc cgggccgggc 60

cgggccgagg ggccgggaag cgccgagccg ggcattctct caccaggcag cgaccgagga 120

gcccggccgc ccaccccggtg ccgcccagagc ccgcagccgc ccgcccgtcc ctctgggatg 180

tccgtaggac ccgggcattc aggacggtag ccgagcgagc ccgagg atg gga ggg 235
Met Gly Gly
1cac ccg cag ctc cgt ctc gtc aag gcc ctt ctc ctt ctg ggg ctg aac 283
His Pro Gln Leu Arg Leu Val Lys Ala Leu Leu Leu Leu Gly Leu Asn
5 10 15ccc gtc tct gcc tcc ctc cag gac cag cac tgc gag agc ctg tcc ctg 331
Pro Val Ser Ala Ser Leu Gln Asp Gln His Cys Glu Ser Leu Ser Leu
20 25 30 35gcc agc aac atc tca gga .ctg cag tgc aac gca tcc gtg gac ctc att 379
Ala Ser Asn Ile Ser Gly Leu Gln Cys Asn Ala Ser Val Asp Leu Ile
40 45 50ggc acc tgc tgg ccc cgc agc cct gcg ggg cag cta gtg gtt cgg ccc 427
Gly Thr Cys Trp Pro Arg Ser Pro Ala Gly Gln Leu Val Val Arg Pro
55 60 65tgc cct gcc ttt ttc tat ggt gtc cgc tac aat acc aca aac aat ggc 475
Cys Pro Ala Phe Phe Tyr Gly Val Arg Tyr Asn Thr Thr Asn Asn Gly
70 75 80tac cgg gag tgc ctg gcc aat ggc agc tgg gcc gcc cgc gtg aat tac 523
Tyr Arg Glu Cys Leu Ala Asn Gly Ser Trp Ala Ala Arg Val Asn Tyr
85 90 95

174
173

tcc gag tgc cag gag atc ctc aat gag gag aaa aaa agc aag gtg cac 571
 Ser Glu Cys Gln Glu Ile Leu Asn Glu Glu Lys Lys Ser Lys Val His
 100 105 110 115

tac cat gtc gca gtc atc atc aac tac ctg ggc cac tgt atc tcc ctg 619
 Tyr His Val Ala Val Ile Ile Asn Tyr Leu Gly His Cys Ile Ser Leu
 120 125 130

gtg gcc ctc ctg gtg gcc ttt gtc ctc ttt ctg cgg ctc agg agc atc 667
 Val Ala Leu Leu Val Ala Phe Val Leu Phe Leu Arg Leu Arg Ser Ile
 135 140 145

cgg tgc ctg cga aac atc atc cac tgg aac ctc atc tcc gcc ttc atc 715
 Arg Cys Leu Arg Asn Ile Ile His Trp Asn Leu Ile Ser Ala Phe Ile
 150 155 160

ctg cgc aac gcc acc tgg ttc gtg gtc cag cta acc atg agc ccc gag 763
 Leu Arg Asn Ala Thr Trp Phe Val Val Gln Leu Thr Met Ser Pro Glu
 165 170 175

gtc cac cag agc aac gtg ggc tgg tgc agg ttg gtg aca gcc gcc tac 811
 Val His Gln Ser Asn Val Gly Trp Cys Arg Leu Val Thr Ala Ala Tyr
 180 185 190 195

aac tac ttc cat gtg acc aac ttc ttc tgg atg ttc ggc gag ggc tgc 859
 Asn Tyr Phe His Val Thr Asn Phe Phe Trp Met Phe Gly Glu Gly Cys
 200 205 210

tac ctg cac aca gcc atc gtg ctc acc tac tcc act gac cgg ctg cgc 907
 Tyr Leu His Thr Ala Ile Val Leu Thr Tyr Ser Thr Asp Arg Leu Arg
 215 220 225

aaa tgg atg ttc atc tgc att ggc tgg ggt gtg ccc ttc ccc atc att 955
 Lys Trp Met Phe Ile Cys Ile Gly Trp Gly Val Pro Phe Pro Ile Ile
 230 235 240

gtg gcc tgg gcc att ggg aag ctg tac tac gac aat gag aag tgc tgg 1003
 Val Ala Trp Ala Ile Gly Lys Leu Tyr Tyr Asp Asn Glu Lys Cys Trp
 245 250 255

ttt ggc aaa agg cct ggg gtg tac acc gac tac atc tac cag ggc ccc 1051
 Phe Gly Lys Arg Pro Gly Val Tyr Thr Asp Tyr Ile Tyr Gln Gly Pro
 260 265 270 275

atg atc ctg gtc ctg ctg atc aat ttc atc ttc ctt ttc aac atc gtc 1099
 Met Ile Leu Val Leu Leu Ile Asn Phe Ile Phe Leu Phe Asn Ile Val
 280 285 290

cgc atc ctc atg acc aag ctc cgg gca tcc acc acg tct gag acc att 1147
 Arg Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser Glu Thr Ile
 295 300 305

cag tac agg aag gct gtg aaa gcc act ctg gtg ctg ctg ccc ctc ctg 1195
 Gln Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu Pro Leu Leu
 310 315 320

ggc atc acc tac atg ctg ttc ttc gtc aat ccc ggg gag gat gag gtc 1243

175.
174

Gly Ile Thr Tyr Met Leu Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu Asp Glu Val	
325 330 335	
tcc cgg gtc gtc ttc atc tac ttc aac tcc ttc ctg gaa tcc ttc cag	1291
Ser Arg Val Val Phe Ile Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Glu Ser Phe Gln	
340 345 350 355	
ggc ttc ttt gtg tct gtg ttc tac tgt ttc ctc aat agt gag gtc cgt	1339
Gly Phe Phe Val Ser Val Phe Tyr Cys Phe Leu Asn Ser Glu Val Arg	
360 365 370	
tct gcc atc cgg aag agg tgg cac cgg tgg cag gac aag cac tcg atc	1387
Ser Ala Ile Arg Lys Arg Trp His Arg Trp Gln Asp Lys His Ser Ile	
375 380 385	
cgt gcc cga gtg gcc cgt gcc atg tcc atc ccc acc tcc cca acc cgt	1435
Arg Ala Arg Val Ala Arg Ala Met Ser Ile Pro Thr Ser Pro Thr Arg	
390 395 400	
gtc agc ttt cac agc atc aag cag tcc aca gca gtc tga gctggcaggt	1484
Val Ser Phe His Ser Ile Lys Gln Ser Thr Ala Val	
405 410 415	
catggagcag cccccaaaga gctgtggctg gggggatgac ggccaggctc cctgaccacc	1544
ctgcctgtgg aggtgacctg ttaggtctca tgcccactcc cccaggagca gctggcactg	1604
acagcctggg ggggcccgtc tccccctgca gccgtgcagg actctagctc atgagtggaa	1664
agtcacctac aggactgggc cgggcccagg gcctctggct tccctgcca atcctccctg	1724
gagaagggac atgggaatga attgaaatgg ggcgtggac acctacagca gcacgcatgt	1784
ccctccaagg ctgtcttctc ccagagcaca agaaggccag cccactgggc cctggggctg	1844
ccctcggcaa ccgtggggag gccatttgct gccctggggc atcatgggca actcgtgaca	1904
gcctctgact caccacgatg acgcctctgg acctcggtga tgccttccga caccactggg	1964
aaccaagggc cctcactcag gaacctgga gacagaagtc aggtgtcatc atcagacttg	2024
cggccacagc actagagtca cccccccagg cctccagaac cttactggca ctgtggcact	2084
gccaccagca atgccctgcc ttgctgcctt caccctgaac atttagtacc ctgcaggcca	2144
ggccagcttc ccctcactta accaccccat accagtcacc tcctgtcctt tttcctcttt	2204
tgtgagaaga tgggggctgg agggggcaga gtggcctgtg agcaagagcc aggggtgtcc	2264
cagtcccagc ctctggggca gagcttgtag cctgggatgg cctctggggc aggaccacta	2324
gctaagcaag ccaggagaag acccctgccc aagtggctct tgggacaacg tgctgcttac	2384
actccaggtg tggaccggcc gcagcccca ctgacctgcc catgtccaga gggactggac	2444
agccagggca gggctttggg gggcactaga agatgagggt gtcggctgtg aggcgggtgg	2504

176
175

ctggtataaa taatatttat cttttcaacc ag

2536

<210> 2
<211> 415
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 2

Met Gly Gly His Pro Gln Leu Arg Leu Val Lys Ala Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Leu Asn Pro Val Ser Ala Ser Leu Gln Asp Gln His Cys Glu Ser
20 25 30

Leu Ser Leu Ala Ser Asn Ile Ser Gly Leu Gln Cys Asn Ala Ser Val
35 40 45

Asp Leu Ile Gly Thr Cys Trp Pro Arg Ser Pro Ala Gly Gln Leu Val
50 55 60

Val Arg Pro Cys Pro Ala Phe Phe Tyr Gly Val Arg Tyr Asn Thr Thr
65 70 75 80

Asn Asn Gly Tyr Arg Glu Cys Leu Ala Asn Gly Ser Trp Ala Ala Arg
85 90 95

Val Asn Tyr Ser Glu Cys Gln Glu Ile Leu Asn Glu Glu Lys Lys Ser
100 105 110

Lys Val His Tyr His Val Ala Val Ile Ile Asn Tyr Leu Gly His Cys
115 120 125

Ile Ser Leu Val Ala Leu Leu Val Ala Phe Val Leu Phe Leu Arg Leu
130 135 140

Arg Ser Ile Arg Cys Leu Arg Asn Ile Ile His Trp Asn Leu Ile Ser
145 150 155 160

Ala Phe Ile Leu Arg Asn Ala Thr Trp Phe Val Val Gln Leu Thr Met
165 170 175

Ser Pro Glu Val His Gln Ser Asn Val Gly Trp Cys Arg Leu Val Thr
180 185 190

177
176

Ala Ala Tyr Asn Tyr Phe His Val Thr Asn Phe Phe Trp Met Phe Gly
195 200 205

Glu Gly Cys Tyr Leu His Thr Ala Ile Val Leu Thr Tyr Ser Thr Asp
210 215 220

Arg Leu Arg Lys Trp Met Phe Ile Cys Ile Gly Trp Gly Val Pro Phe
225 230 235 240

Pro Ile Ile Val Ala Trp Ala Ile Gly Lys Leu Tyr Tyr Asp Asn Glu
245 250 255

Lys Cys Trp Phe Gly Lys Arg Pro Gly Val Tyr Thr Asp Tyr Ile Tyr
260 265 270

Gln Gly Pro Met Ile Leu Val Leu Leu Ile Asn Phe Ile Phe Leu Phe
275 280 285

Asn Ile Val Arg Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser
290 295 300

Glu Thr Ile Gln Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu
305 310 315 320

Pro Leu Leu Gly Ile Thr Tyr Met Leu Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu
325 330 335

Asp Glu Val Ser Arg Val Val Phe Ile Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Glu
340 345 350

Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ser Val Phe Tyr Cys Phe Leu Asn Ser
355 360 365

Glu Val Arg Ser Ala Ile Arg Lys Arg Trp His Arg Trp Gln Asp Lys
370 375 380

His Ser Ile Arg Ala Arg Val Ala Arg Ala Met Ser Ile Pro Thr Ser
385 390 395 400

Pro Thr Arg Val Ser Phe His Ser Ile Lys Gln Ser Thr Ala Val
405 410 415

```
<210> 3
<211> 1285
<212> DNA
<213> Homo sapiens
```

```
<220>
<221> CDS
<222> (38)..(1285)
```

[illegible]

171
178

agc aac gtg ggc tgg tgc agg ttg gtg aca gcc gcc tac aac tac ttc Ser Asn Val Gly Trp Cys Arg Leu Val Thr Ala Ala Tyr Asn Tyr Phe 185 190 195	631
cat gtg acc aac ttc ttc tgg atg ttc ggc gag ggc tgc tac ctg cac His Val Thr Asn Phe Phe Trp Met Phe Gly Glu Gly Cys Tyr Leu His 200 205 210	679
aca gcc atc gtg ctc acc tac tcc act gac cgg ctg cgc aaa tgg atg Thr Ala Ile Val Leu Thr Tyr Ser Thr Asp Arg Leu Arg Lys Trp Met 215 220 225 230	727
ttc atc tgc att ggc tgg ggt gtg ccc ttc ccc atc att gtg gcc tgg Phe Ile Cys Ile Gly Trp Gly Val Pro Phe Pro Ile Ile Val Ala Trp 235 240 245	775
gcc att ggg aag ctg tac tac gac aat gag aag tgc tgg ttt ggc aaa Ala Ile Gly Lys Leu Tyr Tyr Asp Asn Glu Lys Cys Trp Phe Gly Lys 250 255 260	823
agg cct ggg gtg tac acc gac tac atc tac cag ggc ccc atg atc ctg Arg Pro Gly Val Tyr Thr Asp Tyr Ile Tyr Gln Gly Pro Met Ile Leu 265 270 275	871
gtc ctg ctg atc aat ttc atc ttc ctt ttc aac atc gtc cgc atc ctc Val Leu Leu Ile Asn Phe Ile Phe Leu Phe Asn Ile Val Arg Ile Leu 280 285 290	919
atg acc aag ctc cgg gca tcc acc acg tct gag acc att cag tac agg Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser Glu Thr Ile Gln Tyr Arg 295 300 305 310	967
aag gct gtg aaa gcc act ctg gtg ctg ctg ccc ctc ctg ggc atc acc Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu Pro Leu Leu Gly Ile Thr 315 320 325	1015
tac atg ctg ttc ttc gtc aat ccc ggg gag gat gag gtc tcc cgg gtc Tyr Met Leu Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu Asp Glu Val Ser Arg Val 330 335 340	1063
gtc ttc atc tac ttc aac tcc ttc ctg gaa tcc ttc cag ggc ttc ttt Val Phe Ile Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Glu Ser Phe Gln Gly Phe Phe 345 350 355	1111
gtg tct gtg ttc tac tgt ttc ctc aat agt gag gtc cgt tct gcc atc Val Ser Val Phe Tyr Cys Phe Leu Asn Ser Glu Val Arg Ser Ala Ile 360 365 370	1159
cgg aag agg tgg cac cgg tgg cag gac aag cac tcg atc cgt gcc cga Arg Lys Arg Trp His Arg Trp Gln Asp Lys His Ser Ile Arg Ala Arg 375 380 385 390	1207
gtg gcc cgt gcc atg tcc atc ccc acc tcc cca acc cgt gtc agc ttt Val Ala Arg Ala Met Ser Ile Pro Thr Ser Pro Thr Arg Val Ser Phe 395 400 405	1255

180
179

cac agc atc aag cag tcc aca gca gtc tga
His Ser Ile Lys Gln Ser Thr Ala Val
410 415

1285

<210> 4
<211> 415
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Gly Gly His Pro Gln Leu Arg Leu Val Lys Ala Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Leu Asn Pro Val Ser Ala Ser Leu Gln Asp Gln His Cys Glu Ser
20 25 30

Leu Ser Leu Ala Ser Asn Ile Ser Gly Leu Gln Cys Asn Ala Ser Val
35 40 45

Asp Leu Ile Gly Thr Cys Trp Pro Arg Ser Pro Ala Gly Gln Leu Val
50 55 60

Val Arg Pro Cys Pro Ala Phe Phe Tyr Gly Val Arg Tyr Asn Thr Thr
65 70 75 80

Asn Asn Gly Tyr Arg Glu Cys Leu Ala Asn Gly Ser Trp Ala Ala Arg
85 90 95

Val Asn Tyr Ser Glu Cys Gln Glu Ile Leu Asn Glu Glu Lys Lys Ser
100 105 110

Lys Val His Tyr His Val Ala Val Ile Ile Asn Tyr Leu Gly His Cys
115 120 125

Ile Ser Leu Val Ala Leu Leu Val Ala Phe Val Leu Phe Leu Arg Leu
130 135 140

Arg Ser Ile Arg Cys Leu Arg Asn Ile Ile His Trp Asn Leu Ile Ser
145 150 155 160

Ala Phe Ile Leu Arg Asn Ala Thr Trp Phe Val Val Gln Leu Thr Met
165 170 175

Ser Pro Glu Val His Gln Ser Asn Val Gly Trp Cys Arg Leu Val Thr
8

181
130

180

185

190

Ala Ala Tyr Asn Tyr Phe His Val Thr Asn Phe Phe Trp Met Phe Gly
 195 200 205

Glu Gly Cys Tyr Leu His Thr Ala Ile Val Leu Thr Tyr Ser Thr Asp
 210 215 220

Arg Leu Arg Lys Trp Met Phe Ile Cys Ile Gly Trp Gly Val Pro Phe
 225 230 235 240

Pro Ile Ile Val Ala Trp Ala Ile Gly Lys Leu Tyr Tyr Asp Asn Glu
 245 250 255

Lys Cys Trp Phe Gly Lys Arg Pro Gly Val Tyr Thr Asp Tyr Ile Tyr
 260 265 270

Gln Gly Pro Met Ile Leu Val Leu Leu Ile Asn Phe Ile Phe Leu Phe
 275 280 285

Asn Ile Val Arg Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser
 290 295 300

Glu Thr Ile Gln Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu
 305 310 315 320

Pro Leu Leu Gly Ile Thr Tyr Met Leu Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu
 325 330 335

Asp Glu Val Ser Arg Val Val Phe Ile Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Glu
 340 345 350

Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ser Val Phe Tyr Cys Phe Leu Asn Ser
 355 360 365

Glu Val Arg Ser Ala Ile Arg Lys Arg Trp His Arg Trp Gln Asp Lys
 370 375 380

His Ser Ile Arg Ala Arg Val Ala Arg Ala Met Ser Ile Pro Thr Ser
 385 390 395 400

Pro Thr Arg Val Ser Phe His Ser Ile Lys Gln Ser Thr Ala Val
 405 410 415

182
131

<210>	5
<211>	1146
<212>	DNA
<213>	Homo sapiens

```
<220>
<221> CDS
<222> (19)..(1146)
```

[illegible]

183
(32)

Tyr Leu His Thr Ala Ile Val Leu Thr Tyr Ser Thr Asp Arg Leu Arg
 175 180 185
 aaa tgg atg ttc atc tgc att ggc tgg ggt gtg ccc ttc ccc atc att 627
 Lys Trp Met Phe Ile Cys Ile Gly Trp Gly Val Pro Phe Pro Ile Ile
 190 195 200
 gtg gcc tgg gcc att ggg aag ctg tac tac gac aat gag aag tgc tgg 675
 Val Ala Trp Ala Ile Gly Lys Leu Tyr Tyr Asp Asn Glu Lys Cys Trp
 205 210 215
 ttt ggc aaa agg cct ggg gtg tac acc gac tac atc tac cag ggc ccc 723
 Phe Gly Lys Arg Pro Gly Val Tyr Thr Asp Tyr Ile Tyr Gln Gly Pro
 220 225 230 235
 atg atc ctg gtc ctg ctg atc aat ttc atc ttc ctt ttc aac atc gtc 771
 Met Ile Leu Val Leu Leu Ile Asn Phe Ile Phe Leu Phe Asn Ile Val
 240 245 250
 cgc atc ctc atg acc aag ctc cgg gca tcc acc acg tct gag acc att 819
 Arg Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser Glu Thr Ile
 255 260 265
 cag tac agg aag gct gtg aaa gcc act ctg gtg ctg ctg ccc ctc ctg 867
 Gln Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu Pro Leu Leu
 270 275 280
 ggc atc acc tac atg ctg ttc ttc gtc aat ccc ggg gag gat gag gtc 915
 Gly Ile Thr Tyr Met Leu Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu Asp Glu Val
 285 290 295
 tcc cgg gtc gtc ttc atc tac ttc aac tcc ttc ctg gaa tcc ttc cag 963
 Ser Arg Val Val Phe Ile Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Glu Ser Phe Gln
 300 305 310 315
 ggc ttc ttt gtg tct gtg ttc tac tgt ttc ctc aat agt gag gtc cgt 1011
 Gly Phe Phe Val Ser Val Phe Tyr Cys Phe Leu Asn Ser Glu Val Arg
 320 325 330
 tct gcc atc cgg aag agg tgg cac cgg tgg cag gac aag cac tcg atc 1059
 Ser Ala Ile Arg Lys Arg Trp His Arg Trp Gln Asp Lys His Ser Ile
 335 340 345
 cgt gcc cga gtg gcc cgt gcc atg tcc atc ccc acc tcc cca acc cgt 1107
 Arg Ala Arg Val Ala Arg Ala Met Ser Ile Pro Thr Ser Pro Thr Arg
 350 355 360
 gtc agc ttt cac agc atc aag cag tcc aca gca gtc tga 1146
 Val Ser Phe His Ser Ile Lys Gln Ser Thr Ala Val
 365 370 375

<210> 6
 <211> 375
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

184
133

<400> 6

Met Gly Gly His Pro Gln Leu Arg Leu Val Lys Ala Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Leu Asn Pro Val Ser Ala Ser Leu Gln Asp Gln His Cys Glu Ser
20 25 30

Leu Ser Leu Ala Ser Asn Ile Ser Asp Asn Gly Tyr Arg Glu Cys Leu
35 40 45

Ala Asn Gly Ser Trp Ala Ala Arg Val Asn Tyr Ser Glu Cys Gln Glu
50 55 60

Ile Leu Asn Glu Glu Lys Lys Ser Lys Val His Tyr His Val Ala Val
65 70 75 80

Ile Ile Asn Tyr Leu Gly His Cys Ile Ser Leu Val Ala Leu Leu Val
85 90 95

Ala Phe Val Leu Phe Leu Arg Leu Arg Ser Ile Arg Cys Leu Arg Asn
100 105 110

Ile Ile His Trp Asn Leu Ile Ser Ala Phe Ile Leu Arg Asn Ala Thr
115 120 125

Trp Phe Val Val Gln Leu Thr Met Ser Pro Glu Val His Gln Ser Asn
130 135 140

Val Gly Trp Cys Arg Leu Val Thr Ala Ala Tyr Asn Tyr Phe His Val
145 150 155 160

Thr Asn Phe Phe Trp Met Phe Gly Glu Gly Cys Tyr Leu His Thr Ala
165 170 175

Ile Val Leu Thr Tyr Ser Thr Asp Arg Leu Arg Lys Trp Met Phe Ile
180 185 190

Cys Ile Gly Trp Gly Val Pro Phe Pro Ile Ile Val Ala Trp Ala Ile
195 200 205

Gly Lys Leu Tyr Tyr Asp Asn Glu Lys Cys Trp Phe Gly Lys Arg Pro
210 215 220

185
134

Gly Val Tyr Thr Asp Tyr Ile Tyr Gln Gly Pro Met Ile Leu Val Leu
225 230 235 240

Leu Ile Asn Phe Ile Phe Leu Phe Asn Ile Val Arg Ile Leu Met Thr
245 250 255

Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser Glu Thr Ile Gln Tyr Arg Lys Ala
260 265 270

Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu Pro Leu Leu Gly Ile Thr Tyr Met
275 280 285

Leu Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu Asp Glu Val Ser Arg Val Val Phe
290 295 300

Ile Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Glu Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ser
305 310 315 320

Val Phe Tyr Cys Phe Leu Asn Ser Glu Val Arg Ser Ala Ile Arg Lys
325 330 335

Arg Trp His Arg Trp Gln Asp Lys His Ser Ile Arg Ala Arg Val Ala
340 345 350

Arg Ala Met Ser Ile Pro Thr Ser Pro Thr Arg Val Ser Phe His Ser
355 360 365

Ile Lys Gln Ser Thr Ala Val
370 375

<210> 7
<211> 1206
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1206)

<400> 7
atg gga ggg cac ccg cag ctc cgt ctc gtc aag gcc ctt ctc ctt ctg 48
Met Gly Gly His Pro Gln Leu Arg Leu Val Lys Ala Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

ggg ctg aac ccc gtc tct gcc tcc ctc cag gac cag cac tgc gag agc 96
Gly Leu Asn Pro Val Ser Ala Ser Leu Gln Asp Gln His Cys Glu Ser

186
135

20										25										30																			
ctg	tcc	ctg	gcc	agc	aac	atc	tca	gga	ctg	cag	tgc	aac	gca	tcc	gtg	144																							
Leu	Ser	Leu	Ala	Ser	Asn	Ile	Ser	Gly	Leu	Gln	Cys	Asn	Ala	Ser	Val																								
35										40										45																			
gac	ctc	att	ggc	acc	tgc	tgg	ccc	cgc	agc	cct	gcg	ggg	cag	cta	gtg	192																							
Asp	Leu	Ile	Gly	Thr	Cys	Trp	Pro	Arg	Ser	Pro	Ala	Gly	Gln	Leu	Val																								
50										55										60																			
gtt	cgg	ccc	tgc	cct	gcc	ttt	ttc	tat	ggg	gtc	cgc	tac	aat	acc	aca	240																							
Val	Arg	Pro	Cys	Pro	Ala	Phe	Phe	Tyr	Gly	Val	Arg	Tyr	Asn	Thr	Thr																								
65										70										75										80									
aac	aat	ggc	tac	cgg	gag	tgc	ctg	gcc	aat	ggc	agc	tgg	gcc	gcc	cgc	288																							
Asn	Asn	Gly	Tyr	Arg	Glu	Cys	Leu	Ala	Asn	Gly	Ser	Trp	Ala	Ala	Arg																								
85										90										95																			
gtg	aat	tac	tcc	gag	tgc	cag	gag	atc	ctc	aat	gag	gag	aaa	aaa	agc	336																							
Val	Asn	Tyr	Ser	Glu	Cys	Gln	Glu	Ile	Leu	Asn	Glu	Glu	Lys	Lys	Ser																								
100										105										110																			
aag	gtg	cac	tac	cat	gtc	gca	gtc	atc	atc	aac	tac	ctg	ggc	cac	tgt	384																							
Lys	Val	His	Tyr	His	Val	Ala	Val	Ile	Ile	Asn	Tyr	Leu	Gly	His	Cys																								
115										120										125																			
atc	tcc	ctg	gtg	gcc	ctc	ctg	gtg	gcc	ttt	gtc	ctc	ttt	ctg	cgg	ctc	432																							
Ile	Ser	Leu	Val	Ala	Leu	Leu	Val	Ala	Phe	Val	Leu	Phe	Leu	Arg	Leu																								
130										135										140																			
agg	agc	atc	cgg	tgc	ctg	cga	aac	atc	atc	cac	tgg	aac	ctc	atc	tcc	480																							
Arg	Ser	Ile	Arg	Cys	Leu	Arg	Asn	Ile	Ile	His	Trp	Asn	Leu	Ile	Ser																								
145										150										155										160									
gcc	ttc	atc	ctg	cgc	aac	gcc	acc	tgg	ttc	gtg	gtc	cag	cta	acc	atg	528																							
Ala	Phe	Ile	Leu	Arg	Asn	Ala	Thr	Trp	Phe	Val	Val	Gln	Leu	Thr	Met																								
165										170										175																			
agc	ccc	gag	gtc	cac	cag	agc	aac	gtg	ggc	tgg	tgc	agg	ttg	gtg	aca	576																							
Ser	Pro	Glu	Val	His	Gln	Ser	Asn	Val	Gly	Trp	Cys	Arg	Leu	Val	Thr																								
180										185										190																			
gcc	gcc	tac	aac	tac	ttc	cat	gtg	acc	aac	ttc	ttc	tgg	atg	ttc	ggc	624																							
Ala	Ala	Tyr	Asn	Tyr	Phe	His	Val	Thr	Asn	Phe	Phe	Trp	Met	Phe	Gly																								
195										200										205																			
gag	ggc	tgc	tac	ctg	cac	aca	gcc	atc	gtg	ctc	acc	tac	tcc	act	gac	672																							
Glu	Gly	Cys	Tyr	Leu	His	Thr	Ala	Ile	Val	Leu	Thr	Tyr	Ser	Thr	Asp																								
210										215										220																			
cgg	ctg	cgc	aaa	tgg	atg	ttc	atc	tgc	att	ggc	tgg	ggg	gtg	ccc	ttc	720																							
Arg	Leu	Arg	Lys	Trp	Met	Phe	Ile	Cys	Ile	Gly	Trp	Gly	Val	Pro	Phe																								
225										230										235										240									
ccc	atc	att	gtg	gcc	tgg	gcc	att	ggg	aag	ctg	tac	tac	gac	aat	gag	768																							
Pro	Ile	Ile	Val	Ala	Trp	Ala	Ile	Gly	Lys	Leu	Tyr	Tyr	Asp	Asn	Glu																								
245										250										255																			

187
136

aag tgc tgg ttt ggc aaa agg cct ggg gtg tac acc gac tac atc tac 816
 Lys Cys Trp Phe Gly Lys Arg Pro Gly Val Tyr Thr Asp Tyr Ile Tyr
 260 265 270

cag ggc ccc atg atc ctg gtc ctg ctg atc aat ttc atc ttc ctt ttc 864
 Gln Gly Pro Met Ile Leu Val Leu Leu Ile Asn Phe Ile Phe Leu Phe
 275 280 285

aac atc gtc cgc atc ctc atg acc aag ctc cgg gca tcc acc acg tct 912
 Asn Ile Val Arg Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser
 290 295 300

gag acc att cag tac agg aag gct gtg aaa gcc act ctg gtg ctg ctg 960
 Glu Thr Ile Gln Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu
 305 310 315 320

ccc ctc ctg ggc atc acc tac atg ctg ttc ttc gtc aat ccc ggg gag 1008
 Pro Leu Leu Gly Ile Thr Tyr Met Leu Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu
 325 330 335

gat gag gtc tcc cgg gtc gtc ttc atc tac ttc aac tcc ttc ctg gaa 1056
 Asp Glu Val Ser Arg Val Val Phe Ile Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Glu
 340 345 350

tcc ttc cag gtc cgt tct gcc atc cgg aag agg tgg cac cgg tgg cag 1104
 Ser Phe Gln Val Arg Ser Ala Ile Arg Lys Arg Trp His Arg Trp Gln
 355 360 365

gac aag cac tcg atc cgt gcc cga gtg gcc cgt gcc atg tcc atc ccc 1152
 Asp Lys His Ser Ile Arg Ala Arg Val Ala Arg Ala Met Ser Ile Pro
 370 375 380

acc tcc cca acc cgt gtc agc ttt cac agc atc aag cag tcc aca gca 1200
 Thr Ser Pro Thr Arg Val Ser Phe His Ser Ile Lys Gln Ser Thr Ala
 385 390 395 400

gtc tga 1206
 Val

<210> 8
 <211> 401
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

Met Gly Gly His Pro Gln Leu Arg Leu Val Lys Ala Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Gly Leu Asn Pro Val Ser Ala Ser Leu Gln Asp Gln His Cys Glu Ser
 20 25 30

188
137

Leu Ser Leu Ala Ser Asn Ile Ser Gly Leu Gln Cys Asn Ala Ser Val
35 40 45

Asp Leu Ile Gly Thr Cys Trp Pro Arg Ser Pro Ala Gly Gln Leu Val
50 55 60

Val Arg Pro Cys Pro Ala Phe Phe Tyr Gly Val Arg Tyr Asn Thr Thr
65 70 75 80

Asn Asn Gly Tyr Arg Glu Cys Leu Ala Asn Gly Ser Trp Ala Ala Arg
85 90 95

Val Asn Tyr Ser Glu Cys Gln Glu Ile Leu Asn Glu Glu Lys Lys Ser
100 105 110

Lys Val His Tyr His Val Ala Val Ile Ile Asn Tyr Leu Gly His Cys
115 120 125

Ile Ser Leu Val Ala Leu Leu Val Ala Phe Val Leu Phe Leu Arg Leu
130 135 140

Arg Ser Ile Arg Cys Leu Arg Asn Ile Ile His Trp Asn Leu Ile Ser
145 150 155 160

Ala Phe Ile Leu Arg Asn Ala Thr Trp Phe Val Val Gln Leu Thr Met
165 170 175

Ser Pro Glu Val His Gln Ser Asn Val Gly Trp Cys Arg Leu Val Thr
180 185 190

Ala Ala Tyr Asn Tyr Phe His Val Thr Asn Phe Phe Trp Met Phe Gly
195 200 205

Glu Gly Cys Tyr Leu His Thr Ala Ile Val Leu Thr Tyr Ser Thr Asp
210 215 220

Arg Leu Arg Lys Trp Met Phe Ile Cys Ile Gly Trp Gly Val Pro Phe
225 230 235 240

Pro Ile Ile Val Ala Trp Ala Ile Gly Lys Leu Tyr Tyr Asp Asn Glu
245 250 255

Lys Cys Trp Phe Gly Lys Arg Pro Gly Val Tyr Thr Asp Tyr Ile Tyr
16

189
188

260

265

270

Gln Gly Pro Met Ile Leu Val Leu Leu Ile Asn Phe Ile Phe Leu Phe
275 280 285

Asn Ile Val Arg Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser
290 295 300

Glu Thr Ile Gln Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu
305 310 315 320

Pro Leu Leu Gly Ile Thr Tyr Met Leu Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu
325 330 335

Asp Glu Val Ser Arg Val Val Phe Ile Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Glu
340 345 350

Ser Phe Gln Val Arg Ser Ala Ile Arg Lys Arg Trp His Arg Trp Gln
355 360 365

Asp Lys His Ser Ile Arg Ala Arg Val Ala Arg Ala Met Ser Ile Pro
370 375 380

Thr Ser Pro Thr Arg Val Ser Phe His Ser Ile Lys Gln Ser Thr Ala
385 390 395 400

Val

<210> 9
<211> 2110
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1236)

<400> 9
atg gac gcg gca ctg ctc cac agc ctg ctg gag gcc aac tgc agc ctg 48
Met Asp Ala Ala Leu Leu His Ser Leu Leu Glu Ala Asn Cys Ser Leu
1 5 10 15

gcg ctg gct gaa gag ctg ctc ttg gac ggc tgg ggg cca ccc ctg gac 96
Ala Leu Ala Glu Glu Leu Leu Leu Asp Gly Trp Gly Pro Pro Leu Asp
20 25 30

190
139

ccc gag ggt ccc tac tcc tac tgc aac acg acc ttg gac cag atc gga 144
 Pro Glu Gly Pro Tyr Ser Tyr Cys Asn Thr Thr Leu Asp Gln Ile Gly
 35 40 45

acg tgc tgg ccc cgc agc gct gcc gga gcc ctc gtg gag agg ccg tgc 192
 Thr Cys Trp Pro Arg Ser Ala Ala Gly Ala Leu Val Glu Arg Pro Cys
 50 55 60

ccc gag tac ttc aac ggc gtc aag tac aac acg acc cgg aat gcc tat 240
 Pro Glu Tyr Phe Asn Gly Val Lys Tyr Asn Thr Thr Arg Asn Ala Tyr
 65 70 75 80

cga gaa tgc ttg gag aat ggg acg tgg gcc tca aag atc aac tac tca 288
 Arg Glu Cys Leu Glu Asn Gly Thr Trp Ala Ser Lys Ile Asn Tyr Ser
 85 90 95

cag tgt gag ccc att ttg gat gac aag cag agg aag tat gac ctg cac 336
 Gln Cys Glu Pro Ile Leu Asp Asp Lys Gln Arg Lys Tyr Asp Leu His
 100 105 110

tac cgc atc gcc ctt gtc gtc aac tac ctg gcc cac tgc gta tct gtg 384
 Tyr Arg Ile Ala Leu Val Val Asn Tyr Leu Gly His Cys Val Ser Val
 115 120 125

gca gcc ctg gtg gcc gcc ttc ctg ctt ttc ctg gcc ctg cgg agc att 432
 Ala Ala Leu Val Ala Ala Phe Leu Leu Phe Leu Ala Leu Arg Ser Ile
 130 135 140

cgc tgt ctg cgg aat gtg att cac tgg aac ctc atc acc acc ttt atc 480
 Arg Cys Leu Arg Asn Val Ile His Trp Asn Leu Ile Thr Thr Phe Ile
 145 150 155 160

ctg cga aat gtc atg tgg ttc ctg ctg cag ctc gtt gac cat gaa gtg 528
 Leu Arg Asn Val Met Trp Phe Leu Leu Gln Leu Val Asp His Glu Val
 165 170 175

cac gag agc aat gag gtc tgg tgc cac tgc atc acc acc atc ttc aac 576
 His Glu Ser Asn Glu Val Trp Cys His Cys Ile Thr Thr Ile Phe Asn
 180 185 190

tac ttc gtg gtg acc aac ttc ttc tgg atg ttt gtg gaa ggc tgc tac 624
 Tyr Phe Val Val Thr Asn Phe Phe Trp Met Phe Val Glu Gly Cys Tyr
 195 200 205

ctg cac acg gcc att gtc atg acc tac tcc act gag cgc ctg cgc aag 672
 Leu His Thr Ala Ile Val Met Thr Tyr Ser Thr Glu Arg Leu Arg Lys
 210 215 220

tgc ctc ttc ctc ttc atc gga tgg tgc atc ccc ttc ccc atc atc gtc 720
 Cys Leu Phe Leu Phe Ile Gly Trp Cys Ile Pro Phe Pro Ile Ile Val
 225 230 235 240

gcc tgg gcc atc ggc aag ctc tac tat gag aat gaa cag tgc tgg ttt 768
 Ala Trp Ala Ile Gly Lys Leu Tyr Tyr Glu Asn Glu Gln Cys Trp Phe
 245 250 255

ggc aag gag cct ggc gac ctg gtg gac tac atc tac caa ggc ccc atc 816

197
190

Gly Lys Glu Pro Gly Asp Leu Val Asp Tyr Ile Tyr Gln Gly Pro Ile	
260 265 270	
att ctc gtg ctc ctg atc aat ttc gta ttt ctg ttc aac atc gtc agg	864
Ile Leu Val Leu Leu Ile Asn Phe Val Phe Leu Phe Asn Ile Val Arg	
275 280 285	
atc cta atg aca aag tta cgc gcg tcc acc aca tcc gag aca atc cag	912
Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser Glu Thr Ile Gln	
290 295 300	
tac agg aag gca gtg aag gcc acc ctg gtg ctc ctg ccc ctc ctg ggc	960
Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu Pro Leu Leu Gly	
305 310 315 320	
atc acc tac atg ctc ttc ttc gtc aat ccc ggg gag gac gac ctg tca	1008
Ile Thr Tyr Met Leu Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu Asp Asp Leu Ser	
325 330 335	
cag atc atg ttc atc tat ttc aac tcc ttc ctg cag tcg ttc cag ggt	1056
Gln Ile Met Phe Ile Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Gln Ser Phe Gln Gly	
340 345 350	
ttc ttc gtg tct gtc ttc tac tgc ttc ttc aat gga gag gtg cgc tca	1104
Phe Phe Val Ser Val Phe Tyr Cys Phe Phe Asn Gly Glu Val Arg Ser	
355 360 365	
gcc gtg agg aag agg tgg cac cgc tgg cag gac cat cac tcc ctt cga	1152
Ala Val Arg Lys Arg Trp His Arg Trp Gln Asp His His Ser Leu Arg	
370 375 380	
gtc ccc atg gcc cgg gcc atg tcc atc cct aca tca ccc aca cgg atc	1200
Val Pro Met Ala Arg Ala Met Ser Ile Pro Thr Ser Pro Thr Arg Ile	
385 390 395 400	
agc ttc cac agc atc aag cag acg gcc gct gtg tga cccctcggtc	1246
Ser Phe His Ser Ile Lys Gln Thr Ala Ala Val	
405 410	
gcccacctgc acagctcccc tgtcctcttc caccttcttc ctctgggttc tctgtgctgg	1306
gcaggctctc gtggggcagg agatgggagg ggagagacca gctctccagc ctggcaggaa	1366
agaggggggtg cggcagccaa gggggactgc aagggacagg gatgagtggg ggccaccagg	1426
ctcagcgcaa gaggaagcag aggggaattca caggaccccc tgagaagagc cagtcagatg	1486
tctgcaggca tttgcccata ccagcctctc tggccagggc cttactgggc ccagagcaga	1546
gaaggacctg tccaacacac acagctattt atagtagcag acacaggggt cccctgccct	1606
actcatggag ccagcagcca ggcaatgggt tggccctgca ctggcccttg gactccacac	1666
tcagtgggtg cctgcagttg ggtgggttaa cgccaagcaa aggatcagtt tggctgcctt	1726
atcccagggc tgtcacctag agaggctcac ttgtacccca cctgttctt gtgtccctc	1786

192
191

cccagccatc ctccccgcct tgggggctcc atgaaggatg caggcttcca ggcttggtt 1846
 cctctcttgg gagaccctt ctctgcctag tccacagatt aggcaatcaa ggaagacgcc 1906
 atcaggggaag ccacatcctt agtcaaccag ttgcatcgtg cggggcaaaa tgaggagcag 1966
 aggcattggag gagggaggcg tgggatggga atagcagaac caccatgtct tcagtgattg 2026
 aaactcatac ccatttgccc ttgtccctcc agtctccctt tcagaaacat ctctgctctc 2086
 tgtgaaataa accatgcctc ttgg 2110

<210> 10
 <211> 411
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

Met Asp Ala Ala Leu Leu His Ser Leu Leu Glu Ala Asn Cys Ser Leu
 1 5 10 15

Ala Leu Ala Glu Glu Leu Leu Leu Asp Gly Trp Gly Pro Pro Leu Asp
 20 25 30

Pro Glu Gly Pro Tyr Ser Tyr Cys Asn Thr Thr Leu Asp Gln Ile Gly
 35 40 45

Thr Cys Trp Pro Arg Ser Ala Ala Gly Ala Leu Val Glu Arg Pro Cys
 50 55 60

Pro Glu Tyr Phe Asn Gly Val Lys Tyr Asn Thr Thr Arg Asn Ala Tyr
 65 70 75 80

Arg Glu Cys Leu Glu Asn Gly Thr Trp Ala Ser Lys Ile Asn Tyr Ser
 85 90 95

Gln Cys Glu Pro Ile Leu Asp Asp Lys Gln Arg Lys Tyr Asp Leu His
 100 105 110

Tyr Arg Ile Ala Leu Val Val Asn Tyr Leu Gly His Cys Val Ser Val
 115 120 125

Ala Ala Leu Val Ala Ala Phe Leu Leu Phe Leu Ala Leu Arg Ser Ile
 130 135 140

Arg Cys Leu Arg Asn Val Ile His Trp Asn Leu Ile Thr Thr Phe Ile
 20

193.
192

145	150					155					160				
Leu	Arg	Asn	Val	Met	Trp	Phe	Leu	Leu	Gln	Leu	Val	Asp	His	Glu	Val
				165					170					175	
His	Glu	Ser	Asn	Glu	Val	Trp	Cys	His	Cys	Ile	Thr	Thr	Ile	Phe	Asn
			180					185					190		
Tyr	Phe	Val	Val	Thr	Asn	Phe	Phe	Trp	Met	Phe	Val	Glu	Gly	Cys	Tyr
		195					200					205			
Leu	His	Thr	Ala	Ile	Val	Met	Thr	Tyr	Ser	Thr	Glu	Arg	Leu	Arg	Lys
	210					215					220				
Cys	Leu	Phe	Leu	Phe	Ile	Gly	Trp	Cys	Ile	Pro	Phe	Pro	Ile	Ile	Val
225					230					235					240
Ala	Trp	Ala	Ile	Gly	Lys	Leu	Tyr	Tyr	Glu	Asn	Glu	Gln	Cys	Trp	Phe
				245					250					255	
Gly	Lys	Glu	Pro	Gly	Asp	Leu	Val	Asp	Tyr	Ile	Tyr	Gln	Gly	Pro	Ile
			260					265					270		
Ile	Leu	Val	Leu	Leu	Ile	Asn	Phe	Val	Phe	Leu	Phe	Asn	Ile	Val	Arg
		275					280					285			
Ile	Leu	Met	Thr	Lys	Leu	Arg	Ala	Ser	Thr	Thr	Ser	Glu	Thr	Ile	Gln
	290					295					300				
Tyr	Arg	Lys	Ala	Val	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Gly
305					310					315					320
Ile	Thr	Tyr	Met	Leu	Phe	Phe	Val	Asn	Pro	Gly	Glu	Asp	Asp	Leu	Ser
				325					330					335	
Gln	Ile	Met	Phe	Ile	Tyr	Phe	Asn	Ser	Phe	Leu	Gln	Ser	Phe	Gln	Gly
			340					345					350		
Phe	Phe	Val	Ser	Val	Phe	Tyr	Cys	Phe	Phe	Asn	Gly	Glu	Val	Arg	Ser
		355					360					365			
Ala	Val	Arg	Lys	Arg	Trp	His	Arg	Trp	Gln	Asp	His	His	Ser	Leu	Arg
370						375					380				

194
193

Val Pro Met Ala Arg Ala Met Ser Ile Pro Thr Ser Pro Thr Arg Ile
385 390 395 400

Ser Phe His Ser Ile Lys Gln Thr Ala Ala Val
405 410

<210> 11
<211> 1600
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (71)..(1387)

<400> 11
ggggctggcc aggggtgtgac caccgtgctg ggcagcaggc tccagtcctt aacccccagc 60
cactactggc atg agg ggt ccc tca ggg ccc cca ggc ctc ctc tac gtc 109
Met Arg Gly Pro Ser Gly Pro Pro Gly Leu Leu Tyr Val
1 5 10
cca cac ctc ctc ctc tgc ctg ctc tgc ctc ctc cca ccg ccg ctc caa 157
Pro His Leu Leu Leu Cys Leu Leu Cys Leu Leu Pro Pro Pro Leu Gln
15 20 25
tac gca gcc ggg cag agc cag atg ccc aaa gac cag ccc ctg tgg gca 205
Tyr Ala Ala Gly Gln Ser Gln Met Pro Lys Asp Gln Pro Leu Trp Ala
30 35 40 45
ctt ctg gag cag tac tgc cac acc atc atg acc ctc acc aac ctc tca 253
Leu Leu Glu Gln Tyr Cys His Thr Ile Met Thr Leu Thr Asn Leu Ser
50 55 60
ggt ccc tac tcc tac tgc aac acg acc ttg gac cag atc gga acg tgc 301
Gly Pro Tyr Ser Tyr Cys Asn Thr Thr Leu Asp Gln Ile Gly Thr Cys
65 70 75
tgg ccc cgc agc gct gcc gga gcc ctc gtg gag agg ccg tgc ccc gag 349
Trp Pro Arg Ser Ala Ala Gly Ala Leu Val Glu Arg Pro Cys Pro Glu
80 85 90
tac ttc aac ggc gtc aag tac aac acg acc cgg aat gcc tat cga gaa 397
Tyr Phe Asn Gly Val Lys Tyr Asn Thr Thr Arg Asn Ala Tyr Arg Glu
95 100 105
tgc ttg gag aat ggg acg tgg gcc tca aag atc aac tac tca cag tgt 445
Cys Leu Glu Asn Gly Thr Trp Ala Ser Lys Ile Asn Tyr Ser Gln Cys
110 115 120 125
gag ccc att ttg gat gac aag cag agg aag tat gac ctg cac tac cgc 493
Glu Pro Ile Leu Asp Asp Lys Gln Arg Lys Tyr Asp Leu His Tyr Arg
130 135 140

195
A4

atc gcc ctt gtc gtc aac tac ctg ggc cac tgc gta tct gtg gca gcc Ile Ala Leu Val Val Asn Tyr Leu Gly His Cys Val Ser Val Ala Ala 145 150 155	541
ctg gtg gcc gcc ttc ctg ctt ttc ctg gcc ctg cgg agc att cgc tgt Leu Val Ala Ala Phe Leu Leu Phe Leu Ala Leu Arg Ser Ile Arg Cys 160 165 170	589
ctg cgg aat gtg att cac tgg aac ctc atc acc acc ttt atc ctg cga Leu Arg Asn Val Ile His Trp Asn Leu Ile Thr Thr Phe Ile Leu Arg 175 180 185	637
aat gtc atg tgg ttc ctg ctg cag ctc gtt gac cat gaa gtg cac gag Asn Val Met Trp Phe Leu Leu Gln Leu Val Asp His Glu Val His Glu 190 195 200 205	685
agc aat gag gtc tgg tgc cgc tgc atc acc acc atc ttc aac tac ttc Ser Asn Glu Val Trp Cys Arg Cys Ile Thr Thr Ile Phe Asn Tyr Phe 210 215 220	733
gtg gtg acc aac ttc ttc tgg atg ttt gtg gaa ggc tgc tac ctg cac Val Val Thr Asn Phe Phe Trp Met Phe Val Glu Gly Cys Tyr Leu His 225 230 235	781
acg gcc att gtc atg acc tac tcc act gag cgc ctg cgc aag tgc ctc Thr Ala Ile Val Met Thr Tyr Ser Thr Glu Arg Leu Arg Lys Cys Leu 240 245 250	829
ttc ctc ttc atc gga tgg tgc atc ccc ttc ccc atc atc gtc gcc tgg Phe Leu Phe Ile Gly Trp Cys Ile Pro Phe Pro Ile Ile Val Ala Trp 255 260 265	877
gcc atc ggc aag ctc tac tat gag aat gaa cag tgc tgg ttt ggc aag Ala Ile Gly Lys Leu Tyr Tyr Glu Asn Glu Gln Cys Trp Phe Gly Lys 270 275 280 285	925
gag cct ggc gac ctg gtg gac tac atc tac caa ggc ccc atc att ctc Glu Pro Gly Asp Leu Val Asp Tyr Ile Tyr Gln Gly Pro Ile Ile Leu 290 295 300	973
gtg ctc ctg atc aat ttc gta ttt ctg ttc aac atc gtc agg atc cta Val Leu Leu Ile Asn Phe Val Phe Leu Phe Asn Ile Val Arg Ile Leu 305 310 315	1021
atg aca aag tta cgc gcg tcc acc aca tcc gag aca atc cag tac agg Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser Glu Thr Ile Gln Tyr Arg 320 325 330	1069
aag gca gtg aag gcc acc ctg gtg ctc ctg ccc ctc ctg ggc atc acc Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu Pro Leu Leu Gly Ile Thr 335 340 345	1117
tac atg ctc ttc ttc gtc aat ccc ggg gag gac gac ctg tca cag atc Tyr Met Leu Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu Asp Asp Leu Ser Gln Ile 350 355 360 365	1165

796
195

atg ttc atc tat ttc aac tcc ttc ctg cag tgc ttc cag ggt ttc ttc 1213
Met Phe Ile Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Gln Ser Phe Gln Gly Phe Phe
370 375 380

gtg tct gtc ttc tac tgc ttc ttc aat gga gag gtg cgc tca gcc gtg 1261
Val Ser Val Phe Tyr Cys Phe Phe Asn Gly Glu Val Arg Ser Ala Val
385 390 395

agg aag agg tgg cac cgc tgg cag gac cat cac tcc ctt cga gtc ccc 1309
Arg Lys Arg Trp His Arg Trp Gln Asp His His Ser Leu Arg Val Pro
400 405 410

atg gcc cgg gcc atg tcc atc cct aca tca ccc aca cgg atc agc ttc 1357
Met Ala Arg Ala Met Ser Ile Pro Thr Ser Pro Thr Arg Ile Ser Phe
415 420 425

cac agc atc aag cag acg gcc gct gtg tga cccctcgggc gccacctgc 1407
His Ser Ile Lys Gln Thr Ala Ala Val
430 435

acagctcccc tgtcctcctc caccttcttc ctctgggttc tctgtgctgg gcaggctctc 1467

gtggggcagg agatgggagg ggagagacca gctctccagc ctggcaggaa agagggggtg 1527

cggcagccaa gggggactgc aagggacagg gatgagtggg ggccaccagg ctcagcgcaa 1587

gaggaagcag agg 1600

<210> 12
<211> 438
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

Met Arg Gly Pro Ser Gly Pro Pro Gly Leu Leu Tyr Val Pro His Leu
1 5 10 15

Leu Leu Cys Leu Leu Cys Leu Leu Pro Pro Pro Leu Gln Tyr Ala Ala
20 25 30

Gly Gln Ser Gln Met Pro Lys Asp Gln Pro Leu Trp Ala Leu Leu Glu
35 40 45

Gln Tyr Cys His Thr Ile Met Thr Leu Thr Asn Leu Ser Gly Pro Tyr
50 55 60

Ser Tyr Cys Asn Thr Thr Leu Asp Gln Ile Gly Thr Cys Trp Pro Arg
65 70 75 80

Ser Ala Ala Gly Ala Leu Val Glu Arg Pro Cys Pro Glu Tyr Phe Asn
24

197
196

85

90

95

Gly Val Lys Tyr Asn Thr Thr Arg Asn Ala Tyr Arg Glu Cys Leu Glu
100 105 110

Asn Gly Thr Trp Ala Ser Lys Ile Asn Tyr Ser Gln Cys Glu Pro Ile
115 120 125

Leu Asp Asp Lys Gln Arg Lys Tyr Asp Leu His Tyr Arg Ile Ala Leu
130 135 140

Val Val Asn Tyr Leu Gly His Cys Val Ser Val Ala Ala Leu Val Ala
145 150 155 160

Ala Phe Leu Leu Phe Leu Ala Leu Arg Ser Ile Arg Cys Leu Arg Asn
165 170 175

Val Ile His Trp Asn Leu Ile Thr Thr Phe Ile Leu Arg Asn Val Met
180 185 190

Trp Phe Leu Leu Gln Leu Val Asp His Glu Val His Glu Ser Asn Glu
195 200 205

Val Trp Cys Arg Cys Ile Thr Thr Ile Phe Asn Tyr Phe Val Val Thr
210 215 220

Asn Phe Phe Trp Met Phe Val Glu Gly Cys Tyr Leu His Thr Ala Ile
225 230 235 240

Val Met Thr Tyr Ser Thr Glu Arg Leu Arg Lys Cys Leu Phe Leu Phe
245 250 255

Ile Gly Trp Cys Ile Pro Phe Pro Ile Ile Val Ala Trp Ala Ile Gly
260 265 270

Lys Leu Tyr Tyr Glu Asn Glu Gln Cys Trp Phe Gly Lys Glu Pro Gly
275 280 285

Asp Leu Val Asp Tyr Ile Tyr Gln Gly Pro Ile Ile Leu Val Leu Leu
290 295 300

Ile Asn Phe Val Phe Leu Phe Asn Ile Val Arg Ile Leu Met Thr Lys
305 310 315 320

198
199

Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser Glu Thr Ile Gln Tyr Arg Lys Ala Val
325 330 335

Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu Pro Leu Leu Gly Ile Thr Tyr Met Leu
340 345 350

Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu Asp Asp Leu Ser Gln Ile Met Phe Ile
355 360 365

Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Gln Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ser Val
370 375 380

Phe Tyr Cys Phe Phe Asn Gly Glu Val Arg Ser Ala Val Arg Lys Arg
385 390 395 400

Trp His Arg Trp Gln Asp His His Ser Leu Arg Val Pro Met Ala Arg
405 410 415

Ala Met Ser Ile Pro Thr Ser Pro Thr Arg Ile Ser Phe His Ser Ile
420 425 430

Lys Gln Thr Ala Ala Val
435

<210> 13
<211> 1558
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (152)..(1345)

<400> 13
ctgtgctcaa gcaatctgcc taccttggt tccccaagtg ctgagattat ggggtgtgagc 60
cactgcacct ggccaagaat ccgaatggat tcaaagatac cttgaaataa ttcctcaatg 120
caacacacac acatatgccca ggggttggtca a atg gga aga gag cct tgg cct 172
Met Gly Arg Glu Pro Trp Pro
1 5
gaa gac agg gac ctg ggc ttt cct cag ctc ttc tgc caa ggt ccc tac 220
Glu Asp Arg Asp Leu Gly Phe Pro Gln Leu Phe Cys Gln Gly Pro Tyr
10 15 20
tcc tac tgc aac acg acc ttg gac cag atc gga acg tgc tgg ccc cgc 268
26

199
198

Ser	Tyr	Cys	Asn	Thr	Thr	Leu	Asp	Gln	Ile	Gly	Thr	Cys	Trp	Pro	Arg		
25						30					35						
agc	gct	gcc	gga	gcc	ctc	gtg	gag	agg	ccg	tgc	ccc	gag	tac	ttc	aac	316	
Ser	Ala	Ala	Gly	Ala	Leu	Val	Glu	Arg	Pro	Cys	Pro	Glu	Tyr	Phe	Asn		
40					45					50					55		
ggc	gtc	aag	tac	aac	acg	acc	cgg	aat	gcc	tat	cga	gaa	tgc	ttg	gag	364	
Gly	Val	Lys	Tyr	Asn	Thr	Thr	Arg	Asn	Ala	Tyr	Arg	Glu	Cys	Leu	Glu		
				60					65					70			
aat	ggg	acg	tgg	gcc	tca	aag	atc	aac	tac	tca	cag	tgt	gag	ccc	att	412	
Asn	Gly	Thr	Trp	Ala	Ser	Lys	Ile	Asn	Tyr	Ser	Gln	Cys	Glu	Pro	Ile		
			75					80					85				
ttg	gat	gac	aag	cag	agg	aag	tat	gac	ctg	cac	tac	cgc	atc	gcc	ctt	460	
Leu	Asp	Asp	Lys	Gln	Arg	Lys	Tyr	Asp	Leu	His	Tyr	Arg	Ile	Ala	Leu		
		90					95					100					
gtc	gtc	aac	tac	ctg	ggc	cac	tgc	gta	tct	gtg	gca	gcc	ctg	gtg	gcc	508	
Val	Val	Asn	Tyr	Leu	Gly	His	Cys	Val	Ser	Val	Ala	Ala	Leu	Val	Ala		
		105				110					115						
gcc	ttc	ctg	ctt	ttc	ctg	gcc	ctg	cgg	agc	att	cgc	tgt	ctg	cgg	aat	556	
Ala	Phe	Leu	Leu	Phe	Leu	Ala	Leu	Arg	Ser	Ile	Arg	Cys	Leu	Arg	Asn		
120					125					130					135		
gtg	att	cac	tgg	aac	ctc	atc	acc	acc	ttt	atc	ctg	cga	aat	gtc	atg	604	
Val	Ile	His	Trp	Asn	Leu	Ile	Thr	Thr	Phe	Ile	Leu	Arg	Asn	Val	Met		
				140					145					150			
tgg	ttc	ctg	ctg	cag	ctc	gtt	gac	cat	gaa	gtg	cac	gag	agc	aat	gag	652	
Trp	Phe	Leu	Leu	Gln	Leu	Val	Asp	His	Glu	Val	His	Glu	Ser	Asn	Glu		
				155				160					165				
gtc	tgg	tgc	cgc	tgc	atc	acc	acc	atc	ttc	aac	tac	ttc	gtg	gtg	acc	700	
Val	Trp	Cys	Arg	Cys	Ile	Thr	Thr	Ile	Phe	Asn	Tyr	Phe	Val	Val	Thr		
		170					175					180					
aac	ttc	ttc	tgg	atg	ttt	gtg	gaa	ggc	tgc	tac	ctg	cac	acg	gcc	att	748	
Asn	Phe	Phe	Trp	Met	Phe	Val	Glu	Gly	Cys	Tyr	Leu	His	Thr	Ala	Ile		
		185				190					195						
gtc	atg	acc	tac	tcc	act	gag	cgc	ctg	cgc	aag	tgc	ctc	ttc	ctc	ttc	796	
Val	Met	Thr	Tyr	Ser	Thr	Glu	Arg	Leu	Arg	Lys	Cys	Leu	Phe	Leu	Phe		
200					205					210					215		
atc	gga	tgg	tgc	atc	ccc	ttc	ccc	atc	atc	gtc	gcc	tgg	gcc	atc	ggc	844	
Ile	Gly	Trp	Cys	Ile	Pro	Phe	Pro	Ile	Ile	Val	Ala	Trp	Ala	Ile	Gly		
				220				225						230			
aag	ctc	tac	tat	gag	aat	gaa	cag	tgc	tgg	ttt	ggc	aag	gag	cct	ggc	892	
Lys	Leu	Tyr	Tyr	Glu	Asn	Glu	Gln	Cys	Trp	Phe	Gly	Lys	Glu	Pro	Gly		
			235					240					245				
gac	ctg	gtg	gac	tac	atc	tac	caa	ggc	ccc	atc	att	ctc	gtg	ctc	ctg	940	
Asp	Leu	Val	Asp	Tyr	Ile	Tyr	Gln	Gly	Pro	Ile	Ile	Leu	Val	Leu	Leu		

200
199

250	255	260	
atc aat ttc gta ttt ctg ttc aac atc gtc agg atc cta atg aca aag Ile Asn Phe Val Phe Leu Phe Asn Ile Val Arg Ile Leu Met Thr Lys 265 270 275			988
tta cgc gcg tcc acc aca tcc gag aca atc cag tac agg aag gca gtg Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser Glu Thr Ile Gln Tyr Arg Lys Ala Val 280 285 290 295			1036
aag gcc acc ctg gtg ctc ctg ccc ctc ctg ggc atc acc tac atg ctc Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu Pro Leu Leu Gly Ile Thr Tyr Met Leu 300 305 310			1084
ttc ttc gtc aat ccc ggg gag gac gac ctg tca cag atc atg ttc atc Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu Asp Asp Leu Ser Gln Ile Met Phe Ile 315 320 325			1132
tat ttc aac tcc ttc ctg cag tgc ttc cag ggt ttc ttc gtg tct gtc Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Gln Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ser Val 330 335 340			1180
ttc tac tgc ttc ttc aat gga gag gtg cgc tca gcc gtg agg aag agg Phe Tyr Cys Phe Phe Asn Gly Glu Val Arg Ser Ala Val Arg Lys Arg 345 350 355			1228
tgg cac cgc tgg cag gac cat cac tcc ctt cga gtc ccc atg gcc cgg Trp His Arg Trp Gln Asp His His Ser Leu Arg Val Pro Met Ala Arg 360 365 370 375			1276
gcc atg tcc atc cct aca tca ccc aca cgg atc agc ttc cac agc atc Ala Met Ser Ile Pro Thr Ser Pro Thr Arg Ile Ser Phe His Ser Ile 380 385 390			1324
aag cag acg gcc gct gtg tga cccctcgggc gccacactgc acagctcccc Lys Gln Thr Ala Ala Val 395			1375
tgctcctc caccctcttc ctctgggttc tctgtgctgg gcaggctctc gtggggcagg			1435
agatgggagg ggagagacca gctctccagc ctggcaggaa agaggggggtg cggcagccaa			1495
gggggactgc aagggacagg gatgagtggg ggccaccagg ctcagcgcaa gaggaagcag			1555
agg			1558

<210> 14
 <211> 397
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14

Met Gly Arg Glu Pro Trp Pro Glu Asp Arg Asp Leu Gly Phe Pro Gln
1 5 10 15

201
26

Leu Phe Cys Gln Gly Pro Tyr Ser Tyr Cys Asn Thr Thr Leu Asp Gln
20 25 30

Ile Gly Thr Cys Trp Pro Arg Ser Ala Ala Gly Ala Leu Val Glu Arg
35 40 45

Pro Cys Pro Glu Tyr Phe Asn Gly Val Lys Tyr Asn Thr Thr Arg Asn
50 55 60

Ala Tyr Arg Glu Cys Leu Glu Asn Gly Thr Trp Ala Ser Lys Ile Asn
65 70 75 80

Tyr Ser Gln Cys Glu Pro Ile Leu Asp Asp Lys Gln Arg Lys Tyr Asp
85 90 95

Leu His Tyr Arg Ile Ala Leu Val Val Asn Tyr Leu Gly His Cys Val
100 105 110

Ser Val Ala Ala Leu Val Ala Ala Phe Leu Leu Phe Leu Ala Leu Arg
115 120 125

Ser Ile Arg Cys Leu Arg Asn Val Ile His Trp Asn Leu Ile Thr Thr
130 135 140

Phe Ile Leu Arg Asn Val Met Trp Phe Leu Leu Gln Leu Val Asp His
145 150 155 160

Glu Val His Glu Ser Asn Glu Val Trp Cys Arg Cys Ile Thr Thr Ile
165 170 175

Phe Asn Tyr Phe Val Val Thr Asn Phe Phe Trp Met Phe Val Glu Gly
180 185 190

Cys Tyr Leu His Thr Ala Ile Val Met Thr Tyr Ser Thr Glu Arg Leu
195 200 205

Arg Lys Cys Leu Phe Leu Phe Ile Gly Trp Cys Ile Pro Phe Pro Ile
210 215 220

Ile Val Ala Trp Ala Ile Gly Lys Leu Tyr Tyr Glu Asn Glu Gln Cys
225 230 235 240

202
201

Trp Phe Gly Lys Glu Pro Gly Asp Leu Val Asp Tyr Ile Tyr Gln Gly
245 250 255

Pro Ile Ile Leu Val Leu Leu Ile Asn Phe Val Phe Leu Phe Asn Ile
260 265 270

Val Arg Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser Glu Thr
275 280 285

Ile Gln Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu Pro Leu
290 295 300

Leu Gly Ile Thr Tyr Met Leu Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu Asp Asp
305 310 315 320

Leu Ser Gln Ile Met Phe Ile Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Gln Ser Phe
325 330 335

Gln Gly Phe Phe Val Ser Val Phe Tyr Cys Phe Phe Asn Gly Glu Val
340 345 350

Arg Ser Ala Val Arg Lys Arg Trp His Arg Trp Gln Asp His His Ser
355 360 365

Leu Arg Val Pro Met Ala Arg Ala Met Ser Ile Pro Thr Ser Pro Thr
370 375 380

Arg Ile Ser Phe His Ser Ile Lys Gln Thr Ala Ala Val
385 390 395

<210> 15
<211> 1411
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<220>
<221> CDS
<222> (80)..(1327)

<400> 15
agaccgcagc cgcccgccct ccgctctggg atgtcggagc gatccaggca tccaggacgc 60
tgacggagcg agcccgagg atg gga cgg cgc ccg cag ctc cgg ctc gtg aag 112
Met Gly Arg Arg Pro Gln Leu Arg Leu Val Lys
1 5 10
gcc ctt ctc ctt ctg ggg ctg aac cct gtg tcc acc tcc ctt cag gat 160
30

203
202

Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Leu	Asn	Pro	Val	Ser	Thr	Ser	Leu	Gln	Asp		
			15					20					25				
cag	cgc	tgt	gag	aac	ctg	tcc	ctg	acc	agc	aat	gtt	tct	ggc	ctg	cag	208	
Gln	Arg	Cys	Glu	Asn	Leu	Ser	Leu	Thr	Ser	Asn	Val	Ser	Gly	Leu	Gln		
		30					35					40					
tgc	aat	gca	tcc	gtg	gac	ctc	att	ggc	acc	tgc	tgg	ccc	cgg	agc	cct	256	
Cys	Asn	Ala	Ser	Val	Asp	Leu	Ile	Gly	Thr	Cys	Trp	Pro	Arg	Ser	Pro		
	45					50					55						
gcg	ggc	cag	ttg	gtg	gtc	cga	ccc	tgc	cct	gcc	ttt	ttc	tac	ggg	gtc	304	
Ala	Gly	Gln	Leu	Val	Val	Arg	Pro	Cys	Pro	Ala	Phe	Phe	Tyr	Gly	Val		
60					65					70					75		
cgc	tac	aac	acg	aca	aac	aat	ggc	tac	cgg	gag	tgc	ctg	gcc	aac	ggc	352	
Arg	Tyr	Asn	Thr	Thr	Asn	Asn	Gly	Tyr	Arg	Glu	Cys	Leu	Ala	Asn	Gly		
			80						85					90			
agc	tgg	gca	gcc	cgt	gtg	aat	tat	tct	gag	tgc	cag	gag	att	ctc	aac	400	
Ser	Trp	Ala	Ala	Arg	Val	Asn	Tyr	Ser	Glu	Cys	Gln	Glu	Ile	Leu	Asn		
			95					100					105				
gaa	gag	aag	aag	agc	aaa	gta	cac	tac	cat	gtt	gca	gtc	atc	atc	aac	448	
Glu	Glu	Lys	Lys	Ser	Lys	Val	His	Tyr	His	Val	Ala	Val	Ile	Ile	Asn		
		110					115					120					
tac	ctg	ggg	cac	tgc	atc	tcc	ctg	gta	gcc	ctc	ctg	gtg	gcc	ttt	gtc	496	
Tyr	Leu	Gly	His	Cys	Ile	Ser	Leu	Val	Ala	Leu	Leu	Val	Ala	Phe	Val		
	125					130					135						
ctc	ttc	ttg	cgg	ctc	agg	agc	atc	cgg	tgc	ctg	aga	aac	atc	atc	cac	544	
Leu	Phe	Leu	Arg	Leu	Arg	Ser	Ile	Arg	Cys	Leu	Arg	Asn	Ile	Ile	His		
140					145				150						155		
tgg	aac	ctc	atc	tgc	gct	ttc	atc	cta	cgc	aac	gcc	acg	tgg	ttt	gtg	592	
Trp	Asn	Leu	Ile	Ser	Ala	Phe	Ile	Leu	Arg	Asn	Ala	Thr	Trp	Phe	Val		
				160				165						170			
gtc	cag	ctc	acc	gtg	agc	ccc	gag	gtg	cac	cag	agc	aat	gtg	gcc	tgg	640	
Val	Gln	Leu	Thr	Val	Ser	Pro	Glu	Val	His	Gln	Ser	Asn	Val	Ala	Trp		
			175					180					185				
tgt	agg	ttg	gtg	aca	gcc	gcc	tac	aat	tac	ttc	cat	gta	acc	aac	ttc	688	
Cys	Arg	Leu	Val	Thr	Ala	Ala	Tyr	Asn	Tyr	Phe	His	Val	Thr	Asn	Phe		
		190					195					200					
ttc	tgg	atg	ttc	ggg	gag	ggc	tgc	tac	ctg	cac	aca	gcc	att	gtg	ctc	736	
Phe	Trp	Met	Phe	Gly	Glu	Gly	Cys	Tyr	Leu	His	Thr	Ala	Ile	Val	Leu		
	205				210						215						
acg	tac	tcc	acc	gac	cgt	ctg	cgc	aag	tgg	atg	ttc	gtc	tgc	att	ggc	784	
Thr	Tyr	Ser	Thr	Asp	Arg	Leu	Arg	Lys	Trp	Met	Phe	Val	Cys	Ile	Gly		
220					225					230					235		
tgg	ggg	gta	cct	ttc	ccc	atc	att	gtg	gct	tgg	gcc	att	ggg	aag	ctg	832	
Trp	Gly	Val	Pro	Phe	Pro	Ile	Ile	Val	Ala	Trp	Ala	Ile	Gly	Lys	Leu		

204
203

240	245	250	
cac tac gac aat gaa aag tgc tgg ttt ggc aaa cgt cct ggg gta tac			880
His Tyr Asp Asn Glu Lys Cys Trp Phe Gly Lys Arg Pro Gly Val Tyr	255	260	265
act gac tac atc tac cag ggc ccc atg atc ctg gtc ctg ctg atc aac			928
Thr Asp Tyr Ile Tyr Gln Gly Pro Met Ile Leu Val Leu Leu Ile Asn	270	275	280
ttt atc ttt ctc ttc aac att gtc cgc atc ctc atg acc aaa ctc cgg			976
Phe Ile Phe Leu Phe Asn Ile Val Arg Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg	285	290	295
gca tcc act aca tct gag acc att cag tac agg aag gct gtg aag gcc			1024
Ala Ser Thr Thr Ser Glu Thr Ile Gln Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala	300	305	310
act ctg gtg ctc ctg ccc ctt ctg ggc atc acc tac atg ttg ttc ttc			1072
Thr Leu Val Leu Leu Pro Leu Leu Gly Ile Thr Tyr Met Leu Phe Phe	320	325	330
gtc aac cct gga gag gac gag gtc tcc agg gtc gtc ttc atc tac ttc			1120
Val Asn Pro Gly Glu Asp Glu Val Ser Arg Val Val Phe Ile Tyr Phe	335	340	345
aac tct ttt ctg gag tcc ttt cag ggc ttc ttt gtg tct gtg ttc tac			1168
Asn Ser Phe Leu Glu Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ser Val Phe Tyr	350	355	360
tgt ttt ctg aac agt gag gtc cgc tcc gct atc cgg aag agg tgg cgt			1216
Cys Phe Leu Asn Ser Glu Val Arg Ser Ala Ile Arg Lys Arg Trp Arg	365	370	375
cgg tgg cag gac aag cac tcc atc aga gcc cga gtg gcc cga gct atg			1264
Arg Trp Gln Asp Lys His Ser Ile Arg Ala Arg Val Ala Arg Ala Met	380	385	390
tcc atc ccc acc tcc ccg acc aga gtc agc ttt cac agc atc aag cag			1312
Ser Ile Pro Thr Ser Pro Thr Arg Val Ser Phe His Ser Ile Lys Gln	400	405	410
tcc aca gca gtg tga gctccaggcc acagagcagc ccccaagacc tgaggccggg			1367
Ser Thr Ala Val	415		
gagatgatgc aagctcactg acgagccagt ctgcagacgc aagc			1411

<210> 16
<211> 415
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus

<400> 16

Met Gly Arg Arg Pro Gln Leu Arg Leu Val Lys Ala Leu Leu Leu Leu

205
204

1 5 10 15
 Gly Leu Asn Pro Val Ser Thr Ser Leu Gln Asp Gln Arg Cys Glu Asn
 20 25 30
 Leu Ser Leu Thr Ser Asn Val Ser Gly Leu Gln Cys Asn Ala Ser Val
 35 40 45
 Asp Leu Ile Gly Thr Cys Trp Pro Arg Ser Pro Ala Gly Gln Leu Val
 50 55 60
 Val Arg Pro Cys Pro Ala Phe Phe Tyr Gly Val Arg Tyr Asn Thr Thr
 65 70 75 80
 Asn Asn Gly Tyr Arg Glu Cys Leu Ala Asn Gly Ser Trp Ala Ala Arg
 85 90 95
 Val Asn Tyr Ser Glu Cys Gln Glu Ile Leu Asn Glu Glu Lys Lys Ser
 100 105 110
 Lys Val His Tyr His Val Ala Val Ile Ile Asn Tyr Leu Gly His Cys
 115 120 125
 Ile Ser Leu Val Ala Leu Leu Val Ala Phe Val Leu Phe Leu Arg Leu
 130 135 140
 Arg Ser Ile Arg Cys Leu Arg Asn Ile Ile His Trp Asn Leu Ile Ser
 145 150 155 160
 Ala Phe Ile Leu Arg Asn Ala Thr Trp Phe Val Val Gln Leu Thr Val
 165 170 175
 Ser Pro Glu Val His Gln Ser Asn Val Ala Trp Cys Arg Leu Val Thr
 180 185 190
 Ala Ala Tyr Asn Tyr Phe His Val Thr Asn Phe Phe Trp Met Phe Gly
 195 200 205
 Glu Gly Cys Tyr Leu His Thr Ala Ile Val Leu Thr Tyr Ser Thr Asp
 210 215 220
 Arg Leu Arg Lys Trp Met Phe Val Cys Ile Gly Trp Gly Val Pro Phe
 225 230 235 240

296
205

Pro Ile Ile Val Ala Trp Ala Ile Gly Lys Leu His Tyr Asp Asn Glu
245 250 255

Lys Cys Trp Phe Gly Lys Arg Pro Gly Val Tyr Thr Asp Tyr Ile Tyr
260 265 270

Gln Gly Pro Met Ile Leu Val Leu Leu Ile Asn Phe Ile Phe Leu Phe
275 280 285

Asn Ile Val Arg Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser
290 295 300

Glu Thr Ile Gln Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu
305 310 315 320

Pro Leu Leu Gly Ile Thr Tyr Met Leu Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu
325 330 335

Asp Glu Val Ser Arg Val Val Phe Ile Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Glu
340 345 350

Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ser Val Phe Tyr Cys Phe Leu Asn Ser
355 360 365

Glu Val Arg Ser Ala Ile Arg Lys Arg Trp Arg Arg Trp Gln Asp Lys
370 375 380

His Ser Ile Arg Ala Arg Val Ala Arg Ala Met Ser Ile Pro Thr Ser
385 390 395 400

Pro Thr Arg Val Ser Phe His Ser Ile Lys Gln Ser Thr Ala Val
405 410 415

<210> 17
<211> 1626
<212> DNA
<213> Rattus norvegicus

<220>
<221> CDS
<222> (216)..(1451)

<400> 17
gcggccctc atctccgtga gccccgaggc ttctcttggc caaggtecta ggagtgatcc 60

207
206

gattgagagc ggcgccccaa agctgccggg ctggccgggg tgggcgggga ggcacctgga 120

cgctgcactc tctggtggct ccgcgtcgcg ccaggteccct cgcagccacg cggggcgcgcg 180

actcccactc ccaacgcgcg cggctccgga ggcga atg gac gcg gcg ctg ctc 233
Met Asp Ala Ala Leu Leu
1 5

ctc agc ctg ctg gag gcc aac tgc agc ctg gca ctg gcc gaa gag ctg 281
Leu Ser Leu Leu Glu Ala Asn Cys Ser Leu Ala Leu Ala Glu Glu Leu
10 15 20

ctt ttg gac ggc tgg gga gag ccc ccg gac ccc gaa ggt ccc tac tcc 329
Leu Leu Asp Gly Trp Gly Glu Pro Pro Asp Pro Glu Gly Pro Tyr Ser
25 30 35

tac tgc aac acg acc ttg gac cag atc ggg acc tgc tgg ccc cag agc 377
Tyr Cys Asn Thr Thr Leu Asp Gln Ile Gly Thr Cys Trp Pro Gln Ser
40 45 50

gcg cct gga gcc cta gtg gag aga cca tgc ccc gaa tac ttc aac ggc 425
Ala Pro Gly Ala Leu Val Glu Arg Pro Cys Pro Glu Tyr Phe Asn Gly
55 60 65 70

atc aag tac aac acg acc cgg aat gcc tac aga gaa tgc ctg gag aat 473
Ile Lys Tyr Asn Thr Thr Arg Asn Ala Tyr Arg Glu Cys Leu Glu Asn
75 80 85

ggg acc tgg gcc tca agg atc aac tac tca cac tgt gaa ccc att ttg 521
Gly Thr Trp Ala Ser Arg Ile Asn Tyr Ser His Cys Glu Pro Ile Leu
90 95 100

gat gac aag cag agg aag tat gac ctg cat tac cga atc gcc ctc atc 569
Asp Asp Lys Gln Arg Lys Tyr Asp Leu His Tyr Arg Ile Ala Leu Ile
105 110 115

atc aac tac ctg ggc cac tgt gtt tcc gtg gtg gcc ctg gtg gct gct 617
Ile Asn Tyr Leu Gly His Cys Val Ser Val Val Ala Leu Val Ala Ala
120 125 130

ttc ctg ctt ttc cta gtg ctg cgg agt atc cgc tgc ctg cgg aat gtg 665
Phe Leu Leu Phe Leu Val Leu Arg Ser Ile Arg Cys Leu Arg Asn Val
135 140 145 150

atc cac tgg aac ctc atc acc acc ttc atc ctg aga aac atc acg tgg 713
Ile His Trp Asn Leu Ile Thr Thr Phe Ile Leu Arg Asn Ile Thr Trp
155 160 165

ttc ctg ctg caa ctc atc gac cac gaa gtg cat gag ggc aat gag gtc 761
Phe Leu Leu Gln Leu Ile Asp His Glu Val His Glu Gly Asn Glu Val
170 175 180

tgg tgc cgc tgc gtc acc acc ata ttc aac tac ttt gtg gtc acc aac 809
Trp Cys Arg Cys Val Thr Thr Ile Phe Asn Tyr Phe Val Val Thr Asn
185 190 195

208
20X

ttc ttc tgg atg ttt gtg gaa ggc tgc tac ctg cac acg gcc atc gtc 857
 Phe Phe Trp Met Phe Val Glu Gly Cys Tyr Leu His Thr Ala Ile Val
 200 205 210

atg acg tac tcc acg gag cat ctg cgc aag tgg ctc ttc ctc ttc att 905
 Met Thr Tyr Ser Thr Glu His Leu Arg Lys Trp Leu Phe Leu Phe Ile
 215 220 225 230

gga tgg tgc ata ccc tgc cct atc att gtc gcc tgg gca gtt ggc aaa 953
 Gly Trp Cys Ile Pro Cys Pro Ile Ile Val Ala Trp Ala Val Gly Lys
 235 240 245

ctc tac tat gag aat gag cag tgc tgg ttt ggc aag gaa cct ggt gac 1001
 Leu Tyr Tyr Glu Asn Glu Gln Cys Trp Phe Gly Lys Glu Pro Gly Asp
 250 255 260

tta gtg gac tac atc tac cag ggc ccc atc atc ctc gtg ctc ctc atc 1049
 Leu Val Asp Tyr Ile Tyr Gln Gly Pro Ile Ile Leu Val Leu Leu Ile
 265 270 275

aat ttt gtg ttt ctg ttc aac atc gtc agg atc ctg atg aca aaa ctg 1097
 Asn Phe Val Phe Leu Phe Asn Ile Val Arg Ile Leu Met Thr Lys Leu
 280 285 290

cga gcc tcc acc aca tcc gag acc atc cag tac agg aag gca gtg aag 1145
 Arg Ala Ser Thr Thr Ser Glu Thr Ile Gln Tyr Arg Lys Ala Val Lys
 295 300 305 310

gcc acc ctg gtc ctc ctc ccc ctg ttg ggc atc acc tac atg ctc ttc 1193
 Ala Thr Leu Val Leu Leu Pro Leu Leu Gly Ile Thr Tyr Met Leu Phe
 315 320 325

ttt gtc aat cct gga gag gac gac ctg tca cag att gtg ttc atc tac 1241
 Phe Val Asn Pro Gly Glu Asp Asp Leu Ser Gln Ile Val Phe Ile Tyr
 330 335 340

ttc aac tct ttc ctg cag tcc ttt cag ggt ttc ttt gtg tcc gtt ttc 1289
 Phe Asn Ser Phe Leu Gln Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ser Val Phe
 345 350 355

tac tgc ttc ttc aat gga gag gtg cgc tcc gcc ctg aga aag cgg tgg 1337
 Tyr Cys Phe Phe Asn Gly Glu Val Arg Ser Ala Leu Arg Lys Arg Trp
 360 365 370

cac cgt tgg cag gac cac cac gcc ctc cga gtg cct gtg gcc cgg gcc 1385
 His Arg Trp Gln Asp His His Ala Leu Arg Val Pro Val Ala Arg Ala
 375 380 385 390

atg tcc att ccc aca tcg ccc acc agg atc agc ttc cac agc atc aag 1433
 Met Ser Ile Pro Thr Ser Pro Thr Arg Ile Ser Phe His Ser Ile Lys
 395 400 405

cag aca gct gcc gtg tga tccccgtgca cccatctgcc cagcaactcca 1481
 Gln Thr Ala Ala Val
 410

ccaccgaggc ggcttctca ttcttcacag ccttccttgg gtctctcttg ctacactgac 1541

209
208

ccttgggtgc aggagaaggg ggggtggatg aactctcctg ccggaagaaa ggaaaactat 1601

gaaatggagg ctctgaaaga ccagg 1626

<210> 18
 <211> 411
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 18

Met Asp Ala Ala Leu Leu Leu Ser Leu Leu Glu Ala Asn Cys Ser Leu
 1 5 10 15

Ala Leu Ala Glu Glu Leu Leu Leu Asp Gly Trp Gly Glu Pro Pro Asp
 20 25 30

Pro Glu Gly Pro Tyr Ser Tyr Cys Asn Thr Thr Leu Asp Gln Ile Gly
 35 40 45

Thr Cys Trp Pro Gln Ser Ala Pro Gly Ala Leu Val Glu Arg Pro Cys
 50 55 60

Pro Glu Tyr Phe Asn Gly Ile Lys Tyr Asn Thr Thr Arg Asn Ala Tyr
 65 70 75 80

Arg Glu Cys Leu Glu Asn Gly Thr Trp Ala Ser Arg Ile Asn Tyr Ser
 85 90 95

His Cys Glu Pro Ile Leu Asp Asp Lys Gln Arg Lys Tyr Asp Leu His
 100 105 110

Tyr Arg Ile Ala Leu Ile Ile Asn Tyr Leu Gly His Cys Val Ser Val
 115 120 125

Val Ala Leu Val Ala Ala Phe Leu Leu Phe Leu Val Leu Arg Ser Ile
 130 135 140

Arg Cys Leu Arg Asn Val Ile His Trp Asn Leu Ile Thr Thr Phe Ile
 145 150 155 160

Leu Arg Asn Ile Thr Trp Phe Leu Leu Gln Leu Ile Asp His Glu Val
 165 170 175

210
209

His Glu Gly Asn Glu Val Trp Cys Arg Cys Val Thr Thr Ile Phe Asn
180 185 190

Tyr Phe Val Val Thr Asn Phe Phe Trp Met Phe Val Glu Gly Cys Tyr
195 200 205

Leu His Thr Ala Ile Val Met Thr Tyr Ser Thr Glu His Leu Arg Lys
210 215 220

Trp Leu Phe Leu Phe Ile Gly Trp Cys Ile Pro Cys Pro Ile Ile Val
225 230 235 240

Ala Trp Ala Val Gly Lys Leu Tyr Tyr Glu Asn Glu Gln Cys Trp Phe
245 250 255

Gly Lys Glu Pro Gly Asp Leu Val Asp Tyr Ile Tyr Gln Gly Pro Ile
260 265 270

Ile Leu Val Leu Leu Ile Asn Phe Val Phe Leu Phe Asn Ile Val Arg
275 280 285

Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser Glu Thr Ile Gln
290 295 300

Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu Pro Leu Leu Gly
305 310 315 320

Ile Thr Tyr Met Leu Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu Asp Asp Leu Ser
325 330 335

Gln Ile Val Phe Ile Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Gln Ser Phe Gln Gly
340 345 350

Phe Phe Val Ser Val Phe Tyr Cys Phe Phe Asn Gly Glu Val Arg Ser
355 360 365

Ala Leu Arg Lys Arg Trp His Arg Trp Gln Asp His His Ala Leu Arg
370 375 380

Val Pro Val Ala Arg Ala Met Ser Ile Pro Thr Ser Pro Thr Arg Ile
385 390 395 400

Ser Phe His Ser Ile Lys Gln Thr Ala Ala Val
38

211
210

405

410

<210> 19
 <211> 1514
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<220>
 <221> CDS
 <222> (44)..(1339)

<400> 19
 gatccctatc cctgagcaag cgagtggcag gatctggtgt ccc atg ggg cac cca 55
 Met Gly His Pro
 1

ggc tct ctt ccc agt gca caa ctc ctc ctc tgc cta tac tct ctg ctc 103
 Gly Ser Leu Pro Ser Ala Gln Leu Leu Leu Cys Leu Tyr Ser Leu Leu
 5 10 15 20

cca ctg ctc cag gtg gcc caa cca ggc agg cca ctc cag gac cag ccc 151
 Pro Leu Leu Gln Val Ala Gln Pro Gly Arg Pro Leu Gln Asp Gln Pro
 25 30 35

ctg tgg aca ctt ttg gag cag tac tgc cat agg acc aca act cgg aat 199
 Leu Trp Thr Leu Leu Glu Gln Tyr Cys His Arg Thr Thr Thr Arg Asn
 40 45 50

ttt tca ggt ccc tac tcc tac tgc tac acg acc ttg gac cag atc ggg 247
 Phe Ser Gly Pro Tyr Ser Tyr Cys Tyr Thr Thr Leu Asp Gln Ile Gly
 55 60 65

acc tgc tgg ccc cag agc gcg cct gga gcc cta gtg gag aga cca tgc 295
 Thr Cys Trp Pro Gln Ser Ala Pro Gly Ala Leu Val Glu Arg Pro Cys
 70 75 80

ccc gaa tac ttc aac ggc atc aag tac aac acg acc cgg aat gcc tac 343
 Pro Glu Tyr Phe Asn Gly Ile Lys Tyr Asn Thr Thr Arg Asn Ala Tyr
 85 90 95 100

aga gaa tgc ctg gag aat ggg acc tgg gcc tca agg atc aac tac tca 391
 Arg Glu Cys Leu Glu Asn Gly Thr Trp Ala Ser Arg Ile Asn Tyr Ser
 105 110 115

cac tgt gaa ccc att ttg gat gac aag cag agg aag tat gac ctg cat 439
 His Cys Glu Pro Ile Leu Asp Asp Lys Gln Arg Lys Tyr Asp Leu His
 120 125 130

tac cga atc gcc ctc atc atc aac tac ctg ggc cac tgt gtt tcc gtg 487
 Tyr Arg Ile Ala Leu Ile Ile Asn Tyr Leu Gly His Cys Val Ser Val
 135 140 145

gtg gcc ctg gtg gct gct ttc ctg ctt ttc cta gtg ctg cgg agt atc 535
 Val Ala Leu Val Ala Ala Phe Leu Leu Phe Leu Val Leu Arg Ser Ile
 150 155 160

212
211

cgc tgc ctg cgg aat gtg atc cac tgg aac ctc atc acc acc ttc atc 583
 Arg Cys Leu Arg Asn Val Ile His Trp Asn Leu Ile Thr Thr Phe Ile
 165 170 175 180

ctg aga aac atc acg tgg ttc ctg ctg caa ctc atc gac cac gaa gtg 631
 Leu Arg Asn Ile Thr Trp Phe Leu Leu Gln Leu Ile Asp His Glu Val
 185 190 195

cat gag ggc aat gag gtc tgg tgc cgc tgc gtc acc acc ata ttc aac 679
 His Glu Gly Asn Glu Val Trp Cys Arg Cys Val Thr Thr Ile Phe Asn
 200 205 210

tac ttt gtg gtc acc aac ttc ttc tgg atg ttt gtg gaa ggc tgc tac 727
 Tyr Phe Val Val Thr Asn Phe Phe Trp Met Phe Val Glu Gly Cys Tyr
 215 220 225

ctg cac acg gcc atc gtc atg acg tac tcc acg gag cat ctg cgc aag 775
 Leu His Thr Ala Ile Val Met Thr Tyr Ser Thr Glu His Leu Arg Lys
 230 235 240

tgg ctc ttc ctc ttc att gga tgg tgc ata ccc tgc cct atc att gtc 823
 Trp Leu Phe Leu Phe Ile Gly Trp Cys Ile Pro Cys Pro Ile Ile Val
 245 250 255 260

gcc tgg gca gtt ggc aaa ctc tac tat gag aat gag cag tgc tgg ttt 871
 Ala Trp Ala Val Gly Lys Leu Tyr Tyr Glu Asn Glu Gln Cys Trp Phe
 265 270 275

ggc aag gaa cct ggt gac tta gtg gac tac atc tac cag ggc ccc atc 919
 Gly Lys Glu Pro Gly Asp Leu Val Asp Tyr Ile Tyr Gln Gly Pro Ile
 280 285 290

atc ctc gtg ctc ctc atc aat ttt gtg ttt ctg ttc aac atc gtc agg 967
 Ile Leu Val Leu Leu Ile Asn Phe Val Phe Leu Phe Asn Ile Val Arg
 295 300 305

atc ctg atg aca aaa ctg cga gcc tcc acc aca tcc gag acc atc cag 1015
 Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser Glu Thr Ile Gln
 310 315 320

tac agg aag gca gtg aag gcc aac ctg gtc ctc ctc ccc ctg ttg ggc 1063
 Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala Asn Leu Val Leu Leu Pro Leu Leu Gly
 325 330 335 340

atc acc tac atg ctc ttc ttt gtc aat cct gga gag gac gac ctg tca 1111
 Ile Thr Tyr Met Leu Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu Asp Asp Leu Ser
 345 350 355

cag att gtg ttc atc tac ttc aac tct ttc ctg cag tcc ttt cag ggt 1159
 Gln Ile Val Phe Ile Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Gln Ser Phe Gln Gly
 360 365 370

ttc ttt gtg tcc gtt ttc tac tgc ttc ttc aat gga gag gtg cgc tcc 1207
 Phe Phe Val Ser Val Phe Tyr Cys Phe Phe Asn Gly Glu Val Arg Ser
 375 380 385

gcc ctg aga aag cgg tgg cac cgt tgg cag gac cac cac gcc ctc cga 1255

213
212

Ala Leu Arg Lys Arg Trp His Arg Trp Gln Asp His His Ala Leu Arg
390 395 400

gtg cct gtg gcc cgg gcc atg tcc att ccc aca tcg ccc acc agg atc 1303
Val Pro Val Ala Arg Ala Met Ser Ile Pro Thr Ser Pro Thr Arg Ile
405 410 415 420

agc ttc cac agc atc aag cag aca gct gcc gtg tga tccccctgtca 1349
Ser Phe His Ser Ile Lys Gln Thr Ala Ala Val
425 430

cccatctgcc cagcaactcca ccaccgaggg ggcttcctca ttcttcacag ccttccttg 1409

gtctctcttg ctacactgac ccttggtgac aggagaaggg ggggtggatg aactctctg 1469

ccggaagaaa ggaaaactat gaaatggagg ctctgaaaga ccagg 1514

<210> 20

<211> 431

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 20

Met Gly His Pro Gly Ser Leu Pro Ser Ala Gln Leu Leu Leu Cys Leu
1 5 10 15

Tyr Ser Leu Leu Pro Leu Leu Gln Val Ala Gln Pro Gly Arg Pro Leu
20 25 30

Gln Asp Gln Pro Leu Trp Thr Leu Leu Glu Gln Tyr Cys His Arg Thr
35 40 45

Thr Thr Arg Asn Phe Ser Gly Pro Tyr Ser Tyr Cys Tyr Thr Thr Leu
50 55 60

Asp Gln Ile Gly Thr Cys Trp Pro Gln Ser Ala Pro Gly Ala Leu Val
65 70 75 80

Glu Arg Pro Cys Pro Glu Tyr Phe Asn Gly Ile Lys Tyr Asn Thr Thr
85 90 95

Arg Asn Ala Tyr Arg Glu Cys Leu Glu Asn Gly Thr Trp Ala Ser Arg
100 105 110

Ile Asn Tyr Ser His Cys Glu Pro Ile Leu Asp Asp Lys Gln Arg Lys
115 120 125

214
213

Tyr Asp Leu His Tyr Arg Ile Ala Leu Ile Ile Asn Tyr Leu Gly His
130 135 140

Cys Val Ser Val Val Ala Leu Val Ala Ala Phe Leu Leu Phe Leu Val
145 150 155 160

Leu Arg Ser Ile Arg Cys Leu Arg Asn Val Ile His Trp Asn Leu Ile
165 170 175

Thr Thr Phe Ile Leu Arg Asn Ile Thr Trp Phe Leu Leu Gln Leu Ile
180 185 190

Asp His Glu Val His Glu Gly Asn Glu Val Trp Cys Arg Cys Val Thr
195 200 205

Thr Ile Phe Asn Tyr Phe Val Val Thr Asn Phe Phe Trp Met Phe Val
210 215 220

Glu Gly Cys Tyr Leu His Thr Ala Ile Val Met Thr Tyr Ser Thr Glu
225 230 235 240

His Leu Arg Lys Trp Leu Phe Leu Phe Ile Gly Trp Cys Ile Pro Cys
245 250 255

Pro Ile Ile Val Ala Trp Ala Val Gly Lys Leu Tyr Tyr Glu Asn Glu
260 265 270

Gln Cys Trp Phe Gly Lys Glu Pro Gly Asp Leu Val Asp Tyr Ile Tyr
275 280 285

Gln Gly Pro Ile Ile Leu Val Leu Leu Ile Asn Phe Val Phe Leu Phe
290 295 300

Asn Ile Val Arg Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser
305 310 315 320

Glu Thr Ile Gln Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala Asn Leu Val Leu Leu
325 330 335

Pro Leu Leu Gly Ile Thr Tyr Met Leu Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu
340 345 350

Asp Asp Leu Ser Gln Ile Val Phe Ile Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Gln

215
214

355				360				365							
Ser	Phe	Gln	Gly	Phe	Phe	Val	Ser	Val	Phe	Tyr	Cys	Phe	Phe	Asn	Gly
370				375				380							
Glu	Val	Arg	Ser	Ala	Leu	Arg	Lys	Arg	Trp	His	Arg	Trp	Gln	Asp	His
385				390				395				400			
His	Ala	Leu	Arg	Val	Pro	Val	Ala	Arg	Ala	Met	Ser	Ile	Pro	Thr	Ser
				405				410				415			
Pro	Thr	Arg	Ile	Ser	Phe	His	Ser	Ile	Lys	Gln	Thr	Ala	Ala	Val	
420				425				430							

```
<210> 21
<211> 2273
<212> DNA
<213> Mus musculus
```

```
<220>
<221> CDS
<222> (32) .. (1279)
```

[illegible]

2/16
2/15

gag att ctc aac gaa gag aag aag agc aaa gtg cac tac cac att gcc 388
Glu Ile Leu Asn Glu Glu Lys Lys Ser Lys Val His Tyr His Ile Ala
105 110 115

gtc atc atc aac tac ctg ggc cac tgc atc tcc ctg gtg gcc ctc ctg 436
Val Ile Ile Asn Tyr Leu Gly His Cys Ile Ser Leu Val Ala Leu Leu
120 125 130 135

gtg gcc ttt gtc ctc ttc ctg cgg ctc agg agc atc cgg tgc ctg agg 484
Val Ala Phe Val Leu Phe Leu Arg Leu Arg Ser Ile Arg Cys Leu Arg
140 145 150

aac atc atc cac tgg aac ctc atc tgc gct ttc atc ctg cgc aac gcc 532
Asn Ile Ile His Trp Asn Leu Ile Ser Ala Phe Ile Leu Arg Asn Ala
155 160 165

acg tgg ttt gtg gtc cag ctc acc gtg agc ccc gag gtc cac cag agc 580
Thr Trp Phe Val Val Gln Leu Thr Val Ser Pro Glu Val His Gln Ser
170 175 180

aac gtg gcc tgg tgc agg ctg gtg aca gcc gcc tac aac tac ttc cac 628
Asn Val Ala Trp Cys Arg Leu Val Thr Ala Ala Tyr Asn Tyr Phe His
185 190 195

gta acc aac ttc ttc tgg atg ttc ggt gag ggc tgc tac ctg cac aca 676
Val Thr Asn Phe Phe Trp Met Phe Gly Glu Gly Cys Tyr Leu His Thr
200 205 210 215

gcc atc gta ctc acg tac tcc acc gac cgt ctg cgc aag tgg atg ttc 724
Ala Ile Val Leu Thr Tyr Ser Thr Asp Arg Leu Arg Lys Trp Met Phe
220 225 230

gtc tgc atc ggc tgg ggt gtg cct ttc ccc atc att gtg gct tgg gcc 772
Val Cys Ile Gly Trp Gly Val Pro Phe Pro Ile Ile Val Ala Trp Ala
235 240 245

att ggg aaa ctt tac tac gac aat gaa aag tgc tgg ttt ggc aaa cgt 820
Ile Gly Lys Leu Tyr Tyr Asp Asn Glu Lys Cys Trp Phe Gly Lys Arg
250 255 260

cct gga gta tat act gac tac atc tac cag ggc ccc atg atc ctg gtc 868
Pro Gly Val Tyr Thr Asp Tyr Ile Tyr Gln Gly Pro Met Ile Leu Val
265 270 275

ctg ctg atc aac ttt atc ttt ctc ttc aac att gtc cgc atc ctc atg 916
Leu Leu Ile Asn Phe Ile Phe Leu Phe Asn Ile Val Arg Ile Leu Met
280 285 290 295

acc aaa ctc cga gca tcc acc aca tct gag act att cag tac agg aag 964
Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser Glu Thr Ile Gln Tyr Arg Lys
300 305 310

gct gtg aag gcc act ctg gtg ctc ttg ccc ctc ctg ggc atc acc tac 1012
Ala Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu Pro Leu Leu Gly Ile Thr Tyr
315 320 325

atg ttg ttc ttc gtc aac cct ggg gag gac gag gtc tcc agg gtt gtc 1060

217
216

Met Leu Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu Asp Glu Val Ser Arg Val Val
 330 335 340

ttc atc tac ttc aac tct ttc ctg gag tcc ttt cag ggc ttc ttc gtg 1108
 Phe Ile Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Glu Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val
 345 350 355

tct gtg ttc tat tgt ttt ctg aac agt gag gtc cgc tct gcc atc cgg 1156
 Ser Val Phe Tyr Cys Phe Leu Asn Ser Glu Val Arg Ser Ala Ile Arg
 360 365 370 375

aag agg tgg cgg cga tgg cag gac aag cac tcc atc aga gcc cga gtg 1204
 Lys Arg Trp Arg Arg Trp Gln Asp Lys His Ser Ile Arg Ala Arg Val
 380 385 390

gcc cgc gcc atg tcc atc ccc acc tcc ccc acc aga gtc agc ttc cac 1252
 Ala Arg Ala Met Ser Ile Pro Thr Ser Pro Thr Arg Val Ser Phe His
 395 400 405

agc atc aag cag tcc aca gca gtg tga acctcaggcc acagagcagc 1299
 Ser Ile Lys Gln Ser Thr Ala Val
 410 415

ccccaagacc cgaggctggg gaaatgatgc aagctcacta gcgagcctgt ctgcagaggc 1359

aggcagcctt cccatccctg cccctgggat gcagacctgt aagcctgccc agccgtggac 1419

aaagcccata gcactggggg gggcccttgg catctagctc cctgctgccc attctccctg 1479

ggaagttgaa atgggcattg ggggctggaa accctgcagc agtttgatgg gcctgtgagc 1539

gctgtcttct cccagagcag cttactgaag atctgtctgc tccaggagct gttggggagg 1599

ccaactgtta ccctggggca tcatggaaaa ctcccttctg agactgtaaa gtctctgagt 1659

gttagcgatg ccttgggatg ctaccgagga ccaacatggt ccagtcagga gaccgggaga 1719

tagcggtaga aatctgggaa cgtcatcaga tggcactcca cctccctaca agtcactcct 1779

gagccaccag gatttcatca gcactgtggc actgccactg gaaagccctg ccttgctgct 1839

ttgctgccct gcacctttag acatttacta ttctgcaggc caagccagct ttctgtcact 1899

tatccactga cagcaacggt cccctcgccc ccaaactcctc ccacctctgg gtatcttcta 1959

acctgtgaga agatgggggt cgggaagggg accttgagttg ccaggaacca gagtgggccc 2019

agtctatgag gaaggagtgg cccctgggta cccaggccac tggcttcagt ggctggcctc 2079

ttgaacacag tcacaagctg ggggaaggat ctattcaagt gccctgacca gcgacagggtg 2139

gctcctggga caactaacta actaagccct tgctcccagg cttggaatgg cccagtcctc 2199

agtgggtagg agagctgagg agccgcagca ggactgaggt gggggtgata taaataatat 2259

ttatcttttc aact 2273

218
217

<210> 22
 <211> 415
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 22

Met Gly Gln Arg Pro Gln Leu Arg Leu Val Lys Ala Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Gly Leu Asn Pro Val Ser Thr Ser Leu Gln Asp Gln Gln Cys Glu Ser
 20 25 30

Leu Ser Leu Ala Ser Asn Val Ser Gly Leu Gln Cys Asn Ala Ser Val
 35 40 45

Asp Leu Ile Gly Thr Cys Trp Pro Arg Ser Pro Ala Gly Gln Leu Val
 50 55 60

Val Arg Pro Cys Pro Ala Phe Phe Tyr Gly Val Arg Tyr Asn Thr Thr
 65 70 75 80

Asn Asn Gly Tyr Arg Glu Cys Leu Ala Asn Gly Ser Trp Ala Ala Arg
 85 90 95

Val Asn Tyr Ser Glu Cys Gln Glu Ile Leu Asn Glu Glu Lys Lys Ser
 100 105 110

Lys Val His Tyr His Ile Ala Val Ile Ile Asn Tyr Leu Gly His Cys
 115 120 125

Ile Ser Leu Val Ala Leu Leu Val Ala Phe Val Leu Phe Leu Arg Leu
 130 135 140

Arg Ser Ile Arg Cys Leu Arg Asn Ile Ile His Trp Asn Leu Ile Ser
 145 150 155 160

Ala Phe Ile Leu Arg Asn Ala Thr Trp Phe Val Val Gln Leu Thr Val
 165 170 175

Ser Pro Glu Val His Gln Ser Asn Val Ala Trp Cys Arg Leu Val Thr
 180 185 190

Ala Ala Tyr Asn Tyr Phe His Val Thr Asn Phe Phe Trp Met Phe Gly
 46

219.
218

195

200

205

Glu Gly Cys Tyr Leu His Thr Ala Ile Val Leu Thr Tyr Ser Thr Asp
210 215 220

Arg Leu Arg Lys Trp Met Phe Val Cys Ile Gly Trp Gly Val Pro Phe
225 230 235 240

Pro Ile Ile Val Ala Trp Ala Ile Gly Lys Leu Tyr Tyr Asp Asn Glu
245 250 255

Lys Cys Trp Phe Gly Lys Arg Pro Gly Val Tyr Thr Asp Tyr Ile Tyr
260 265 270

Gln Gly Pro Met Ile Leu Val Leu Leu Ile Asn Phe Ile Phe Leu Phe
275 280 285

Asn Ile Val Arg Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser
290 295 300

Glu Thr Ile Gln Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu
305 310 315 320

Pro Leu Leu Gly Ile Thr Tyr Met Leu Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu
325 330 335

Asp Glu Val Ser Arg Val Val Phe Ile Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Glu
340 345 350

Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ser Val Phe Tyr Cys Phe Leu Asn Ser
355 360 365

Glu Val Arg Ser Ala Ile Arg Lys Arg Trp Arg Arg Trp Gln Asp Lys
370 375 380

His Ser Ile Arg Ala Arg Val Ala Arg Ala Met Ser Ile Pro Thr Ser
385 390 395 400

Pro Thr Arg Val Ser Phe His Ser Ile Lys Gln Ser Thr Ala Val
405 410 415

<210> 23
<211> 1374

220
219

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (79)..(1374)

<400> 23

```

gccggacaga cctcctttgg aagcagccac ttctgggtccc catccctgga gcgatcgagc      60
ggcaggatct gctgtccc atg ggg acc cca ggc tct ctt ccc agt gca cag      111
                Met Gly Thr Pro Gly Ser Leu Pro Ser Ala Gln
                1                    5                    10

ctt ctc ctc tgc ctg ttt tcc ctg ctt cca gtg ctc cag gtg gcc caa      159
Leu Leu Leu Cys Leu Phe Ser Leu Leu Pro Val Leu Gln Val Ala Gln
                15                    20                    25

cca ggc cag gca ccc cag gac cag ccc ctg tgg aca ctt ttg gag cag      207
Pro Gly Gln Ala Pro Gln Asp Gln Pro Leu Trp Thr Leu Leu Glu Gln
                30                    35                    40

tac tgc cac agg acc aca att ggg aat ttt tca ggt ccc tac acc tac      255
Tyr Cys His Arg Thr Thr Ile Gly Asn Phe Ser Gly Pro Tyr Thr Tyr
                45                    50                    55

tgc aac acg acc ttg gac cag atc ggg acc tgc tgg cca cag agc gca      303
Cys Asn Thr Thr Leu Asp Gln Ile Gly Thr Cys Trp Pro Gln Ser Ala
        60                    65                    70                    75

ccc gga gcc cta gta gag aga ccg tgc ccc gag tac ttc aat ggc atc      351
Pro Gly Ala Leu Val Glu Arg Pro Cys Pro Glu Tyr Phe Asn Gly Ile
                80                    85                    90

aag tac aac acg acc cgg aat gcc tac aga gag tgc ctg gag aac ggg      399
Lys Tyr Asn Thr Thr Arg Asn Ala Tyr Arg Glu Cys Leu Glu Asn Gly
                95                    100                    105

acc tgg gcc tca agg gtc aac tac tca cac tgc gaa ccc att ttg gat      447
Thr Trp Ala Ser Arg Val Asn Tyr Ser His Cys Glu Pro Ile Leu Asp
                110                    115                    120

gac aag cag aga aag tat gac ctg cat tac cga atc gcc ctc att gtc      495
Asp Lys Gln Arg Lys Tyr Asp Leu His Tyr Arg Ile Ala Leu Ile Val
                125                    130                    135

aac tac ctg ggt cac tgt gtt tcc gtg gtg gcc ctg gtg gcc gct ttc      543
Asn Tyr Leu Gly His Cys Val Ser Val Val Ala Leu Val Ala Ala Phe
        140                    145                    150                    155

ctg ctt ttc cta gtg ctg cgg agt atc cgc tgc ctg agg aat gtg atc      591
Leu Leu Phe Leu Val Leu Arg Ser Ile Arg Cys Leu Arg Asn Val Ile
                160                    165                    170

cac tgg aac ctc atc acc acc ttc att ctg aga aac atc gcg tgg ttc      639
His Trp Asn Leu Ile Thr Thr Phe Ile Leu Arg Asn Ile Ala Trp Phe
                175                    180                    185

```

221
210

ctg ctg caa ctc atc gac cac gaa gtg cac gag ggc aat gag gtc tgg Leu Leu Gln Leu Ile Asp His Glu Val His Glu Gly Asn Glu Val Trp 190 195 200	687
tgc cgc tgc atc acc acc atc ttc aac tat ttt gtg gtc acc aac ttc Cys Arg Cys Ile Thr Thr Ile Phe Asn Tyr Phe Val Val Thr Asn Phe 205 210 215	735
ttc tgg atg ttt gtg gag ggc tgc tac ctg cac acg gcc att gtc atg Phe Trp Met Phe Val Glu Gly Cys Tyr Leu His Thr Ala Ile Val Met 220 225 230 235	783
acg tac tcc aca gag cac ctg cgc aag tgg ctt ttc ctc ttc att gga Thr Tyr Ser Thr Glu His Leu Arg Lys Trp Leu Phe Leu Phe Ile Gly 240 245 250	831
tgg tgc att ccc tgc cct atc atc atc gcc tgg gca gtt ggc aaa ctc Trp Cys Ile Pro Cys Pro Ile Ile Ile Ala Trp Ala Val Gly Lys Leu 255 260 265	879
tac tat gag aat gag cag tgc tgg ttt ggc aag gaa gct ggt gat ttg Tyr Tyr Glu Asn Glu Gln Cys Trp Phe Gly Lys Glu Ala Gly Asp Leu 270 275 280	927
gtg gac tac atc tac cag ggc ccc gtc atg ctt gtg ctg ttg atc aat Val Asp Tyr Ile Tyr Gln Gly Pro Val Met Leu Val Leu Leu Ile Asn 285 290 295	975
ttt gta ttt ctg ttt aac atc gtc agg atc ctg atg acg aag tta cga Phe Val Phe Leu Phe Asn Ile Val Arg Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg 300 305 310 315	1023
gca tcc acc acg tcc gag aca atc caa tac agg aag gca gtg aag gcc Ala Ser Thr Thr Ser Glu Thr Ile Gln Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala 320 325 330	1071
acg ctg gtc ctc ctc ccc ctg ttg ggc atc acc tac atg ctc ttc ttt Thr Leu Val Leu Leu Pro Leu Leu Gly Ile Thr Tyr Met Leu Phe Phe 335 340 345	1119
gtc aat cct ggc gag gac gac ctg tcc cag att gtg ttc atc tac ttc Val Asn Pro Gly Glu Asp Asp Leu Ser Gln Ile Val Phe Ile Tyr Phe 350 355 360	1167
aac tct ttc ctg cag tcc ttc cag ggt ttc ttt gtg tcc gtt ttc tac Asn Ser Phe Leu Gln Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ser Val Phe Tyr 365 370 375	1215
tgc ttc ttc aat gga gag gtg cgc gcg gcc ctg aga aag cgg tgg cac Cys Phe Phe Asn Gly Glu Val Arg Ala Ala Leu Arg Lys Arg Trp His 380 385 390 395	1263
cgc tgg cag gac cac cac gcc ctc cgg gtg cct gtg gcc cgg gcc atg Arg Trp Gln Asp His His Ala Leu Arg Val Pro Val Ala Arg Ala Met 400 405 410	1311

tcc atc cct acg tcg ccc acc agg atc agc ttc cac agc atc aag cag 1359
Ser Ile Pro Thr Ser Pro Thr Arg Ile Ser Phe His Ser Ile Lys Gln
415 420 425

aca gct gct gtg tga 1374
Thr Ala Ala Val
430

```
<210> 24
<211> 431
<212> PRT
<213> Mus musculus
```

<400> 24

Met Gly Thr Pro Gly Ser Leu Pro Ser Ala Gln Leu Leu Leu Cys Leu
1 5 10 15

Phe Ser Leu Leu Pro Val Leu Gln Val Ala Gln Pro Gly Gln Ala Pro
20 25 30

Gln Asp Gln Pro Leu Trp Thr Leu Leu Glu Gln Tyr Cys His Arg Thr
35 40 45

Thr Ile Gly Asn Phe Ser Gly Pro Tyr Thr Tyr Cys Asn Thr Thr Leu
50 55 60

Asp Gln Ile Gly Thr Cys Trp Pro Gln Ser Ala Pro Gly Ala Leu Val
65 70 75 80

Glu Arg Pro Cys Pro Glu Tyr Phe Asn Gly Ile Lys Tyr Asn Thr Thr
85 90 95

Arg Asn Ala Tyr Arg Glu Cys Leu Glu Asn Gly Thr Trp Ala Ser Arg
100 105 110

Val Asn Tyr Ser His Cys Glu Pro Ile Leu Asp Asp Lys Gln Arg Lys
115 120 125

Tyr Asp Leu His Tyr Arg Ile Ala Leu Ile Val Asn Tyr Leu Gly His
130 135 140

Cys Val Ser Val Val Ala Leu Val Ala Ala Phe Leu Leu Phe Leu Val
145 150 155 160

Leu Arg Ser Ile Arg Cys Leu Arg Asn Val Ile His Trp Asn Leu Ile

223
222

165

170

175

Thr Thr Phe Ile Leu Arg Asn Ile Ala Trp Phe Leu Leu Gln Leu Ile
180 185 190

Asp His Glu Val His Glu Gly Asn Glu Val Trp Cys Arg Cys Ile Thr
195 200 205

Thr Ile Phe Asn Tyr Phe Val Val Thr Asn Phe Phe Trp Met Phe Val
210 215 220

Glu Gly Cys Tyr Leu His Thr Ala Ile Val Met Thr Tyr Ser Thr Glu
225 230 235 240

His Leu Arg Lys Trp Leu Phe Leu Phe Ile Gly Trp Cys Ile Pro Cys
245 250 255

Pro Ile Ile Ile Ala Trp Ala Val Gly Lys Leu Tyr Tyr Glu Asn Glu
260 265 270

Gln Cys Trp Phe Gly Lys Glu Ala Gly Asp Leu Val Asp Tyr Ile Tyr
275 280 285

Gln Gly Pro Val Met Leu Val Leu Leu Ile Asn Phe Val Phe Leu Phe
290 295 300

Asn Ile Val Arg Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser
305 310 315 320

Glu Thr Ile Gln Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu
325 330 335

Pro Leu Leu Gly Ile Thr Tyr Met Leu Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu
340 345 350

Asp Asp Leu Ser Gln Ile Val Phe Ile Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Gln
355 360 365

Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ser Val Phe Tyr Cys Phe Phe Asn Gly
370 375 380

Glu Val Arg Ala Ala Leu Arg Lys Arg Trp His Arg Trp Gln Asp His
385 390 395 400

7/24
203

His Ala Leu Arg Val Pro Val Ala Arg Ala Met Ser Ile Pro Thr Ser
405 410 415

Pro Thr Arg Ile Ser Phe His Ser Ile Lys Gln Thr Ala Ala Val
420 425 430

<210> 25
<211> 2617
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (132)..(1424)

<400> 25
gggcattacc ttggtgggta ggtcgggcag ggtaggacag gcctaagaga gaggccggac 60
agacctcctt tggaagcagc cacttctggt ccccatcctt ggagcgatcg agcggcagga 120
tctgctgtcc c atg ggg acc cca ggc tct ctt ccc agt gca cag ctt ctc 170
Met Gly Thr Pro Gly Ser Leu Pro Ser Ala Gln Leu Leu
1 5 10
ctc tgc ctg ttt tcc ctg ctt cca gtg ctc cag gtg gcc caa cca ggc 218
Leu Cys Leu Phe Ser Leu Leu Pro Val Leu Gln Val Ala Gln Pro Gly
15 20 25
cag gca ccc cag gac cag ccc ctg tgg aca ctt ttg gag cag tac tgc 266
Gln Ala Pro Gln Asp Gln Pro Leu Trp Thr Leu Leu Glu Gln Tyr Cys
30 35 40 45
cac agg acc aca att ggg aat ttt tca ggt ccc tac acc tac tgc aac 314
His Arg Thr Thr Ile Gly Asn Phe Ser Gly Pro Tyr Thr Tyr Cys Asn
50 55 60
acg acc ttg gac cag atc ggg acc tgc tgg cca cag agc gca ccc gga 362
Thr Thr Leu Asp Gln Ile Gly Thr Cys Trp Pro Gln Ser Ala Pro Gly
65 70 75
gcc cta gta gag aga ccg tgc ccc gag tac ttc aat ggc atc aag tac 410
Ala Leu Val Glu Arg Pro Cys Pro Glu Tyr Phe Asn Gly Ile Lys Tyr
80 85 90
aac acg acc cgg aat gcc tac aga gag tgc ctg gag aac ggg acc tgg 458
Asn Thr Thr Arg Asn Ala Tyr Arg Glu Cys Leu Glu Asn Gly Thr Trp
95 100 105
gcc tca agg gtc aac tac tca cac tgc gaa ccc att ttg gat gac aag 506
Ala Ser Arg Val Asn Tyr Ser His Cys Glu Pro Ile Leu Asp Asp Lys
110 115 120 125
aga aag tat gac ctg cat tac cga atc gcc ctc att gtc aac tac ctg 554

2/25
224

Arg Lys Tyr Asp Leu His Tyr Arg Ile Ala Leu Ile Val Asn Tyr Leu	
130 135 140	
ggt cac tgt gtt tcc gtg gtg gcc ctg gtg gcc gct ttc ctg ctt ttc	602
Gly His Cys Val Ser Val Val Ala Leu Val Ala Ala Phe Leu Leu Phe	
145 150 155	
cta gtg ctg cgg agt atc cgc tgc ctg agg aat gtg atc cac tgg aac	650
Leu Val Leu Arg Ser Ile Arg Cys Leu Arg Asn Val Ile His Trp Asn	
160 165 170	
ctc atc acc acc ttc att ctg aga aac atc gcg tgg ttc ctg ctg caa	698
Leu Ile Thr Thr Phe Ile Leu Arg Asn Ile Ala Trp Phe Leu Leu Gln	
175 180 185	
ctc atc gac cac gaa gtg cac gag gcc aat gag gtc tgg tgc cgc tgc	746
Leu Ile Asp His Glu Val His Glu Gly Asn Glu Val Trp Cys Arg Cys	
190 195 200 205	
atc acc acc atc ttc aac tat ttt gtg gtc acc aac ttc ttc tgg atg	794
Ile Thr Thr Ile Phe Asn Tyr Phe Val Val Thr Asn Phe Phe Trp Met	
210 215 220	
ttt gtg gag gcc tgc tac ctg cac acg gcc att gtc atg acg tac tcc	842
Phe Val Glu Gly Cys Tyr Leu His Thr Ala Ile Val Met Thr Tyr Ser	
225 230 235	
aca gag cac ctg cgc aag tgg ctt ttc ctc ttc att gga tgg tgc att	890
Thr Glu His Leu Arg Lys Trp Leu Phe Leu Phe Ile Gly Trp Cys Ile	
240 245 250	
ccc tgc cct atc atc atc gcc tgg gca gtt gcc aaa ctc tac tat gag	938
Pro Cys Pro Ile Ile Ile Ala Trp Ala Val Gly Lys Leu Tyr Tyr Glu	
255 260 265	
aat gag cag tgc tgg ttt gcc aag gaa gct ggt gat ttg gtg gac tac	986
Asn Glu Gln Cys Trp Phe Gly Lys Glu Ala Gly Asp Leu Val Asp Tyr	
270 275 280 285	
atc tac cag gcc ccc gtc atg ctt gtg ctg ttg atc aat ttt gta ttt	1034
Ile Tyr Gln Gly Pro Val Met Leu Val Leu Leu Ile Asn Phe Val Phe	
290 295 300	
ctg ttt aac atc gtc agg atc ctg atg acg aag tta cga gca tcc acc	1082
Leu Phe Asn Ile Val Arg Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr	
305 310 315	
acg tcc gag aca atc caa tac agg aag gca gtg aag gcc acg ctg gtc	1130
Thr Ser Glu Thr Ile Gln Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu Val	
320 325 330	
ctc ctc ccc ctg ttg gcc atc acc tac atg ctc ttc ttt gtc aat cct	1178
Leu Leu Pro Leu Leu Gly Ile Thr Tyr Met Leu Phe Phe Val Asn Pro	
335 340 345	
ggc gag gac gac ctg tcc cag att gtg ttc atc tac ttc aac tct ttc	1226
Gly Glu Asp Asp Leu Ser Gln Ile Val Phe Ile Tyr Phe Asn Ser Phe	

2/26
25

350	355	360	365	
ctg cag tcc ttc cag ggt ttc ttt gtg tcc gtt ttc tac tgc ttc ttc				1274
Leu Gln Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ser Val Phe Tyr Cys Phe Phe				
370	375	380		
aat gga gag gtg cgc gcg gcc ctg aga aac ggg tgg cac cgc tgg cag				1322
Asn Gly Glu Val Arg Ala Ala Leu Arg Asn Gly Trp His Arg Trp Gln				
385	390	395		
gac cac cac gcc ctc cgg gtg cct gtg gcc cgg gcc atg tcc atc cct				1370
Asp His His Ala Leu Arg Val Pro Val Ala Arg Ala Met Ser Ile Pro				
400	405	410		
acg tcg ccc acc agg atc agc ttc cac agc atc aag cag aca gct gct				1418
Thr Ser Pro Thr Arg Ile Ser Phe His Ser Ile Lys Gln Thr Ala Ala				
415	420	425		
gtg tga cccctctgtca ccgtctgccc ggcagtcac cactgaggca gcttctccat				1474
Val				
430				
cctttacagc cttcccctgg gtctctcttg ctaccctgac ccacagggta caaggtagag				1534
gagaagggag gagaacgaac actcccgccct ggaaggaaag gaaagctatg acatgggggg				1594
gctctgaagg accagggccc agtgcagcca gccacacatc tccaagcacg aaggagcagg				1654
aggacatcac aggaccctca gaagggatgc atctcacacc atcaagcctc tgtgcaccca				1714
gcctcttttg tggggctctc actgcagcac catttacatc tgaagaaact gaggctcaga				1774
gcaggcaggg acctggccaa gtcacatagc tacttgcccc acccacagca cccacagttg				1834
gctctgctcc ttgctttcca tctccacacg tgaggcgccc ctctaaaggt gagggagaca				1894
agaatgacct tatctggctt catcccagaa gctgtcgagc agagatgacc agccctttac				1954
caaggtagcc ttctttctcc ccagtctgtt tccatgtgt ctccaggaga atgctggctt				2014
tcagtcggcc atccctcctg ggagtcacca attcagtcct ggctcagtc ggggacctag				2074
accacgggaa gtgagttaga tggaaagtca cactctccac agtgccagac agaagggaga				2134
acagaagcgc ctggggaaga aggggtgagga tccccaaat cagagtatgc ctgggagtga				2194
ttgaaacaag ggccccagga tctcagtgac atcagccagg catctgtgga gttggccaca				2254
attcaagcaa cgagatgttg gagagatatt gtgagccagt aataaaggca gaatgtctgc				2314
aggacatata catgcccctc ttcttactgg ctaggcccaa gcaggccttc ctgtggagtc				2374
tttaggttca aaggggccga atcattcctg tcaccccaa ggggtggcatc tgcaccaccc				2434
ccagcgtaga cccacctgt gccagggact aatattctgg aattgggagg gagaggaggc				2494
aaggcccttc aggtcccgaa agcaagaaga cacagtttga ttccaggctt ctcttccatt				2554

227
225

cctctgtccc tggagcagaa gaggggtgtt ggggcaagcc aacagacttg aaaaggcccc 2614

cgg 2617

<210> 26

<211> 430

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 26

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

228.
227

Thr Phe Ile Leu Arg Asn Ile Ala Trp Phe Leu Leu Gln Leu Ile Asp
180 185 190

His Glu Val His Glu Gly Asn Glu Val Trp Cys Arg Cys Ile Thr Thr
195 200 205

Ile Phe Asn Tyr Phe Val Val Thr Asn Phe Phe Trp Met Phe Val Glu
210 215 220

Gly Cys Tyr Leu His Thr Ala Ile Val Met Thr Tyr Ser Thr Glu His
225 230 235 240

Leu Arg Lys Trp Leu Phe Leu Phe Ile Gly Trp Cys Ile Pro Cys Pro
245 250 255

Ile Ile Ile Ala Trp Ala Val Gly Lys Leu Tyr Tyr Glu Asn Glu Gln
260 265 270

Cys Trp Phe Gly Lys Glu Ala Gly Asp Leu Val Asp Tyr Ile Tyr Gln
275 280 285

Gly Pro Val Met Leu Val Leu Leu Ile Asn Phe Val Phe Leu Phe Asn
290 295 300

Ile Val Arg Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser Glu
305 310 315 320

Thr Ile Gln Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu Pro
325 330 335

Leu Leu Gly Ile Thr Tyr Met Leu Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu Asp
340 345 350

Asp Leu Ser Gln Ile Val Phe Ile Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Gln Ser
355 360 365

Phe Gln Gly Phe Phe Val Ser Val Phe Tyr Cys Phe Phe Asn Gly Glu
370 375 380

Val Arg Ala Ala Leu Arg Asn Gly Trp His Arg Trp Gln Asp His His
385 390 395 400

Ala Leu Arg Val Pro Val Ala Arg Ala Met Ser Ile Pro Thr Ser Pro

227
220

405

410

415

Thr Arg Ile Ser Phe His Ser Ile Lys Gln Thr Ala Ala Val
420 425 430

<210> 27
<211> 1248
<212> DNA
<213> Ovis aries

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1248)

<400> 27
atg gga cgg cgc ccg cag ctc cgg ctt gtc aag gcc ctt ctc ctc ctg 48
Met Gly Arg Arg Pro Gln Leu Arg Leu Val Lys Ala Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

ggg ctg aac tcc atc tcc gcc tcc ctc cag gac cag cat tgc gag agc 96
Gly Leu Asn Ser Ile Ser Ala Ser Leu Gln Asp Gln His Cys Glu Ser
20 25 30

ttg tcc ctg gcc agc aac gtc tct gga ctg cag tgc aac gct tcc gtg 144
Leu Ser Leu Ala Ser Asn Val Ser Gly Leu Gln Cys Asn Ala Ser Val
35 40 45

gac ctt aat ggc acc tgc tgg ccc cag agt cct gca ggg cag ttg gtg 192
Asp Leu Asn Gly Thr Cys Trp Pro Gln Ser Pro Ala Gly Gln Leu Val
50 55 60

gtt cga ccc tgc ctc gta ttt ttc tat ggt gtc cgc tac aat acc aca 240
Val Arg Pro Cys Leu Val Phe Phe Tyr Gly Val Arg Tyr Asn Thr Thr
65 70 75 80

agc aat ggc tac cgg gtg tgc ctg gcc aat ggc acg tgg gca gcc cgc 288
Ser Asn Gly Tyr Arg Val Cys Leu Ala Asn Gly Thr Trp Ala Ala Arg
85 90 95

gtg aat cac tcc gag tgc caa gag atc ctc agc gaa gga gag aag agc 336
Val Asn His Ser Glu Cys Gln Glu Ile Leu Ser Glu Gly Glu Lys Ser
100 105 110

aag gcg cac tac cac atc gcc gtc atc atc aac tac ctg ggc cac tgc 384
Lys Ala His Tyr His Ile Ala Val Ile Ile Asn Tyr Leu Gly His Cys
115 120 125

atc tcc ctg gcg gcc ctc ctg gtg gcc ttt gtc ctc ttt ctg cgg ctc 432
Ile Ser Leu Ala Ala Leu Leu Val Ala Phe Val Leu Phe Leu Arg Leu
130 135 140

agg agc atc cgg tgc gtg aga aac atc atc cac tgg aac ctc atc tca 480
Arg Ser Ile Arg Cys Val Arg Asn Ile Ile His Trp Asn Leu Ile Ser
145 150 155 160

230
229

gcc ttc atc ctg cgc aat gcc acg tgg ttc gtg gtc cag ctc acc atg 528
Ala Phe Ile Leu Arg Asn Ala Thr Trp Phe Val Val Gln Leu Thr Met
165 170 175

agc ccc gaa gtc cat cag agc aac gtg ggc tgg tgc agg ctg gtg aca 576
Ser Pro Glu Val His Gln Ser Asn Val Gly Trp Cys Arg Leu Val Thr
180 185 190

gcc gcc tac aac tac ttc cac gtg acc aac ttc ttc tgg atg ttc ggc 624
Ala Ala Tyr Asn Tyr Phe His Val Thr Asn Phe Phe Trp Met Phe Gly
195 200 205

gag ggc tgc tac ctg cac acg gct gtc gtg ctc aca tac tcc acg gac 672
Glu Gly Cys Tyr Leu His Thr Ala Val Val Leu Thr Tyr Ser Thr Asp
210 215 220

cgg ctg cgc aaa tgg atg ttt atc tgc atc ggc tgg ggt gtg ccc ttc 720
Arg Leu Arg Lys Trp Met Phe Ile Cys Ile Gly Trp Gly Val Pro Phe
225 230 235 240

ccc atc att gtg gcc tgg gcc att gga aag ttg tac tac gac aat gag 768
Pro Ile Ile Val Ala Trp Ala Ile Gly Lys Leu Tyr Tyr Asp Asn Glu
245 250 255

aag tgc tgg ttt ggc aaa agg cct ggg gtg tac act gat tac atc tac 816
Lys Cys Trp Phe Gly Lys Arg Pro Gly Val Tyr Thr Asp Tyr Ile Tyr
260 265 270

cag ggc ccg atg atc ttg gtc ctg ctg atc aat ttc atc ttc ctt ttc 864
Gln Gly Pro Met Ile Leu Val Leu Leu Ile Asn Phe Ile Phe Leu Phe
275 280 285

aac atc gtt cgc atc ctc atg acc aaa ctc cgg gca tcc acc acc tct 912
Asn Ile Val Arg Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser
290 295 300

gag acc att cag tac agg aag gct gtg aag gcc act ctg gtg ctg ctc 960
Glu Thr Ile Gln Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu
305 310 315 320

ccc ctc ctg ggc atc acg tac atg ctg ttc ttc gtg aac ccc ggg gag 1008
Pro Leu Leu Gly Ile Thr Tyr Met Leu Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu
325 330 335

gac gag gtc tcc cgg gtc gtc ttc atc tac ttc aac tcc ttc ctg gaa 1056
Asp Glu Val Ser Arg Val Val Phe Ile Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Glu
340 345 350

tct ttc cag ggc ttc ttc gtg tct gtg ttc tac tgc ttc ctc aac agc 1104
Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ser Val Phe Tyr Cys Phe Leu Asn Ser
355 360 365

gag gtc cgc tct gcc atc cgg aag agg tgg cac cgc tgg cag gac aag 1152
Glu Val Arg Ser Ala Ile Arg Lys Arg Trp His Arg Trp Gln Asp Lys
370 375 380

cac tca atc cgt gcc cgt gtg gct cgc gcc atg tcc atc ccc acc tcc 1200
58

231
230

His Ser Ile Arg Ala Arg Val Ala Arg Ala Met Ser Ile Pro Thr Ser
385 390 395 400

ccc acc cgt gtc agc ttt cac agc atc aag cag tcc aca gca gtg tga 1248
Pro Thr Arg Val Ser Phe His Ser Ile Lys Gln Ser Thr Ala Val
405 410 415

<210> 28
<211> 415
<212> PRT
<213> Ovis aries

<400> 28

Met Gly Arg Arg Pro Gln Leu Arg Leu Val Lys Ala Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Leu Asn Ser Ile Ser Ala Ser Leu Gln Asp Gln His Cys Glu Ser
20 25 30

Leu Ser Leu Ala Ser Asn Val Ser Gly Leu Gln Cys Asn Ala Ser Val
35 40 45

Asp Leu Asn Gly Thr Cys Trp Pro Gln Ser Pro Ala Gly Gln Leu Val
50 55 60

Val Arg Pro Cys Leu Val Phe Phe Tyr Gly Val Arg Tyr Asn Thr Thr
65 70 75 80

Ser Asn Gly Tyr Arg Val Cys Leu Ala Asn Gly Thr Trp Ala Ala Arg
85 90 95

Val Asn His Ser Glu Cys Gln Glu Ile Leu Ser Glu Gly Glu Lys Ser
100 105 110

Lys Ala His Tyr His Ile Ala Val Ile Ile Asn Tyr Leu Gly His Cys
115 120 125

Ile Ser Leu Ala Ala Leu Leu Val Ala Phe Val Leu Phe Leu Arg Leu
130 135 140

Arg Ser Ile Arg Cys Val Arg Asn Ile Ile His Trp Asn Leu Ile Ser
145 150 155 160

Ala Phe Ile Leu Arg Asn Ala Thr Trp Phe Val Val Gln Leu Thr Met
165 170 175

232
B1

Ser Pro Glu Val His Gln Ser Asn Val Gly Trp Cys Arg Leu Val Thr
180 185 190

Ala Ala Tyr Asn Tyr Phe His Val Thr Asn Phe Phe Trp Met Phe Gly
195 200 205

Glu Gly Cys Tyr Leu His Thr Ala Val Val Leu Thr Tyr Ser Thr Asp
210 215 220

Arg Leu Arg Lys Trp Met Phe Ile Cys Ile Gly Trp Gly Val Pro Phe
225 230 235 240

Pro Ile Ile Val Ala Trp Ala Ile Gly Lys Leu Tyr Tyr Asp Asn Glu
245 250 255

Lys Cys Trp Phe Gly Lys Arg Pro Gly Val Tyr Thr Asp Tyr Ile Tyr
260 265 270

Gln Gly Pro Met Ile Leu Val Leu Leu Ile Asn Phe Ile Phe Leu Phe
275 280 285

Asn Ile Val Arg Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser
290 295 300

Glu Thr Ile Gln Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu
305 310 315 320

Pro Leu Leu Gly Ile Thr Tyr Met Leu Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu
325 330 335

Asp Glu Val Ser Arg Val Val Phe Ile Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Glu
340 345 350

Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ser Val Phe Tyr Cys Phe Leu Asn Ser
355 360 365

Glu Val Arg Ser Ala Ile Arg Lys Arg Trp His Arg Trp Gln Asp Lys
370 375 380

His Ser Ile Arg Ala Arg Val Ala Arg Ala Met Ser Ile Pro Thr Ser
385 390 395 400

233
232

Pro Thr Arg Val Ser Phe His Ser Ile Lys Gln Ser Thr Ala Val
 405 410 415

<210> 29
 <211> 1248
 <212> DNA
 <213> *Xenopus laevis*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1248)

<400> 29
 atg ctg ttg gcc aaa act cca tgt cta cta ctg gtg cag gtg atc gct 48
 Met Leu Leu Ala Lys Thr Pro Cys Leu Leu Leu Val Gln Val Ile Ala
 1 5 10 15
 gct gga atc agt ttt gcc ctc acc tct ctc cag gac caa tgt gaa acc 96
 Ala Gly Ile Ser Phe Ala Leu Thr Ser Leu Gln Asp Gln Cys Glu Thr
 20 25 30
 ctg cag cac aat tct aac ttc aca ggt ctt gcc tgc aac gct tcc att 144
 Leu Gln His Asn Ser Asn Phe Thr Gly Leu Ala Cys Asn Ala Ser Ile
 35 40 45
 gat atg atc ggc act tgc tgg ccc agt act gca gct gga cag atg gtg 192
 Asp Met Ile Gly Thr Cys Trp Pro Ser Thr Ala Ala Gly Gln Met Val
 50 55 60
 gcc aga ccc tgc ccc gag tac ttc cat ggg gtg caa tac aac aca aca 240
 Ala Arg Pro Cys Pro Glu Tyr Phe His Gly Val Gln Tyr Asn Thr Thr
 65 70 75 80
 ggg aat gtg tac aga gaa tgt cac ctg aac ggc agc tgg gct ggg aga 288
 Gly Asn Val Tyr Arg Glu Cys His Leu Asn Gly Ser Trp Ala Gly Arg
 85 90 95
 gga gac tac gct caa tgc cag gag att cta aag caa gag aag aaa acc 336
 Gly Asp Tyr Ala Gln Cys Gln Glu Ile Leu Lys Gln Glu Lys Lys Thr
 100 105 110
 aaa gtt cat tat cac ata gcc atc gtg att aac ttc ctg ggt cac tcc 384
 Lys Val His Tyr His Ile Ala Ile Val Ile Asn Phe Leu Gly His Ser
 115 120 125
 att tcc ctt tgt gct ctc ctg gtg gct ttt atc ctg ttc ttg agg ttg 432
 Ile Ser Leu Cys Ala Leu Leu Val Ala Phe Ile Leu Phe Leu Arg Leu
 130 135 140
 agg agc atc cgg tgc cta cgt aat atc atc cac tgg aac ctg atc acg 480
 Arg Ser Ile Arg Cys Leu Arg Asn Ile Ile His Trp Asn Leu Ile Thr
 145 150 155 160
 gct ttt att ctg cgt aat gta acc tgg ttt gtg atg cag ctc act ctc 528
 Ala Phe Ile Leu Arg Asn Val Thr Trp Phe Val Met Gln Leu Thr Leu

234
233

165										170					175					
agc cat gaa gcc cac gac agc aat gtg gtt tgg tgc cgc ctg gtc acc	576																			
Ser His Glu Ala His Asp Ser Asn Val Val Trp Cys Arg Leu Val Thr																				
180 185 190																				
atc gct cac aat tat ttt tat gtt acc aac ttc ttc tgg atg ttt ggg	624																			
Ile Ala His Asn Tyr Phe Tyr Val Thr Asn Phe Phe Trp Met Phe Gly																				
195 200 205																				
gag ggc tgt tac ctg cac acg gcc att gtt cta acc tac tca act gac	672																			
Glu Gly Cys Tyr Leu His Thr Ala Ile Val Leu Thr Tyr Ser Thr Asp																				
210 215 220																				
aaa ctg cgc aaa tgg atg ttc atc tgt att ggc tgg tgt atc ccc ttt	720																			
Lys Leu Arg Lys Trp Met Phe Ile Cys Ile Gly Trp Cys Ile Pro Phe																				
225 230 235 240																				
ccc atc att gtg gct tgg gcc att ggc aaa ctt tac tac gac aat gaa	768																			
Pro Ile Ile Val Ala Trp Ala Ile Gly Lys Leu Tyr Tyr Asp Asn Glu																				
245 250 255																				
aag tgc tgg ttt ggg aag aaa gcg gga gtc tac aca gat ttt atc tac	816																			
Lys Cys Trp Phe Gly Lys Lys Ala Gly Val Tyr Thr Asp Phe Ile Tyr																				
260 265 270																				
caa gga cct gtc atc ctt gtg ctg ctg atc aac ttc ata ttt tta ttc	864																			
Gln Gly Pro Val Ile Leu Val Leu Leu Ile Asn Phe Ile Phe Leu Phe																				
275 280 285																				
aac att gta cgg att ctg atg aca aag ctc aga gct tcc acc act tca	912																			
Asn Ile Val Arg Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser																				
290 295 300																				
gag acc ata cag tac agg aaa gct gtt aaa gcc acc ctg gtg ctc ctg	960																			
Glu Thr Ile Gln Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu																				
305 310 315 320																				
cct ttg ctt ggg atc acc tac atg ctt ttc ttt gtg acg ccc ggg gag	1008																			
Pro Leu Leu Gly Ile Thr Tyr Met Leu Phe Phe Val Thr Pro Gly Glu																				
325 330 335																				
gat gaa atc tca cgt atc gtc ttt atc tat ttc aac tct ttc ctg cag	1056																			
Asp Glu Ile Ser Arg Ile Val Phe Ile Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Gln																				
340 345 350																				
tcc ttt cag ggt ttc ttt gtt tca gtt ttc tac tgc ttc ctt aat agt	1104																			
Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ser Val Phe Tyr Cys Phe Leu Asn Ser																				
355 360 365																				
gag gtg cgc tca gca gtc cgg aag cga tgg cac cga tgg cag gac aag	1152																			
Glu Val Arg Ser Ala Val Arg Lys Arg Trp His Arg Trp Gln Asp Lys																				
370 375 380																				
cat tca atc cgt gct cgc gtg gcc cgt gcc atg tcc att ccc aca tca	1200																			
His Ser Ile Arg Ala Arg Val Ala Arg Ala Met Ser Ile Pro Thr Ser																				
385 390 395 400																				

225
234

ccc act cgg att agt ttc cac agc atc aag caa tct tct gcc att tga 1248
 Pro Thr Arg Ile Ser Phe His Ser Ile Lys Gln Ser Ser Ala Ile
 405 410 415

<210> 30
 <211> 415
 <212> PRT
 <213> Xenopus laevis
 <400> 30

Met Leu Leu Ala Lys Thr Pro Cys Leu Leu Leu Val Gln Val Ile Ala
 1 5 10 15

Ala Gly Ile Ser Phe Ala Leu Thr Ser Leu Gln Asp Gln Cys Glu Thr
 20 25 30

Leu Gln His Asn Ser Asn Phe Thr Gly Leu Ala Cys Asn Ala Ser Ile
 35 40 45

Asp Met Ile Gly Thr Cys Trp Pro Ser Thr Ala Ala Gly Gln Met Val
 50 55 60

Ala Arg Pro Cys Pro Glu Tyr Phe His Gly Val Gln Tyr Asn Thr Thr
 65 70 75 80

Gly Asn Val Tyr Arg Glu Cys His Leu Asn Gly Ser Trp Ala Gly Arg
 85 90 95

Gly Asp Tyr Ala Gln Cys Gln Glu Ile Leu Lys Gln Glu Lys Lys Thr
 100 105 110

Lys Val His Tyr His Ile Ala Ile Val Ile Asn Phe Leu Gly His Ser
 115 120 125

Ile Ser Leu Cys Ala Leu Leu Val Ala Phe Ile Leu Phe Leu Arg Leu
 130 135 140

Arg Ser Ile Arg Cys Leu Arg Asn Ile Ile His Trp Asn Leu Ile Thr
 145 150 155 160

Ala Phe Ile Leu Arg Asn Val Thr Trp Phe Val Met Gln Leu Thr Leu
 165 170 175

236
235

Ser His Glu Ala His Asp Ser Asn Val Val Trp Cys Arg Leu Val Thr
180 185 190

Ile Ala His Asn Tyr Phe Tyr Val Thr Asn Phe Phe Trp Met Phe Gly
195 200 205

Glu Gly Cys Tyr Leu His Thr Ala Ile Val Leu Thr Tyr Ser Thr Asp
210 215 220

Lys Leu Arg Lys Trp Met Phe Ile Cys Ile Gly Trp Cys Ile Pro Phe
225 230 235 240

Pro Ile Ile Val Ala Trp Ala Ile Gly Lys Leu Tyr Tyr Asp Asn Glu
245 250 255

Lys Cys Trp Phe Gly Lys Lys Ala Gly Val Tyr Thr Asp Phe Ile Tyr
260 265 270

Gln Gly Pro Val Ile Leu Val Leu Leu Ile Asn Phe Ile Phe Leu Phe
275 280 285

Asn Ile Val Arg Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser
290 295 300

Glu Thr Ile Gln Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu
305 310 315 320

Pro Leu Leu Gly Ile Thr Tyr Met Leu Phe Phe Val Thr Pro Gly Glu
325 330 335

Asp Glu Ile Ser Arg Ile Val Phe Ile Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Gln
340 345 350

Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ser Val Phe Tyr Cys Phe Leu Asn Ser
355 360 365

Glu Val Arg Ser Ala Val Arg Lys Arg Trp His Arg Trp Gln Asp Lys
370 375 380

His Ser Ile Arg Ala Arg Val Ala Arg Ala Met Ser Ile Pro Thr Ser
385 390 395 400

Pro Thr Arg Ile Ser Phe His Ser Ile Lys Gln Ser Ser Ala Ile

237
236

405

410

415

<210> 31
<211> 1242
<212> DNA
<213> Xenopus laevis

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1242)

<400> 31
atg gac agc acc atc ttt gag att atc att gat gaa ttt gat gcc aac 48
Met Asp Ser Thr Ile Phe Glu Ile Ile Ile Asp Glu Phe Asp Ala Asn
1 5 10 15

tgc agc ctt ttg gat gct ttt cag gac agt ttt ttg cac tct gag tcc 96
Cys Ser Leu Leu Asp Ala Phe Gln Asp Ser Phe Leu His Ser Glu Ser
20 25 30

tcc tct ttc ttt ggc ttt gaa ggt ccc tat tgt agc gct acc att gac 144
Ser Ser Phe Phe Gly Phe Glu Gly Pro Tyr Cys Ser Ala Thr Ile Asp
35 40 45

cag att ggc acg tgc tgg ccc agg agc cta gcc ggg gaa ctt gtg gaa 192
Gln Ile Gly Thr Cys Trp Pro Arg Ser Leu Ala Gly Glu Leu Val Glu
50 55 60

aga ccc tgc ccg gat tcc ttc aat ggg atc aga tac aac aca act aga 240
Arg Pro Cys Pro Asp Ser Phe Asn Gly Ile Arg Tyr Asn Thr Thr Arg
65 70 75 80

aac gtc tac aga gaa tgc ttt gag aat gga acc tgg gcg tcc tgg atg 288
Asn Val Tyr Arg Glu Cys Phe Glu Asn Gly Thr Trp Ala Ser Trp Met
85 90 95

aat tac tct cag tgt gtg ccc att ctg gat aat aag agg aag tac gcc 336
Asn Tyr Ser Gln Cys Val Pro Ile Leu Asp Asn Lys Arg Lys Tyr Ala
100 105 110

ctt cat tac aag att gct ctc atc ata aac tac ctg ggg cac tgc atc 384
Leu His Tyr Lys Ile Ala Leu Ile Ile Asn Tyr Leu Gly His Cys Ile
115 120 125

tcc atc ttg gct ctc gtt atc gct ttc ttg ctc ttt ctg tgt ttg agg 432
Ser Ile Leu Ala Leu Val Ile Ala Phe Leu Leu Phe Leu Cys Leu Arg
130 135 140

agt ata aga tgc ctt cgg aac att atc cac tgg aat tta atc act act 480
Ser Ile Arg Cys Leu Arg Asn Ile Ile His Trp Asn Leu Ile Thr Thr
145 150 155 160

ttc atc ctg agg aac atc atg tgg ttc ctg ctg cag atg att gac cat 528
Phe Ile Leu Arg Asn Ile Met Trp Phe Leu Leu Gln Met Ile Asp His
165 170 175

238
237

aac att cat gaa agc aac gag gtc tgg tgt cgg tgt atc aca act att Asn Ile His Glu Ser Asn Glu Val Trp Cys Arg Cys Ile Thr Thr Ile 180 185 190	576
tac aat tac ttt gtg gtg acc aac ttc ttc tgg atg ttt gtg gaa gga Tyr Asn Tyr Phe Val Val Thr Asn Phe Phe Trp Met Phe Val Glu Gly 195 200 205	624
tgt tac cta cac aca gct ata gtg atg aca tac tca acg gac aaa ctt Cys Tyr Leu His Thr Ala Ile Val Met Thr Tyr Ser Thr Asp Lys Leu 210 215 220	672
agg aaa tgg gtg ttc ctc ttc ata gga tgg tgt att cca tct ccg atc Arg Lys Trp Val Phe Leu Phe Ile Gly Trp Cys Ile Pro Ser Pro Ile 225 230 235 240	720
att gtc acc tgg gcc atc tgc aag ctt ttc tat gaa aat gaa cag tgt Ile Val Thr Trp Ala Ile Cys Lys Leu Phe Tyr Glu Asn Glu Gln Cys 245 250 255	768
tgg att ggg aag gag ccc ggg aaa tac att gat tac att tac cag ggc Trp Ile Gly Lys Glu Pro Gly Lys Tyr Ile Asp Tyr Ile Tyr Gln Gly 260 265 270	816
cgg gtg att ctc gta ctt ctg ata aat ttt gtg ttc tta ttc aac att Arg Val Ile Leu Val Leu Leu Ile Asn Phe Val Phe Leu Phe Asn Ile 275 280 285	864
gta aga att ttg atg aca aaa ctg aga gct tca act aca tct gaa acg Val Arg Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser Glu Thr 290 295 300	912
ata cag tac agg aag gct gtg aag gca acg tta gtc ctt ctc cct ctt Ile Gln Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu Pro Leu 305 310 315 320	960
ctg gga atc acc tac atg ctc ttc ttc gtc aac cct gga gag gat gac Leu Gly Ile Thr Tyr Met Leu Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu Asp Asp 325 330 335	1008
gtt tct cag atc gtt ttt att tac ttc aac tcg ttt ctt cag tcc ttt Val Ser Gln Ile Val Phe Ile Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Gln Ser Phe 340 345 350	1056
cag ggt ttc ttt gtg tca gta ttt tac tgc ttc ctt aat ggg gag gtc Gln Gly Phe Phe Val Ser Val Phe Tyr Cys Phe Leu Asn Gly Glu Val 355 360 365	1104
cgg tcg gct gca agg aaa aga tgg cac cgc tgg caa gac cac cat tct Arg Ser Ala Ala Arg Lys Arg Trp His Arg Trp Gln Asp His His Ser 370 375 380	1152
ctg cgg gtt cgg gta gcc aga gcc atg tcc ata cca aca tca ccg acc Leu Arg Val Arg Val Ala Arg Ala Met Ser Ile Pro Thr Ser Pro Thr 385 390 395 400	1200
aga atc agc ttt cac agt ata aag caa acg gca gcc gtc tga	1242

237
238

Arg Ile Ser Phe His Ser Ile Lys Gln Thr Ala Ala Val
405 410

<210> 32
<211> 413
<212> PRT
<213> Xenopus laevis

<400> 32

Met Asp Ser Thr Ile Phe Glu Ile Ile Ile Asp Glu Phe Asp Ala Asn
1 5 10 15

Cys Ser Leu Leu Asp Ala Phe Gln Asp Ser Phe Leu His Ser Glu Ser
20 25 30

Ser Ser Phe Phe Gly Phe Glu Gly Pro Tyr Cys Ser Ala Thr Ile Asp
35 40 45

Gln Ile Gly Thr Cys Trp Pro Arg Ser Leu Ala Gly Glu Leu Val Glu
50 55 60

Arg Pro Cys Pro Asp Ser Phe Asn Gly Ile Arg Tyr Asn Thr Thr Arg
65 70 75 80

Asn Val Tyr Arg Glu Cys Phe Glu Asn Gly Thr Trp Ala Ser Trp Met
85 90 95

Asn Tyr Ser Gln Cys Val Pro Ile Leu Asp Asn Lys Arg Lys Tyr Ala
100 105 110

Leu His Tyr Lys Ile Ala Leu Ile Ile Asn Tyr Leu Gly His Cys Ile
115 120 125

Ser Ile Leu Ala Leu Val Ile Ala Phe Leu Leu Phe Leu Cys Leu Arg
130 135 140

Ser Ile Arg Cys Leu Arg Asn Ile Ile His Trp Asn Leu Ile Thr Thr
145 150 155 160

Phe Ile Leu Arg Asn Ile Met Trp Phe Leu Leu Gln Met Ile Asp His
165 170 175

Asn Ile His Glu Ser Asn Glu Val Trp Cys Arg Cys Ile Thr Thr Ile
180 185 190

240
239

Tyr Asn Tyr Phe Val Val Thr Asn Phe Phe Trp Met Phe Val Glu Gly
195 200 205

Cys Tyr Leu His Thr Ala Ile Val Met Thr Tyr Ser Thr Asp Lys Leu
210 215 220

Arg Lys Trp Val Phe Leu Phe Ile Gly Trp Cys Ile Pro Ser Pro Ile
225 230 235 240

Ile Val Thr Trp Ala Ile Cys Lys Leu Phe Tyr Glu Asn Glu Gln Cys
245 250 255

Trp Ile Gly Lys Glu Pro Gly Lys Tyr Ile Asp Tyr Ile Tyr Gln Gly
260 265 270

Arg Val Ile Leu Val Leu Leu Ile Asn Phe Val Phe Leu Phe Asn Ile
275 280 285

Val Arg Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser Glu Thr
290 295 300

Ile Gln Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu Pro Leu
305 310 315 320

Leu Gly Ile Thr Tyr Met Leu Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu Asp Asp
325 330 335

Val Ser Gln Ile Val Phe Ile Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Gln Ser Phe
340 345 350

Gln Gly Phe Phe Val Ser Val Phe Tyr Cys Phe Leu Asn Gly Glu Val
355 360 365

Arg Ser Ala Ala Arg Lys Arg Trp His Arg Trp Gln Asp His His Ser
370 375 380

Leu Arg Val Arg Val Ala Arg Ala Met Ser Ile Pro Thr Ser Pro Thr
385 390 395 400

Arg Ile Ser Phe His Ser Ile Lys Gln Thr Ala Ala Val
405 410

341
240

<210> 33
 <211> 1338
 <212> DNA
 <213> Ameiurus nebulosus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1338)

<400> 33
 atg cat ttc ctt cta cgt cct cag gtg ttt tct atc tgg atc aca cta 48
 Met His Phe Leu Leu Arg Pro Gln Val Phe Ser Ile Trp Ile Thr Leu
 1 5 10 15
 ttc tct ggg gcc aca gct gag ctc aca tgc gac act ctg ctc ctg ctc 96
 Phe Ser Gly Ala Thr Ala Glu Leu Thr Cys Asp Thr Leu Leu Leu Leu
 20 25 30
 tcc acc aac cgc aca gct cgc aca tta ata cta tgg aac cag acg tgc 144
 Ser Thr Asn Arg Thr Ala Arg Thr Leu Ile Leu Trp Asn Gln Thr Ser
 35 40 45
 agc tca agt aat gcc aca ggt aca agc tca agt aat gcc aca ggt aca 192
 Ser Ser Ser Asn Ala Thr Gly Thr Ser Ser Ser Asn Ala Thr Gly Thr
 50 55 60
 agc tca agc aat gcc aca ggt ttg ttc tgt aat ata tct ata gat ggc 240
 Ser Ser Ser Asn Ala Thr Gly Leu Phe Cys Asn Ile Ser Ile Asp Gly
 65 70 75 80
 atc ggg acg tgt tgg ccc agg agc aac gca ggg gaa ata gta tca cgt 288
 Ile Gly Thr Cys Trp Pro Arg Ser Asn Ala Gly Glu Ile Val Ser Arg
 85 90 95
 cca tgt cct gag acc ttc ttg ggt gtc cgc tac aac acc acc aat aac 336
 Pro Cys Pro Glu Thr Phe Leu Gly Val Arg Tyr Asn Thr Thr Asn Asn
 100 105 110
 gtc tac aga gaa tgc ctc gcc aat gga acg tgg gcg aag aag ggg aat 384
 Val Tyr Arg Glu Cys Leu Ala Asn Gly Thr Trp Ala Lys Lys Gly Asn
 115 120 125
 tat tct cag tgt cag gaa att ctc aat gaa gag aaa aag agc aag ctg 432
 Tyr Ser Gln Cys Gln Glu Ile Leu Asn Glu Glu Lys Lys Ser Lys Leu
 130 135 140
 cac tac cac att gca gtg att ata aac tac ctg ggc cac tgc atc tct 480
 His Tyr His Ile Ala Val Ile Ile Asn Tyr Leu Gly His Cys Ile Ser
 145 150 155 160
 ctc gga gcc ctg ctg gtt gcc ttc att ctc ttt atg agg ctg agg atg 528
 Leu Gly Ala Leu Leu Val Ala Phe Ile Leu Phe Met Arg Leu Arg Met
 165 170 175
 atc cgc tgc ctc agg aac atc att cac tgg aat ctg att atg gct ttc 576
 Ile Arg Cys Leu Arg Asn Ile Ile His Trp Asn Leu Ile Met Ala Phe

242
241

180	185	190	
atc ctg cgc aat gct aca tgg ttc gta gtg cag ctg acc atg aac cca Ile Leu Arg Asn Ala Thr Trp Phe Val Val Gln Leu Thr Met Asn Pro 195 200 205			624
gag gtg cat gag agc aat gtg atc tgg tgc agg ctg gtt aca gca gcg Glu Val His Glu Ser Asn Val Ile Trp Cys Arg Leu Val Thr Ala Ala 210 215 220			672
tat aat tac ttt cat gtg acc aac ttc ttc tgg atg ttt ggt gag ggc Tyr Asn Tyr Phe His Val Thr Asn Phe Phe Trp Met Phe Gly Glu Gly 225 230 235 240			720
tgc tat ctg cac acg gcc atc gtg ctg act tac tcc act gat aag ctc Cys Tyr Leu His Thr Ala Ile Val Leu Thr Tyr Ser Thr Asp Lys Leu 245 250 255			768
agg aag tgg ctg ttc atc tgt atc ggc tgg tgt att ccc ttt cct atc Arg Lys Trp Leu Phe Ile Cys Ile Gly Trp Cys Ile Pro Phe Pro Ile 260 265 270			816
atc gtt gca tgg gcc att ggt aag ctg tat tac gac aat gaa aag tgc Ile Val Ala Trp Ala Ile Gly Lys Leu Tyr Tyr Asp Asn Glu Lys Cys 275 280 285			864
tgg ttt gga aaa cga gct ggt gtt tat act gac tac atc tat cag ggc Trp Phe Gly Lys Arg Ala Gly Val Tyr Thr Asp Tyr Ile Tyr Gln Gly 290 295 300			912
ccc atg atc ctt gtt ctt ctg atc aac ttt att ttc ctt ttc aac atc Pro Met Ile Leu Val Leu Leu Ile Asn Phe Ile Phe Leu Phe Asn Ile 305 310 315 320			960
gtg agg atc ctg atg aca aag cta aga gcc tcc acc aca tca gag acg Val Arg Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser Glu Thr 325 330 335			1008
att cag tac agg aaa gct gtg aag gcc act ctg gtc ctg ctg cct ctc Ile Gln Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu Pro Leu 340 345 350			1056
ctc ggg atc acc tac atg ctt ttc ttt gtt aac cct gga gag gac gag Leu Gly Ile Thr Tyr Met Leu Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu Asp Glu 355 360 365			1104
atc tcc caa atc gtc ttc atc tat ttc aat tct ttc ctc gag tcc ttt Ile Ser Gln Ile Val Phe Ile Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Glu Ser Phe 370 375 380			1152
caa ggt ttc ttc gtg tct gtg ttt tat tgc ttc ctg aac agt gaa gtc Gln Gly Phe Phe Val Ser Val Phe Tyr Cys Phe Leu Asn Ser Glu Val 385 390 395 400			1200
cgt tcg gct gtt cgg aag cgc tgg cac cgc cgg cag gac aag cac tca Arg Ser Ala Val Arg Lys Arg Trp His Arg Arg Gln Asp Lys His Ser 405 410 415			1248

243
242

atc cgg gca cgg gtg gca cgg gcc atg tcc att ccc acc tcg cct act 1296
 Ile Arg Ala Arg Val Ala Arg Ala Met Ser Ile Pro Thr Ser Pro Thr
 420 425 430

cgg gtc agc ttc cac agc atc aag caa tcc tca gca gtg tga 1338
 Arg Val Ser Phe His Ser Ile Lys Gln Ser Ser Ala Val
 435 440 445

<210> 34
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Ameiurus nebulosus

<400> 34

Met His Phe Leu Leu Arg Pro Gln Val Phe Ser Ile Trp Ile Thr Leu
 1 5 10 15

Phe Ser Gly Ala Thr Ala Glu Leu Thr Cys Asp Thr Leu Leu Leu Leu
 20 25 30

Ser Thr Asn Arg Thr Ala Arg Thr Leu Ile Leu Trp Asn Gln Thr Ser
 35 40 45

Ser Ser Ser Asn Ala Thr Gly Thr Ser Ser Ser Asn Ala Thr Gly Thr
 50 55 60

Ser Ser Ser Asn Ala Thr Gly Leu Phe Cys Asn Ile Ser Ile Asp Gly
 65 70 75 80

Ile Gly Thr Cys Trp Pro Arg Ser Asn Ala Gly Glu Ile Val Ser Arg
 85 90 95

Pro Cys Pro Glu Thr Phe Leu Gly Val Arg Tyr Asn Thr Thr Asn Asn
 100 105 110

Val Tyr Arg Glu Cys Leu Ala Asn Gly Thr Trp Ala Lys Lys Gly Asn
 115 120 125

Tyr Ser Gln Cys Gln Glu Ile Leu Asn Glu Glu Lys Lys Ser Lys Leu
 130 135 140

His Tyr His Ile Ala Val Ile Ile Asn Tyr Leu Gly His Cys Ile Ser
 145 150 155 160

244
243

Leu Gly Ala Leu Leu Val Ala Phe Ile Leu Phe Met Arg Leu Arg Met
165 170 175

Ile Arg Cys Leu Arg Asn Ile Ile His Trp Asn Leu Ile Met Ala Phe
180 185 190

Ile Leu Arg Asn Ala Thr Trp Phe Val Val Gln Leu Thr Met Asn Pro
195 200 205

Glu Val His Glu Ser Asn Val Ile Trp Cys Arg Leu Val Thr Ala Ala
210 215 220

Tyr Asn Tyr Phe His Val Thr Asn Phe Phe Trp Met Phe Gly Glu Gly
225 230 235 240

Cys Tyr Leu His Thr Ala Ile Val Leu Thr Tyr Ser Thr Asp Lys Leu
245 250 255

Arg Lys Trp Leu Phe Ile Cys Ile Gly Trp Cys Ile Pro Phe Pro Ile
260 265 270

Ile Val Ala Trp Ala Ile Gly Lys Leu Tyr Tyr Asp Asn Glu Lys Cys
275 280 285

Trp Phe Gly Lys Arg Ala Gly Val Tyr Thr Asp Tyr Ile Tyr Gln Gly
290 295 300

Pro Met Ile Leu Val Leu Leu Ile Asn Phe Ile Phe Leu Phe Asn Ile
305 310 315 320

Val Arg Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser Glu Thr
325 330 335

Ile Gln Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu Pro Leu
340 345 350

Leu Gly Ile Thr Tyr Met Leu Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu Asp Glu
355 360 365

Ile Ser Gln Ile Val Phe Ile Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Glu Ser Phe
370 375 380

Gln Gly Phe Phe Val Ser Val Phe Tyr Cys Phe Leu Asn Ser Glu Val

245
244

385 390 395 400

Arg Ser Ala Val Arg Lys Arg Trp His Arg Arg Gln Asp Lys His Ser
405 410 415

Ile Arg Ala Arg Val Ala Arg Ala Met Ser Ile Pro Thr Ser Pro Thr
420 425 430

Arg Val Ser Phe His Ser Ile Lys Gln Ser Ser Ala Val
435 440 445

<210> 35
<211> 1442
<212> DNA
<213> Ameiurus nebulosus

<220>
<221> CDS
<222> (102)..(1388)

<400> 35
cagaaatatg gagatggaga ctgctttaca gtcactcggg tcaaacagga tgттаagctg 60

aactgattaa taatcctgcc agctgatcaa ctggaaaggg a atg tgg atc tgc cta 116
Met Trp Ile Cys Leu
1 5

atg cta aag gtc ttg tct atc ttg tct ttt gtg gtt gtg aag gtg tca 164
Met Leu Lys Val Leu Ser Ile Leu Ser Phe Val Val Val Lys Val Ser
10 15 20

gct gat ctt acc tgc gat gcc gtg cta atg ctg gct tct gga aac cac 212
Ala Asp Leu Thr Cys Asp Ala Val Leu Met Leu Ala Ser Gly Asn His
25 30 35

aca ttg tac cat ctg gat gcc gct aat cac tct gac act aat aac tcg 260
Thr Leu Tyr His Leu Asp Ala Ala Asn His Ser Asp Thr Asn Asn Ser
40 45 50

ggt gtg ttt tgc agc aca gtt atc gat ggc atc ggc acc tgc tgg ccg 308
Gly Val Phe Cys Ser Thr Val Ile Asp Gly Ile Gly Thr Cys Trp Pro
55 60 65

cgc agc gtg gcc ggg gag atg gtg tcg cgt ccg tgt ccg gaa ttc ctc 356
Arg Ser Val Ala Gly Glu Met Val Ser Arg Pro Cys Pro Glu Phe Leu
70 75 80 85

tac gga gtc cga tac aac acc acc aat aaa atc ttc cgg aaa tgt ctt 404
Tyr Gly Val Arg Tyr Asn Thr Thr Asn Lys Ile Phe Arg Lys Cys Leu
90 95 100

gct aat gga acc tgg gcg ccc aaa agc aac tac tct cag tgc aag gct 452
Ala Asn Gly Thr Trp Ala Pro Lys Ser Asn Tyr Ser Gln Cys Lys Ala

246
245

105	110	115	
att ctc aat gta cag agg aag agc aag ctg cat tat cga atc gct gtc Ile Leu Asn Val Gln Arg Lys Ser Lys Leu His Tyr Arg Ile Ala Val 120 125 130			500
atc att aac tac ctg ggt cac tgc ttg tca ctg ttc act ctt ctt atc Ile Ile Asn Tyr Leu Gly His Cys Leu Ser Leu Phe Thr Leu Leu Ile 135 140 145			548
gcc ttc ata atc ttc tta cga ctc agg agt att cgc tgt tta agg aac Ala Phe Ile Ile Phe Leu Arg Leu Arg Ser Ile Arg Cys Leu Arg Asn 150 155 160 165			596
atc atc cac tgg aat cta acc tct gcc ttc atc ctg aga aat gcg acg Ile Ile His Trp Asn Leu Thr Ser Ala Phe Ile Leu Arg Asn Ala Thr 170 175 180			644
tgg ttc atc gtt cag ctc acc atg aac cct gat gta cac gag agc aac Trp Phe Ile Val Gln Leu Thr Met Asn Pro Asp Val His Glu Ser Asn 185 190 195			692
gtg cca tgg tgc cgt tta gtg acg acg gca tat aac tac ttc cac atg Val Pro Trp Cys Arg Leu Val Thr Thr Ala Tyr Asn Tyr Phe His Met 200 205 210			740
gcc aat ttt ttc tgg atg ttc ggc gaa ggc tgt tat ctt cac aca gcc Ala Asn Phe Phe Trp Met Phe Gly Glu Gly Cys Tyr Leu His Thr Ala 215 220 225			788
atc gtg ctc acc tac tcc act gac aaa ctc aag aaa tgg atg ttc atc Ile Val Leu Thr Tyr Ser Thr Asp Lys Leu Lys Lys Trp Met Phe Ile 230 235 240 245			836
tgc atc gga tgg tgt att cct tgc cct att atc gtc gcc tgg gcc atc Cys Ile Gly Trp Cys Ile Pro Ser Pro Ile Ile Val Ala Trp Ala Ile 250 255 260			884
gga aag ctg tac tac gac aac gag aag tgt tgg ttt ggg aag aga gca Gly Lys Leu Tyr Tyr Asp Asn Glu Lys Cys Trp Phe Gly Lys Arg Ala 265 270 275			932
ggc ata tac aca gac tac atc tac cag ggc ccc atg atc ctg gta ctt Gly Ile Tyr Thr Asp Tyr Ile Tyr Gln Gly Pro Met Ile Leu Val Leu 280 285 290			980
atg atc aat ttc gtg ttc ctc ttc aac ata gta agg atc ctc atg acc Met Ile Asn Phe Val Phe Leu Phe Asn Ile Val Arg Ile Leu Met Thr 295 300 305			1028
aaa ctc cgg gcc tcc acc aca tcc gaa acc atc cag tac agg aag gcg Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser Glu Thr Ile Gln Tyr Arg Lys Ala 310 315 320 325			1076
gtg aag gcc acg ctc gtg tta ctg cct ctg ctc ggg atc acg tac atg Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu Pro Leu Leu Gly Ile Thr Tyr Met 330 335 340			1124

247
246

ctg ttc ttc gta aac cca gga gag gac gaa atc tcg cag atc gtc ttc 1172
 Leu Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu Asp Glu Ile Ser Gln Ile Val Phe
 345 350 355

atc tac ttc aat tcc ttt ctg cag tcc ttt cag ggc ttc ttt gtg tcc 1220
 Ile Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Gln Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ser
 360 365 370

gtg ttc tac tgt ttt cta aac agc gag gtc cgc tcg gct gtt cgg aag 1268
 Val Phe Tyr Cys Phe Leu Asn Ser Glu Val Arg Ser Ala Val Arg Lys
 375 380 385

cac tgg cac cgc tgg cag gac cac cat tcc atc cgc gca cga gtt gcg 1316
 His Trp His Arg Trp Gln Asp His His Ser Ile Arg Ala Arg Val Ala
 390 395 400 405

aga gcg atg tcc att ccc acc tca cct tcg cgc ctc agc ttc cac agc 1364
 Arg Ala Met Ser Ile Pro Thr Ser Pro Ser Arg Leu Ser Phe His Ser
 410 415 420

atc aaa cag tcc acc tct gtc tga tacagggacg cataacattg aaaaagaaag 1418
 Ile Lys Gln Ser Thr Ser Val
 425

aggcaggcac tctatcagtg agga 1442

<210> 36
 <211> 428
 <212> PRT
 <213> Ameiurus nebulosus

<400> 36

Met Trp Ile Cys Leu Met Leu Lys Val Leu Ser Ile Leu Ser Phe Val
 1 5 10 15

Val Val Lys Val Ser Ala Asp Leu Thr Cys Asp Ala Val Leu Met Leu
 20 25 30

Ala Ser Gly Asn His Thr Leu Tyr His Leu Asp Ala Ala Asn His Ser
 35 40 45

Asp Thr Asn Asn Ser Gly Val Phe Cys Ser Thr Val Ile Asp Gly Ile
 50 55 60

Gly Thr Cys Trp Pro Arg Ser Val Ala Gly Glu Met Val Ser Arg Pro
 65 70 75 80

Cys Pro Glu Phe Leu Tyr Gly Val Arg Tyr Asn Thr Thr Asn Lys Ile
 85 90 95

248
247

Phe Arg Lys Cys Leu Ala Asn Gly Thr Trp Ala Pro Lys Ser Asn Tyr
100 105 110

Ser Gln Cys Lys Ala Ile Leu Asn Val Gln Arg Lys Ser Lys Leu His
115 120 125

Tyr Arg Ile Ala Val Ile Ile Asn Tyr Leu Gly His Cys Leu Ser Leu
130 135 140

Phe Thr Leu Leu Ile Ala Phe Ile Ile Phe Leu Arg Leu Arg Ser Ile
145 150 155 160

Arg Cys Leu Arg Asn Ile Ile His Trp Asn Leu Thr Ser Ala Phe Ile
165 170 175

Leu Arg Asn Ala Thr Trp Phe Ile Val Gln Leu Thr Met Asn Pro Asp
180 185 190

Val His Glu Ser Asn Val Pro Trp Cys Arg Leu Val Thr Thr Ala Tyr
195 200 205

Asn Tyr Phe His Met Ala Asn Phe Phe Trp Met Phe Gly Glu Gly Cys
210 215 220

Tyr Leu His Thr Ala Ile Val Leu Thr Tyr Ser Thr Asp Lys Leu Lys
225 230 235 240

Lys Trp Met Phe Ile Cys Ile Gly Trp Cys Ile Pro Ser Pro Ile Ile
245 250 255

Val Ala Trp Ala Ile Gly Lys Leu Tyr Tyr Asp Asn Glu Lys Cys Trp
260 265 270

Phe Gly Lys Arg Ala Gly Ile Tyr Thr Asp Tyr Ile Tyr Gln Gly Pro
275 280 285

Met Ile Leu Val Leu Met Ile Asn Phe Val Phe Leu Phe Asn Ile Val
290 295 300

Arg Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser Glu Thr Ile
305 310 315 320

349
248

Gln Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu Pro Leu Leu
325 330 335

Gly Ile Thr Tyr Met Leu Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu Asp Glu Ile
340 345 350

Ser Gln Ile Val Phe Ile Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Gln Ser Phe Gln
355 360 365

Gly Phe Phe Val Ser Val Phe Tyr Cys Phe Leu Asn Ser Glu Val Arg
370 375 380

Ser Ala Val Arg Lys His Trp His Arg Trp Gln Asp His His Ser Ile
385 390 395 400

Arg Ala Arg Val Ala Arg Ala Met Ser Ile Pro Thr Ser Pro Ser Arg
405 410 415

Leu Ser Phe His Ser Ile Lys Gln Ser Thr Ser Val
420 425

<210> 37
<211> 1218
<212> DNA
<213> Ameiurus nebulosus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1218)

<400> 37
atg gag gtc agt ctg ctg gag ctg ctc agt gtg gag gtg aac tgc agc 48
Met Glu Val Ser Leu Leu Glu Leu Leu Ser Val Glu Val Asn Cys Ser
1 5 10 15
ctc gcg gac gcg ttt gga gac cct gcg tac gga aac gca tca gac gct 96
Leu Ala Asp Ala Phe Gly Asp Pro Ala Tyr Gly Asn Ala Ser Asp Ala
20 25 30
ctg tac tgc aac gcc acg gcg gat gag atc ggc acg tgc tgg ccg agg 144
Leu Tyr Cys Asn Ala Thr Ala Asp Glu Ile Gly Thr Cys Trp Pro Arg
35 40 45
agc ggc gcg ggg aga gtg gtg gcg cgg ccg tgc ccc gac ttc atc aac 192
Ser Gly Ala Gly Arg Val Val Ala Arg Pro Cys Pro Asp Phe Ile Asn
50 55 60
ggg gtc aag tac aac agc acc agg agc gcg tat aga gaa tgc ctg gag 240
Gly Val Lys Tyr Asn Ser Thr Arg Ser Ala Tyr Arg Glu Cys Leu Glu

250
249

65	70	75	80	
aac ggc aca tgg gct ttc aag atc aac tac tcc agc tgc gag ccc att				288
Asn Gly Thr Trp Ala Phe Lys Ile Asn Tyr Ser Ser Cys Glu Pro Ile	85	90	95	
tta gag gaa aag agg aag tac ccg gtc cac tac aag atc gct ctc atc				336
Leu Glu Glu Lys Arg Lys Tyr Pro Val His Tyr Lys Ile Ala Leu Ile	100	105	110	
atc aac tat ttg gga cac tgc ata tct gta ggt gct ctc gtc atc gcc				384
Ile Asn Tyr Leu Gly His Cys Ile Ser Val Gly Ala Leu Val Ile Ala	115	120	125	
ttc gtt ctc ttc ctg tgc ttg aga agc atc cgg tgt ttg cgg aat gta				432
Phe Val Leu Phe Leu Cys Leu Arg Ser Ile Arg Cys Leu Arg Asn Val	130	135	140	
att cac tgg aat tta ata acc acc ttc atc ctg agg aac atc atg tgg				480
Ile His Trp Asn Leu Ile Thr Thr Phe Ile Leu Arg Asn Ile Met Trp	145	150	155	160
ctt ctg ctg cag ctc atc gac cac aac atc cat gaa agg aac gag ccg				528
Leu Leu Leu Gln Leu Ile Asp His Asn Ile His Glu Arg Asn Glu Pro	165	170	175	
tgg tgc cgc ctc ata acc acc gtc tat aac tat ttt gtg gtg acg aat				576
Trp Cys Arg Leu Ile Thr Thr Val Tyr Asn Tyr Phe Val Val Thr Asn	180	185	190	
ttt ttc tgg atg ttc gtg gag ggc tgt tat ctt cac aca gcc atc gtt				624
Phe Phe Trp Met Phe Val Glu Gly Cys Tyr Leu His Thr Ala Ile Val	195	200	205	
atg acc tac tcc acc gac aag ctc cgg aag tgg gtc ttc ctc ttc atc				672
Met Thr Tyr Ser Thr Asp Lys Leu Arg Lys Trp Val Phe Leu Phe Ile	210	215	220	
ggg tgg tgt att ccg tgt ccg gtc atc att gcg tgg gcc gtc ggg aag				720
Gly Trp Cys Ile Pro Cys Pro Val Ile Ile Ala Trp Ala Val Gly Lys	225	230	235	240
ctg tac aac gaa aac gaa cag tgc tgg ttt gga aaa gaa ccc gga aaa				768
Leu Tyr Asn Glu Asn Glu Gln Cys Trp Phe Gly Lys Glu Pro Gly Lys	245	250	255	
tac gtg gac tac att tat cag ggt cct gtg att gtt gtt ctg ctg ata				816
Tyr Val Asp Tyr Ile Tyr Gln Gly Pro Val Ile Val Val Leu Leu Ile	260	265	270	
aac ttc gtg ttc ctg ttc aac atc gta cgt att ctc atg acg aag ctg				864
Asn Phe Val Phe Leu Phe Asn Ile Val Arg Ile Leu Met Thr Lys Leu	275	280	285	
cga gcc tcc acc acg tca gag acc ata cag tac agg aaa gcg gtg aag				912
Arg Ala Ser Thr Thr Ser Glu Thr Ile Gln Tyr Arg Lys Ala Val Lys	290	295	300	

251
50

gcg acg tta gtg ctg ctt cct ctg ctc ggc atc aca tac atg ctg ttc 960
Ala Thr Leu Val Leu Leu Pro Leu Leu Gly Ile Thr Tyr Met Leu Phe 320
305 310 315

ttc gtg aat ccg ggg gat gat gac atc tca cag att gtc ttt att tat 1008
Phe Val Asn Pro Gly Asp Asp Asp Ile Ser Gln Ile Val Phe Ile Tyr 335
325 330

ttc aat tcc ttc ctg cag tcc ttt cag ggt ttc ttc gtc tca gtg ttt 1056
Phe Asn Ser Phe Leu Gln Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ser Val Phe 350
340 345

tac tgc ttc ctc aac ggt gag gta cgg tca gca gta agg aaa cgt tgg 1104
Tyr Cys Phe Leu Asn Gly Glu Val Arg Ser Ala Val Arg Lys Arg Trp 365
355 360

cac aga tgg cag gat aac cac gct ctc cgt gtt cgg gtt gcc agg gcg 1152
His Arg Trp Gln Asp Asn His Ala Leu Arg Val Arg Val Ala Arg Ala 380
370 375

atg tcc atc cca aca tca cct act cgc atc agc ttc cac agc att aaa 1200
Met Ser Ile Pro Thr Ser Pro Thr Arg Ile Ser Phe His Ser Ile Lys 400
385 390 395

cac acc acc gct gtg tga 1218
His Thr Thr Ala Val 405

<210> 38
<211> 405
<212> PRT
<213> Ameiurus nebulosus

<400> 38

Met Glu Val Ser Leu Leu Glu Leu Leu Ser Val Glu Val Asn Cys Ser 15
1 5 10

Leu Ala Asp Ala Phe Gly Asp Pro Ala Tyr Gly Asn Ala Ser Asp Ala 30
20 25

Leu Tyr Cys Asn Ala Thr Ala Asp Glu Ile Gly Thr Cys Trp Pro Arg 45
35 40

Ser Gly Ala Gly Arg Val Val Ala Arg Pro Cys Pro Asp Phe Ile Asn 60
50 55

Gly Val Lys Tyr Asn Ser Thr Arg Ser Ala Tyr Arg Glu Cys Leu Glu 80
65 70 75

252
251

Asn Gly Thr Trp Ala Phe Lys Ile Asn Tyr Ser Ser Cys Glu Pro Ile
85 90 95

Leu Glu Glu Lys Arg Lys Tyr Pro Val His Tyr Lys Ile Ala Leu Ile
100 105 110

Ile Asn Tyr Leu Gly His Cys Ile Ser Val Gly Ala Leu Val Ile Ala
115 120 125

Phe Val Leu Phe Leu Cys Leu Arg Ser Ile Arg Cys Leu Arg Asn Val
130 135 140

Ile His Trp Asn Leu Ile Thr Thr Phe Ile Leu Arg Asn Ile Met Trp
145 150 155 160

Leu Leu Leu Gln Leu Ile Asp His Asn Ile His Glu Arg Asn Glu Pro
165 170 175

Trp Cys Arg Leu Ile Thr Thr Val Tyr Asn Tyr Phe Val Val Thr Asn
180 185 190

Phe Phe Trp Met Phe Val Glu Gly Cys Tyr Leu His Thr Ala Ile Val
195 200 205

Met Thr Tyr Ser Thr Asp Lys Leu Arg Lys Trp Val Phe Leu Phe Ile
210 215 220

Gly Trp Cys Ile Pro Cys Pro Val Ile Ile Ala Trp Ala Val Gly Lys
225 230 235 240

Leu Tyr Asn Glu Asn Glu Gln Cys Trp Phe Gly Lys Glu Pro Gly Lys
245 250 255

Tyr Val Asp Tyr Ile Tyr Gln Gly Pro Val Ile Val Val Leu Leu Ile
260 265 270

Asn Phe Val Phe Leu Phe Asn Ile Val Arg Ile Leu Met Thr Lys Leu
275 280 285

Arg Ala Ser Thr Thr Ser Glu Thr Ile Gln Tyr Arg Lys Ala Val Lys
290 295 300

Ala Thr Leu Val Leu Leu Pro Leu Leu Gly Ile Thr Tyr Met Leu Phe
80

253
252

[illegible]

284
29

aac aac ggc tac cgg gag tgc ctg gcc aat ggc acg tgg gcc gcc cgc Asn Asn Gly Tyr Arg Glu Cys Leu Ala Asn Gly Thr Trp Ala Ala Arg 85 90 95	288
gtg aac tac tcc gag tgc caa gag atc ctc agc gag gag aag aag agc Val Asn Tyr Ser Glu Cys Gln Glu Ile Leu Ser Glu Glu Lys Lys Ser 100 105 110	336
aag gtg cac tac cac atc gct gtc atc atc aac tac cta ggc cac tgc Lys Val His Tyr His Ile Ala Val Ile Ile Asn Tyr Leu Gly His Cys 115 120 125	384
atc tcc ctg gcg gcc ctc ctg gtg gcc ttt gtc ctc ttt ctg cgg ctc Ile Ser Leu Ala Ala Leu Leu Val Ala Phe Val Leu Phe Leu Arg Leu 130 135 140	432
agg agc atc cgg tgc ctg aga aac atc atc cac tgg aac ctc atc tca Arg Ser Ile Arg Cys Leu Arg Asn Ile Ile His Trp Asn Leu Ile Ser 145 150 155 160	480
gcc ttc atc ctg cgc aat gcc acg tgg ttc gtg gtc cag ctc acc atg Ala Phe Ile Leu Arg Asn Ala Thr Trp Phe Val Val Gln Leu Thr Met 165 170 175	528
agc ccc gaa gtc cat cag agc aac gtg ggc tgg tgc agg ctg gtg aca Ser Pro Glu Val His Gln Ser Asn Val Gly Trp Cys Arg Leu Val Thr 180 185 190	576
gcc gcc tac aac tac ttc cac gtg acc aac ttc ttc tgg atg ttc ggt Ala Ala Tyr Asn Tyr Phe His Val Thr Asn Phe Phe Trp Met Phe Gly 195 200 205	624
gag ggc tgc tac ctg cac acg gcc atc gtg ctc acg tac tcc aca gac Glu Gly Cys Tyr Leu His Thr Ala Ile Val Leu Thr Tyr Ser Thr Asp 210 215 220	672
cgg ctg cga aag tgg atg ttt atc tgc atc ggc tgg ggt gtg cct ttc Arg Leu Arg Lys Trp Met Phe Ile Cys Ile Gly Trp Gly Val Pro Phe 225 230 235 240	720
ccc atc att gtg gcc tgg gcc att ggg aag ctg tac tac gac aat gag Pro Ile Ile Val Ala Trp Ala Ile Gly Lys Leu Tyr Tyr Asp Asn Glu 245 250 255	768
aag tgc tgg ttt ggc aaa agg cct ggg gtg tac act gac tac atc tac Lys Cys Trp Phe Gly Lys Arg Pro Gly Val Tyr Thr Asp Tyr Ile Tyr 260 265 270	816
cag ggc ccg atg atc ttg gtc ctg ctg atc aat ttc atc ttc ctt ttc Gln Gly Pro Met Ile Leu Val Leu Leu Ile Asn Phe Ile Phe Leu Phe 275 280 285	864
aac atc gtc cgc atc ctc atg acc aaa ctc cgg gca tcc acc acc tct Asn Ile Val Arg Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser 290 295 300	912
gag acc att cag tac agg aag gct gtg aag gcc act ctg gtg ctg ctc	960

255
254

Glu Thr Ile Gln Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu
305 310 315 320

ccc ctc ctg ggc atc acg tac atg ctg ttc ttc gtg aac cct ggg gag 1008
Pro Leu Leu Gly Ile Thr Tyr Met Leu Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu
325 330 335

gac gag gtc tcc agg gtc gtc ttc atc tac ttc aac tcc ttc ctg gaa 1056
Asp Glu Val Ser Arg Val Val Phe Ile Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Glu
340 345 350

tct ttc cag ggc ttc ttc gtg tct gtg ttc tac tgc ttc ctc aac agc 1104
Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ser Val Phe Tyr Cys Phe Leu Asn Ser
355 360 365

gag gtc cgc tct gcc atc cgg aag agg tgg cac cgc tgg cag gac aag 1152
Glu Val Arg Ser Ala Ile Arg Lys Arg Trp His Arg Trp Gln Asp Lys
370 375 380

cac tca atc cgt gcc cgc gtg gct cgc gcc atg tcc atc ccc acc tcc 1200
His Ser Ile Arg Ala Arg Val Ala Arg Ala Met Ser Ile Pro Thr Ser
385 390 395 400

ccc acc cgt gtc agc ttt cac agc atc aag cag tcc aca gca gtg tga 1248
Pro Thr Arg Val Ser Phe His Ser Ile Lys Gln Ser Thr Ala Val
405 410 415

<210> 40
<211> 415
<212> PRT
<213> Bos taurus

<400> 40

Met Gly Arg Arg Pro Gln Leu Arg Leu Val Lys Ala Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Leu Asn Ser Ile Ser Ala Ser Leu Gln Asp Gln His Cys Glu Ser
20 25 30

Leu Ser Val Ala Ser Asn Val Ser Gly Leu Gln Cys Asn Ala Ser Val
35 40 45

Asp Leu Ile Gly Thr Cys Trp Pro Gln Ser Pro Ala Gly Gln Leu Val
50 55 60

Val Arg Pro Cys Leu Val Phe Phe Tyr Gly Val Arg Tyr Asn Thr Thr
65 70 75 80

Asn Asn Gly Tyr Arg Glu Cys Leu Ala Asn Gly Thr Trp Ala Ala Arg
85 90 95

286
1
25

Val Asn Tyr Ser Glu Cys Gln Glu Ile Leu Ser Glu Glu Lys Lys Ser
100 105 110

Lys Val His Tyr His Ile Ala Val Ile Ile Asn Tyr Leu Gly His Cys
115 120 125

Ile Ser Leu Ala Ala Leu Leu Val Ala Phe Val Leu Phe Leu Arg Leu
130 135 140

Arg Ser Ile Arg Cys Leu Arg Asn Ile Ile His Trp Asn Leu Ile Ser
145 150 155 160

Ala Phe Ile Leu Arg Asn Ala Thr Trp Phe Val Val Gln Leu Thr Met
165 170 175

Ser Pro Glu Val His Gln Ser Asn Val Gly Trp Cys Arg Leu Val Thr
180 185 190

Ala Ala Tyr Asn Tyr Phe His Val Thr Asn Phe Phe Trp Met Phe Gly
195 200 205

Glu Gly Cys Tyr Leu His Thr Ala Ile Val Leu Thr Tyr Ser Thr Asp
210 215 220

Arg Leu Arg Lys Trp Met Phe Ile Cys Ile Gly Trp Gly Val Pro Phe
225 230 235 240

Pro Ile Ile Val Ala Trp Ala Ile Gly Lys Leu Tyr Tyr Asp Asn Glu
245 250 255

Lys Cys Trp Phe Gly Lys Arg Pro Gly Val Tyr Thr Asp Tyr Ile Tyr
260 265 270

Gln Gly Pro Met Ile Leu Val Leu Leu Ile Asn Phe Ile Phe Leu Phe
275 280 285

Asn Ile Val Arg Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser
290 295 300

Glu Thr Ile Gln Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu
305 310 315 320

757
256

Pro Leu Leu Gly Ile Thr Tyr Met Leu Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu
325 330 335

Asp Glu Val Ser Arg Val Val Phe Ile Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Glu
340 345 350

Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ser Val Phe Tyr Cys Phe Leu Asn Ser
355 360 365

Glu Val Arg Ser Ala Ile Arg Lys Arg Trp His Arg Trp Gln Asp Lys
370 375 380

His Ser Ile Arg Ala Arg Val Ala Arg Ala Met Ser Ile Pro Thr Ser
385 390 395 400

Pro Thr Arg Val Ser Phe His Ser Ile Lys Gln Ser Thr Ala Val
405 410 415

<210> 41
<211> 1422
<212> DNA
<213> Gallus gallus

<220>
<221> CDS
<222> (138)..(1400)

<400> 41
tcacagggag gttataaaag gcagtgagtg gggagcgggg cacgcggagc cacctgagca 60
cgaggatttg gagcccgac ggcagcggga gcggagccgg ccatgccccg ggtcggtggg 120
tgcggaggga gctaagg atg gtg ccc ggc ccg cgt cct gcc ctc ctc ctc 170
Met Val Pro Gly Pro Arg Pro Ala Leu Leu Leu
1 5 10
ctc ctc ttt ctc ctg cag gcg ttt ctc ctc tgg gat agt ccc gtt gca 218
Leu Leu Phe Leu Leu Gln Ala Phe Leu Leu Trp Asp Ser Pro Val Ala
15 20 25
gcc tcc atc caa gag cag tac tgt gag agc ctg ctg ccc acc acc aac 266
Ala Ser Ile Gln Glu Gln Tyr Cys Glu Ser Leu Leu Pro Thr Thr Asn
30 35 40
cac aca gga cct cag tgc aac gcc tcg gtg gac ctg att ggc acg tgc 314
His Thr Gly Pro Gln Cys Asn Ala Ser Val Asp Leu Ile Gly Thr Cys
45 50 55
tgg ccc cgc agt gca gtg gga caa ctg gtg gct cgg ccc tgc ccc gag 362
Trp Pro Arg Ser Ala Val Gly Gln Leu Val Ala Arg Pro Cys Pro Glu

258
57

60	65	70	75	
tat ttc tac ggc gtg cgg tac aac acc aca aac aat ggc tac agg gaa				410
Tyr Phe Tyr Gly Val Arg Tyr Asn Thr Thr Asn Asn Gly Tyr Arg Glu	80	85	90	
tgc ctc gct aac ggg agc tgg gca gca cgg gtc aac tac tcc cag tgc				458
Cys Leu Ala Asn Gly Ser Trp Ala Ala Arg Val Asn Tyr Ser Gln Cys	95	100	105	
cag gag atc ctc agt gag gag aag agg agc aag ctg cac tac cac atc				506
Gln Glu Ile Leu Ser Glu Glu Lys Arg Ser Lys Leu His Tyr His Ile	110	115	120	
gct gtc atc atc aac tac ctg ggg cac tgc gtc tgc ctg ggg acc ctc				554
Ala Val Ile Ile Asn Tyr Leu Gly His Cys Val Ser Leu Gly Thr Leu	125	130	135	
ctt gtg gcc ttc gtc ctc ttc atg cgc ctg cgg agc atc cgg tgc ttg				602
Leu Val Ala Phe Val Leu Phe Met Arg Leu Arg Ser Ile Arg Cys Leu	140	145	150	155
agg aac atc atc cac tgg aac ctg atc aca gcc ttc atc cta cgc aat				650
Arg Asn Ile Ile His Trp Asn Leu Ile Thr Ala Phe Ile Leu Arg Asn	160	165	170	
gcc acg tgg ttt gtg gtg cag ctc acg atg aac cca gag gtg cac gag				698
Ala Thr Trp Phe Val Val Gln Leu Thr Met Asn Pro Glu Val His Glu	175	180	185	
agc aac gtg gtc tgg tgc cgc ttg gtc act gct gcc tac aat tac ttc				746
Ser Asn Val Val Trp Cys Arg Leu Val Thr Ala Ala Tyr Asn Tyr Phe	190	195	200	
cat gtc acc aac ttc ttc tgg atg ttt ggc gag ggc tgc tac ctg cac				794
His Val Thr Asn Phe Phe Trp Met Phe Gly Glu Gly Cys Tyr Leu His	205	210	215	
aca gcc atc gtc ctc acc tat tcc acc gac aag ctc cgc aag tgg atg				842
Thr Ala Ile Val Leu Thr Tyr Ser Thr Asp Lys Leu Arg Lys Trp Met	220	225	230	235
ttc atc tgc att ggc tgg tgt atc ccc ttt ccc atc att gtc gcc tgg				890
Phe Ile Cys Ile Gly Trp Cys Ile Pro Phe Pro Ile Ile Val Ala Trp	240	245	250	
gcc atc ggg aag ctg tac tac gac aac gag aag tgc tgg ttt ggg aag				938
Ala Ile Gly Lys Leu Tyr Tyr Asp Asn Glu Lys Cys Trp Phe Gly Lys	255	260	265	
cga gca gga gtt tat act gac tac atc tat caa ggt ccc atg atc ctg				986
Arg Ala Gly Val Tyr Thr Asp Tyr Ile Tyr Gln Gly Pro Met Ile Leu	270	275	280	
gtg ctt ctg atc aac ttc atc ttt ctg ttc aac att gtt cgg att ctc				1034
Val Leu Leu Ile Asn Phe Ile Phe Leu Phe Asn Ile Val Arg Ile Leu	285	290	295	

759
250

atg acc aag ctc cga gca tca acc acg tca gag aca atc cag tac aga 1082
 Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser Glu Thr Ile Gln Tyr Arg 315
 300 305

aaa gca gtc aag gct acg ctg gtg ctg ctg tcc ttg ctg gga atc acc 1130
 Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu Ser Leu Leu Gly Ile Thr 330
 320

tac atg ctg ttc ttt gtc aat ccg ggg gag gat gag atc tcc agg atc 1178
 Tyr Met Leu Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu Asp Glu Ile Ser Arg Ile 345
 335 340

gtc ttc atc tac ttc aac tcc ttc ctg gag tcc ttc cag ggc ttc ttt 1226
 Val Phe Ile Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Glu Ser Phe Gln Gly Phe Phe 360
 350 355

gtc tct gtc ttc tac tgc ttc ctg aac agc gag gtg cgt tcg gct gtg 1274
 Val Ser Val Phe Tyr Cys Phe Leu Asn Ser Glu Val Arg Ser Ala Val 375
 365 370

cgg aag cgg tgg cac cga tgg cag gac aag cac tcc atc cgc gct cgg 1322
 Arg Lys Arg Trp His Arg Trp Gln Asp Lys His Ser Ile Arg Ala Arg 395
 380 385 390

gtg gct cgg gcc atg tcc atc ccc acc tcc cca acc cgg gtc agc ttc 1370
 Val Ala Arg Ala Met Ser Ile Pro Thr Ser Pro Thr Arg Val Ser Phe 410
 400 405

cac agc atc aag cag tcc tca gca gtg tga ggcaggagga ggcagctgcc ga 1422
 His Ser Ile Lys Gln Ser Ser Ala Val 420
 415

<210> 42
 <211> 420
 <212> PRT
 <213> Gallus gallus

<400> 42

Met Val Pro Gly Pro Arg Pro Ala Leu Leu Leu Leu Leu Phe Leu Leu 15
 1 5 10

Gln Ala Phe Leu Leu Trp Asp Ser Pro Val Ala Ala Ser Ile Gln Glu 30
 20 25

Gln Tyr Cys Glu Ser Leu Leu Pro Thr Thr Asn His Thr Gly Pro Gln 45
 35 40

Cys Asn Ala Ser Val Asp Leu Ile Gly Thr Cys Trp Pro Arg Ser Ala 60
 50 55

260
259

Val Gly Gln Leu Val Ala Arg Pro Cys Pro Glu Tyr Phe Tyr Gly Val
65 70 75 80

Arg Tyr Asn Thr Thr Asn Asn Gly Tyr Arg Glu Cys Leu Ala Asn Gly
85 90 95

Ser Trp Ala Ala Arg Val Asn Tyr Ser Gln Cys Gln Glu Ile Leu Ser
100 105 110

Glu Glu Lys Arg Ser Lys Leu His Tyr His Ile Ala Val Ile Ile Asn
115 120 125

Tyr Leu Gly His Cys Val Ser Leu Gly Thr Leu Leu Val Ala Phe Val
130 135 140

Leu Phe Met Arg Leu Arg Ser Ile Arg Cys Leu Arg Asn Ile Ile His
145 150 155 160

Trp Asn Leu Ile Thr Ala Phe Ile Leu Arg Asn Ala Thr Trp Phe Val
165 170 175

Val Gln Leu Thr Met Asn Pro Glu Val His Glu Ser Asn Val Val Trp
180 185 190

Cys Arg Leu Val Thr Ala Ala Tyr Asn Tyr Phe His Val Thr Asn Phe
195 200 205

Phe Trp Met Phe Gly Glu Gly Cys Tyr Leu His Thr Ala Ile Val Leu
210 215 220

Thr Tyr Ser Thr Asp Lys Leu Arg Lys Trp Met Phe Ile Cys Ile Gly
225 230 235 240

Trp Cys Ile Pro Phe Pro Ile Ile Val Ala Trp Ala Ile Gly Lys Leu
245 250 255

Tyr Tyr Asp Asn Glu Lys Cys Trp Phe Gly Lys Arg Ala Gly Val Tyr
260 265 270

Thr Asp Tyr Ile Tyr Gln Gly Pro Met Ile Leu Val Leu Leu Ile Asn
275 280 285

Phe Ile Phe Leu Phe Asn Ile Val Arg Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg
88

261
260

290

295

300

Ala Ser Thr Thr Ser Glu Thr Ile Gln Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala
305 310 315 320

Thr Leu Val Leu Leu Ser Leu Leu Gly Ile Thr Tyr Met Leu Phe Phe
325 330 335

Val Asn Pro Gly Glu Asp Glu Ile Ser Arg Ile Val Phe Ile Tyr Phe
340 345 350

Asn Ser Phe Leu Glu Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ser Val Phe Tyr
355 360 365

Cys Phe Leu Asn Ser Glu Val Arg Ser Ala Val Arg Lys Arg Trp His
370 375 380

Arg Trp Gln Asp Lys His Ser Ile Arg Ala Arg Val Ala Arg Ala Met
385 390 395 400

Ser Ile Pro Thr Ser Pro Thr Arg Val Ser Phe His Ser Ile Lys Gln
405 410 415

Ser Ser Ala Val
420

<210> 43
<211> 38
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 43

Val Ile Leu Ser Leu Asp Val Pro Ile Gly Leu Leu Arg Ile Leu Leu
1 5 10 15

Glu Gln Ala Arg Tyr Lys Ala Ala Arg Asn Gln Ala Ala Thr Asn Ala
20 25 30

Gln Ile Leu Ala His Val
35

<210> 44
<211> 38
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44

262
261

Ile Val Leu Ser Leu Asp Val Pro Ile Gly Leu Leu Gln Ile Leu Leu
1 5 10 15

Glu Gln Ala Arg Ala Arg Ala Ala Arg Glu Gln Ala Thr Thr Asn Ala
20 25 30

Arg Ile Leu Ala Arg Val
35

262 263

03 077204

|-----|
|SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO | SISTEMA DE REGISTRO |

| Fecha 27/10/2003 |

|-----|
| MANTENIMIENTO DE PROTOCOLOS |

|Numero : 15698 |

|Fecha : 24/01/1995 |

|Conferido: THE PROCTER & GAMBLE COMPANY |

| Pais : US ESTADOS UNIDOS DE AMERICA |

|Ciudad : 20 CINCINNATI, OHIO |

|Represent: S Sustituir: S Desistir: S |

|No. Radicacion : 03 077204 Clase: Seev: Seac: |

|-----|
|scencia Codigo Ctr

Nombre |

| 1 5376 ESCOBAR URIBE JIMENA |

| 2 267 ESCOBAR URIBE JIMENA |

| 3 267 A PATINO LEYVA LUIS |

| Encontrados (1/1) registro(s) #

264
263

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION	()	()
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
- Descripción de la invención.	()	()
- Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()

COMPLETA () INCOMPLETA ()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()

COMPLETA () INCOMPLETA ()

ESQUEMA DE TRAZADO ()

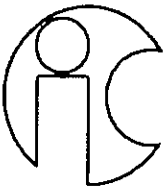
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud.	()	()
- Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()

COMPLETA () INCOMPLETA ()

Firma Responsable:

Fecha:

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 03077204 00000000 Folios: 261
Fecha (AMD): 2003-09-04 16:17:12
Tramite : 011 PCI-PATENT 379 FASE HACI 411 PRESENTI
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

264

2020
Bogotá DC

Folio 265

Doctora
JIMENA ESCOBAR URIBE
Apoderada
THE PROCTER & GAMBLE COMPANY



REFERENCIA:

Radicación No.	03-077204
Solicitud Internacional	PCT/US02/07476
Fecha inicio fase nacional	06/10/2003
Trámite	011
Evento	379
Actuación	416
Oficio No.	97
Folios	001



Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Unica de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial, conforme lo establece el artículo 40 de la misma Decisión.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,

29 ENE. 2004

ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

202052