

20402173

KIVONAT**Eljárások izomtömeg vagy -funkció szabályozására szolgáló
vegyületek azonosítására**

A találmány tárgyát képezik adrenokortikotrop hormon felszabadító faktor 2 receptorokat (CRF_2R) kötő vagy aktiváló és vázizom-tömeget vagy -funkciót in vivo szabályozó vagy potenciálisan szabályozó vegyületek azonosítására szolgáló szűrővizsgálati eljárások. Hasonlóképpen a találmány tárgyát képezik CRF_2R -k vagy CRF_2R szignál transzdukciós reakcióutak aktiválását fenntartó vagy fokozó, valamint CRF_2R vagy CRF expressziót fokozó vegyületek azonosítására szolgáló szűrővizsgálati eljárások. Leírásra kerülnek CRF_2R agonistákat és CRF_2R ellen termelt antitesteket magukba foglaló gyógyászati készítmények, a találmány tárgyaként CRF_2R -t alkalmazó, vázizom-tömeg vagy -funkció növelésére vagy vázizom atrófia kezelésére szolgáló eljárások, valamint izomdisztrófiák kezelésére szolgáló eljárások.

2006 11/66



Eljárások izomtömeg vagy -funkció szabályozására szolgáló vegyületek azonosítására

A találmány tárgyát vázizom-tömeg vagy -funkció szabályozására vagy egy adrenokortikotrop hormon felszabadító faktor-2 receptor (CRF_2R) expressziós aktivitásának szabályozására szolgáló vegyület-jelöltek azonosítási eljárásai képezik. A találmány tárgyát képezik továbbá vázizom atrófia kezelésére vagy vázizom hipertrófia előidézésére szolgáló, a találmány tárgyaként CRF_2R -t alkalmazó eljárások, valamint izomdisztrófiák kezelésére szolgáló, a találmány tárgyaként CRF_2R -t és adrenokortikotrop hormon felszabadító faktor-1 receptort (CRF_1R) alkalmazó eljárások.

Jelenleg két adrenokortikotrop hormon felszabadító faktor receptor (CRF_1R és CRF_2R) ismert, amelyek a G-fehérje kapcsolt receptorok (GPCR) osztályába tartoznak. A CRF_1R vagy CRF_2R agonista aktiválása az adenilát-cikláz $G_{\alpha s}$ aktiválását idézi elő. Az adenilát-cikláz cAMP keletkezését katalizálja, amelynek számos hatása magába foglalja a protein kináz-A aktiválását, intracelluláris kalcium felszabadítását és a mitogén-aktivált protein kináz (MAP) aktiválását. Más tanulmányok arra utalnak, a CRF receptorok agonista aktiválását követő intracelluláris inozitol trifoszfát szintézis fokozódása alapján, hogy a CRF receptorok a $G_{\alpha q}$ -hoz is kapcsolódnak.

A CRF_1R -t és a CRF_2R -t klónozták emberből, patkányból, egérből, csirkéből, marhából, törpeharcsából és birkából. A CRF_1R és a CRF_2R egyaránt egyedi eloszlási mintázatot mutatnak. A humán CRF_2R receptor három izoformáját klónozták (alfa, béta és gamma).



Az alfa és béta CRF₂R homológjait azonosították patkányban.

A CRF receptorok számos liganduma/agonistája ismert. Az adrenokortikotrop hormon felszabadító faktor (vagy hormon, CRF vagy CRH) köti és aktiválja a CRF₁R-t és a CRF₂R-t. A CRF a szervezet stresszreakciónak legfőbb szabályozója. Ez a 41 aminosav hosszúságú peptid számos idegrendszeri, endokrin és immunrendszeri folyamat fölött rendelkezik, mint a hipotalamusz - hipofízis - mellékvese hormonális tengely (HPA tengely) elsődleges szabályozója. Ezen túlmenően jelentős szekvencia homológia található a CRF, a kétéltűek sauvagine peptidje és a csontos halak urotenzin peptidje között, amely utóbbiak mindegyike a CRF₁R és CRF₂R agonistája. E három peptid hasonló biológiai tulajdonságokkal rendelkezik, mint hipotenzív ágensek és ACTH szekretogógok (szekréciót elősegítő anyagok). Ezen túlmenően leírásra került az urokortin, az urotenzin emlősökben található rokon vegyülete.

A CRF receptorok elkülönítése farmakológiailag receptor-szelektív agonisták és antagonisták alkalmazásával történik. E szelektív agonisták és antagonisták, csakúgy, mint a CRFR knockout egerek, hasznosnak bizonyultak annak meghatározásában, hogy melyik CRF receptor közvetít specifikus biológiai reakciókat.

A CRF₁R szerepe meglehetősen jól ismert. A CRF₁R knockout egerek - amelyekben a CRF₁R gént eltávolították - gyenge stresszreakciót és csökkent szorongási viselkedést mutatnak. A CRF₁R a HPA tengely egyik legfontosabb mediátora. Részletesebben, az adrenokortikotrop hormon felszabadító faktor, amely a hipotalamuszból szabadul fel, és a hipotalamusz elülső lebenyébe kerül a hipotalamusz-hipofízis portális rendszeren keresztül, kölcsön-



kölcsön-hatásba lép a hipotalamusz elülső lebenyében elhelyezkedő sejteken található CRF_1 receptorokkal. A CRF_1 R agonista aktiválása eredményeképpen ACTH szabadul fel a hipotalamusz elülső lebenyének sejtjeiből a nagyvérkörbe. A felszabadult ACTH a mellék-vesekéreg sejtjein elhelyezkedő ACTH receptorokhoz kötődik, amelynek hatására mellékvesekéreg-hormonok, többek között korti-koszteroidok szabadulnak fel. A kortikoszteroidok számos hatást közvetítenek, többek között az immunrendszert szupresszálják, a csecsemőmirigy és a lép atrófiájával járó mechanizmus révén. Így a CRF_1 R aktiválása a HPA tengely aktiválása révén közvetetten az immunrendszer alulműködéséhez vezet.

A CRF_2 R szerepe kevésbé feltárt. A CRF_2 R knockout egerek - amelyekből a CRF_2 R gént eltávolították - urokortin stimulációt követően csökkent táplálékfelvétel-redukciót mutattak, valamint az értágulás hiányát, azonban stressz reakciójuk normális volt. A CRF_2 R-vel végzett kísérletek kimutatták, hogy a CRF_2 R a CRFR agonisták hipotenzív/értágító hatásáért felelős, és a CRFR agonistákkal kezelt egerekben megfigyelhető csökkent táplálékfelvételért.

Vázizom atrófia és hipertrófia

A vázizom egy képlékeny szövet, amely könnyen alkalmazkodik akár a fiziológiai igénybevételhez vagy az anyagcsere igényeihez. A hipertrófia a vázizom tömegének növekedését jelenti, míg a vázizom atrófia a vázizom tömegének csökkenésére utal. Akut vázizom atrófiát számos tényező okozhat, többek között: az igénybevétel hiánya sebészeti beavatkozást követően, ágynyugalom vagy csonttörés következtében, denerváció/idegsérülés gerincvelő



sérülés miatt, autoimmun betegség, fertőző betegség, glükokortikoid alkalmazás nem összefüggő betegség okán, fertőzés miatt vagy más okból bekövetkezett vérmérgezés, betegség vagy éhezés okozta tápanyaghiány vagy ürutazás. Vázizom atrófia előfordul normális biológiai folyamatok során, azonban bizonyos orvosi esetekben e normális biológiai folyamat legyengítő mértékű izom atrófiát eredményez. Például az akut vázizom atrófia a mozdulatlanságra kényszerülő betegek (például egy ortopédiai eljárás során) rehabilitációjának jelentős korlátozó tényezője. Ilyen esetekben a vázizom atrófia kiküszöböléséhez szükséges rehabilitációs időszak gyakran jóval hosszabb, mint az eredeti sérülés gyógyulási ideje. Az igénybevétel hiánya miatt kialakuló akut atrófia különösen az időszerűak számára problémás, akiknek izomfunkciója és -tömege már jelentős, életkorral járó hiányosságokat mutat, és az ilyen atrófia hosszan tartó cselekvőképtelenséghez és idő előtti mortalitáshoz vezethet.

Vázizom atrófia krónikus állapotok következtében is előfordulhat, mint például rák cachexia, idült gyulladás, AIDS cachexia, idült obstruktív tüdőbetegség (COPD), szívbénulás, genetikai rendellenességek, például izom disztrófiák, neurodegeneratív betegségek és sarcopenia (életkorral járó izomvesztés). E krónikus állapotokban a vázizom atrófia a mozgékonyság idő előtti elvesztését okozhatja, s így fokozhatja a betegséggel járó morbiditást.

A vázizmok atrófiáját vagy hipertrófiáját szabályozó molekuláris folyamatok kevésbé ismertek. Míg a különféle, atrófiát kiváltó körülmények esetében a vázizom atrófiáját előidéző okok



különbözőek, számos hasonló biokémiai változás történik az érintett izomrostban, többek között csökken a fehérjeszintézis, fokozódik a fehérjebomlás, átalakul mind a kontraktilis, mind az anyagcsere enzim fehérjék izozim összetétele a lassú rost alakoktól (nagyértékben oxidatív anyagcsere/lassú összehúzódásra képes fehérje izoformák) a gyors alakok felé (nagyértékben glükolitikus anyagcsere/gyors összehúzódásra képes fehérje izoformák). A vázizmokban előforduló további változások közé tartozik az erezettség csökkenése és az extracelluláris mátrix átrendeződése. Mind a gyors, mind a lassú izmok mutatnak atrófiát adott körülmények között, a relatív izomvesztesség pedig a specifikus atrófia kiváltó stimulus vagy körülmény függvénye. Fontos megjegyezni, hogy mindeme változások összehangolt szabályozásúak és az élettani és anyagcsere igények változásaitól függően kapcsolódnak be vagy ki.

Az atrófia és hipertrófia során végbemenő folyamatok konzervatívak az emlős fajokon belül. Számos tanulmány kimutatta, hogy ugyanazon alapvető molekuláris, sejtszintű és élettani folyamatok zajlanak le az atrófia során rágcsálókban és emberekben. Így a vázizom atrófia rágcsáló modelljeit sikeresen alkalmazzák a humán atrófiás reakciók megértése és előrejelzése során. Például a különböző módokon kiváltott atrófia rágcsálókban és emberekben is hasonló változásokat eredményez az izom anatómiában, keresztmetszeti területben, funkcióban, rosttípus váltásban, kontraktilis fehérje expresszióban és szövettanilag. Ezen túlmenően számos hatóanyagról bebizonyosodott, hogy mind rágcsálókban, mind az emberekben szabályozza a vázizom atrófiát. E hatóanyagok



közé tartoznak az anabolikus szteroidok, a növekedési hormon, az inzulin-szerű növekedési faktor I és a béta adrenerg agonisták. Az említett adatok együttese bizonyítja, hogy a vázizom atrófiát ugyanazon mechanizmusok eredményezik rágcsálókban és emberekben egyaránt.

Míg néhány hatóanyag vázizom atrófiát szabályozó képességét kimutatták, és jóváhagyták humán alkalmazásukat ilyen indikáció esetén, e hatóanyagok nemkívánatos mellékhatásokat okoznak, mint például szívizom hipertrófia, neoplasia, hirsutismus, androgenizálódás nőknél, fokozott morbiditás és mortalitás, májkárosodás, hypoglykaemia, vázizom-fájdalom, megnövekedett szöveti turgor, szapora szívverés és ödéma. Jelenleg nem ismert hatékony és szelektív kezelés sem az akut, sem a krónikus vázizom atrófia esetében. Ezért van szükség vázizom atrófiát szabályozó további terápiás hatóanyagok azonosítására.

Izomdisztrófia

Az izomdisztrófia öröklött progresszív izomrendellenességek egy csoportját jelenti, amelyeket klinikailag a vázizomgyengeség szelektív eloszlása alapján különböztetnek meg. Az izomdisztrófia két leggyakoribb fajtája a Duchenne- és a Becker-féle disztrófia, amelyek mindegyike az Xp21 lokuszon elhelyezkedő disztrofin gén mutációjának öröklése révén alakul ki. Más disztrófiák többek között a végtagövi izomdisztrófia, amely több genetikai lokusz mutációjának eredménye (többek között a p94 calpain, adhalin, g-szarkoglikán és β -szarkoglikán lokuszok), fascioscapulohumeralis (Landouzy-Dejerine) izomdisztrófia, izomtónusos disztrófia és Emery-Dreifuss izomdisztrófia. A szinte



kizárólag férfiakban előforduló Duchenne-féle izom disztrófia tünetei közé tartozik a totyogó járás, a lábujjon járás, a lordosis, gyakori esések, nehezített felállás és lépcsőn járás. A tünetek 3-7 éves korban kezdődnek, a betegek nagy része 10-12 éves korára tolószékre szorul, és sokan közülük körülbelül 20 éves korban meghalnak, légzési komplikáció következtében. A Duchenne-féle izomdisztrófia jelenlegi kezelése prednizon (kortikoszteroid hatóanyag) adását foglalja magába, amely bár nem gyógyító hatású, lelassítja az izomerősség elvesztését és késlelteti a cselekvőképtelenség kialakulását. A kortikoszteroidok, mint például a prednizon, feltételezhetően az immunsejt aktiválást és infiltrációt blokkolják, amelyet meggyorsít a betegségéből eredő izomrost károsodás. A kortikoszteroid kezelés sajnálatos módon vázizom atrófiát is okoz, amely hatástalanítja az immunválasz blokkolás lehetséges előnyeinek egy hányadát a betegekben. Így tehát szükségessé vált olyan terápiás hatóanyagok azonosítása, amelyek lelassítják az izomrostok károsodását és késleltetik az izomdisztrófiás betegek cselekvőképtelenné válását, azonban kisebb mértékű vázizom atrófiát okoznak, mint a jelenlegi terápiák.

A vázizom atrófia vagy az izomdisztrófiák kezelésére szolgáló vegyületek azonosításának egyik problémája a megfelelő szűrővizsgálati módszerek hiánya. A bejelentésben kimutatjuk, hogy a CRF₂R-k szerepet játszanak a vázizom-tömeg vagy -funkció szabályozásában és a CRF₂R agonisták képesek a vázizom atrófia gátlására és/vagy vázizom hipertrófia indukálására. A találmány megoldja az izom atrófia kezelésére szolgáló vegyületek azonosítá-



sának problémáját azáltal, hogy CRF_2R -t alkalmazó szűrővizsgálati eljárásokat szolgáltat, amelyek izom atrófia kezelésére alkalmas vegyület-jelöltek azonosítására alkalmazhatóak. A találmány hasonlóképpen megoldja az izomdisztrófia kezelésére szolgáló vegyületek azonosításának problémáját azáltal, hogy szűrővizsgálati eljárást szolgáltat CRF_1R -t és CRF_2R -t egyaránt aktiváló vegyület-jelöltek azonosítására.

A találmány tárgyát képezi CRFR-ek alkalmazása olyan vegyület-jelöltek azonosítása céljából, amelyek potenciálisan felhasználhatóak vázizom atrófia kezelése során és/vagy vázizom hipertrófia előidézésére. Részletesebben meghatározva a találmány in vitro eljárásokat szolgáltat vázizom-tömeget vagy -funkciót szabályozó vegyület-jelöltek azonosítására, amely során a tesztelt vegyületet érintkezésbe hozzuk CRF_2R -t expresszáló sejttel vagy izolált CRF_2R -rel és meghatározzuk, hogy a vizsgált vegyület kötődik-e a CRF_2R -hez vagy aktiválja-e azt. A találmány egy másik megvalósítási módja szerint a találmány tárgyát képezi egy eljárás terápiás vegyület-jelöltek azonosítására egy vagy több olyan vegyület-jelöltből álló csoportból, amelyeknek korábban már megállapították CRF_2R -kötő vagy -aktiváló képességét, amely során a vegyület-jelöltet beadjuk egy nem-humán állatnak és meghatározzuk, hogy a vegyület-jelölt szabályozza-e a vázizom-tömeget vagy funkciót a kezelt állatban. A találmány egy további megvalósítási módja szerint a találmány tárgyát képezi egy eljárás vázizom-tömeg vagy -funkció szabályozására szolgáló vegyület-jelöltek azonosítására, amely során bármely sorrendben: (i) egy teszt vegyületet érintkeztetünk egy működőképes CRF_2R -t expresszáló sejt-



tel, és meghatározzuk a teszt vegyület által létrehozott CRF₂R aktivációs szintet; (ii) egy teszt vegyületet érintkeztetünk egy működőképes CRF₁R-t expresszálo sejttel, és meghatározzuk a teszt vegyület által létrehozott CRF₁R aktivációs szintet; majd (iii) összehasonlítjuk a CRF₂R aktiváció és a CRF₁R aktiváció szintjét; és (iv) vázizom-tömeg vagy -funkció szabályozására szolgáló vegyület-jelölteként azonosítjuk azokat a teszt vegyületeket, amelyek azonos aktivitást mutatnak a CRF₂R és CRF₁R felé vagy CRF₂R szelektivitást mutatnak.

A találmány továbbá eljárásokat szolgáltat olyan vegyület-jelöltek azonosítására, amelyek fenntartják vagy felerősítik egy CRF₂R vagy egy CRF₂R szignál transzdukciós reakcióút agonista-indukált aktiválását. E módszerek során bármely sorrendben: (i) egy teszt vegyületet érintkezésbe hozunk egy működőképes CRF₂R-t expresszálo sejttel; (ii) a sejtet egy CRF₂R agonistával kezeljük olyan időtartamig és olyan koncentrációban, amely kontroll sejtekben a CRF₂R deszenzitizálását okozza; majd (iii) meghatározzuk a CRF₂R aktiválás szintjét és vázizomtömeg vagy -funkció szabályozására szolgáló vegyület-jelöltként azonosítjuk azokat a teszt vegyületeket, amelyek fenntartják vagy felerősítik egy CRF₂R vagy egy CRF₂R szignál transzdukciós reakcióút agonista-indukált aktiválását. A találmány egy sajátos megvalósítási módja szerint a találmány tárgyát képezi egy eljárás terápiás vegyület-jelöltek azonosítására egy vagy több vegyület-jelöltből álló csoportból, amelyekről megállapításra került, hogy fenntartják vagy felerősítik egy CRF₂R vagy egy CRF₂R szignál transzdukciós reakcióút agonista-indukált aktiválását, azzal, hogy az



eljárás során a vegyület-jelöltet egy CRF₂R agonistával együtt beadjuk egy nem-humán állatnak és meghatározzuk, hogy a vegyület-jelölt szabályozza-e a vázizom-tömeget vagy funkciót a kezelt állatban.

A találmány továbbá módszereket szolgáltat CRF₂R expresszió fokozására szolgáló vegyület-jelöltek azonosítására, amely során egy vizsgált vegyületet érintkeztetünk egy CRF₂R gént szabályozó elemmel működőképesen összekapcsolt riporter gént tartalmazó sejttel vagy sejt lizátummal és detektáljuk a riporter gén expresszióját. A riporter gén expresszióját fokozó teszt vegyületeket CRF₂R expresszió fokozására szolgáló vegyület-jelöltként azonosítjuk. A találmány egy sajátos megvalósítási módja szerint a találmány tárgyát képezi egy eljárás annak megállapítására, hogy a CRF₂R expressziót fokozó vegyület-jelöltek alkalmazhatóak-e in vivo vázizom-tömeg vagy funkció szabályozására, amely módszer során a vegyület-jelöltet beadjuk egy nem-humán állatnak és meghatározzuk, hogy a vegyület-jelölt szabályozza-e a vázizom-tömeget vagy funkciót a kezelt állatban.

A találmány továbbá módszereket szolgáltat CRF expresszió fokozására szolgáló vegyület-jelöltek azonosítására, amely során egy vizsgált vegyületet érintkeztetünk egy CRF gént szabályozó elemmel működőképesen összekapcsolt riporter gént tartalmazó sejttel vagy sejt lizátummal és detektáljuk a riporter gén expresszióját. A riporter gén expresszióját fokozó teszt vegyületeket CRF expresszió fokozására szolgáló vegyület-jelöltként azonosítjuk. A találmány egy sajátos megvalósítási módja szerint a találmány tárgyát képezi egy eljárás annak megállapítására,



hogy a CRF expressziót fokozó vegyület-jelöltek alkalmazhatóak-e in vivo vázizom-tömeg vagy funkció szabályozására, amely módszer során a vegyület-jelöltet beadjuk egy nem-humán állatnak és meghatározzuk, hogy a vegyület-jelölt szabályozza-e a vázizom-tömeget vagy funkciót a kezelt állatban.

Hasonlóképpen a találmány tárgyát képezi CRF₂R agonisták, működőképes CRF₂R-t kódoló expressziós vektorok, konstitutívan aktív CRF₂R-t kódoló expressziós vektorok és CRF₂R vagy CRF expressziót fokozó vegyületek alkalmazása vázizom atrófia kezelésére. Részletesebben meghatározva a találmány eljárásokat szolgáltat vázizom atrófia kezelésére egy arra rászoruló alany-nál, amely során az alany-nak beadjuk egy CRF₂R agonista, egy működőképes CRF₂R-t kódoló expressziós vektor, egy konstitutívan aktív CRF₂R-t kódoló expressziós vektor, vagy egy CRF₂R vagy CRF expressziót fokozó vegyület biztonságos és hatékony mennyiségét. A találmány egy sajátos megvalósítási módja szerint a találmány tárgyát képezi egy eljárás vázizom atrófia kezelésére egy arra rászoruló alany-nál, amely során egy CRF₂R agonista biztonságos és hatékony mennyiségét adjuk be az alany-nak egy CRF₂R vagy egy CRF₂R szignál transzdukciós reakcióút agonista-indukált aktiválását fenntartó vagy felerősítő vegyület biztonságos és hatékony mennyiségével együtt.

Hasonlóképpen a találmány tárgyát képezi egy CRF₂R agonista alkalmazása vázizom-tömeg vagy -funkció növelésére egy alany-nál. Részletesebben meghatározva a találmány eljárásokat szolgáltat vázizom-tömeg vagy -funkció növelésére egy azt igénylő alany-nál, amely során azonosítunk egy alanyt, amely számára vázizom-tömeg



vagy -funkció növelése kívánatos és beadjuk az alanynak egy CRF₂R agonista biztonságos és hatékony mennyiségét.

A találmány továbbá gyógyászati készítményeket szolgáltat, amelyek egy CRF₂R agonista biztonságos és hatékony mennyiségét és egy gyógyászatilag elfogadható hordozót foglalnak magukba. A találmány egy sajátos megvalósítási módja szerint a gyógyászati készítmény magába foglal egy CRF₂R-re specifikus kiméra vagy humán antitestet. A találmány egy másik sajátos megvalósítási módja szerint a gyógyászati készítmény egy CRF-t vagy egy CRF analógot, előnyösen urokortin II-t foglal magába.

A találmány hasonlóképpen szolgáltat CRF₂R elleni antitesteket, különösen CRF₂R agonista kiméra vagy humán antitesteket.

A leírásban számos publikációra történik hivatkozás. E publikációk közzéléseit teljes egészükben referenciaként építjük be annak érdekében, hogy minél átfogóbban mutassuk be a technika jelenlegi állását, amelyre a találmány vonatkozik.

Szekvencia lista leírás

Az I. táblázat bemutatja a szekvencia listába foglalt CRFR nukleotid és fehérje szekvenciák vagy CRF analóg fehérje szekvenciák mindegyikét, a megfelelő Genbank vagy Derwent azonosító számmal és az állatfaj megnevezésével együtt, amelyből klónozták. Feltüntettük a rokon nukleotid szekvenciák azonosítási számát is, amelyek a szekvencia listában feltüntetett szekvenciával azonos vagy majdnem azonos aminosav szekvenciákat kódolnak. Ezek a rokon szekvenciák leginkább az 5' vagy 3' lefordíthatatlan szekvenciák mennyiségében különböznek.



I. táblázat

Szekvencia elnevezése	Szekvencia száma	Faj	Genbank (GB) vagy Derwent (D) azonosító szám	Rokon Genbank (GB) vagy Derwent (D) azonosító szám
CRF ₁ R	1,2	Homo sapiens	X72304 (GB)	E11431 (GB) L23332 (GB) I92584 (D) T37068 (D) T28968 (D) Q81952 (D)
CRF ₁ R változat	3,4	Homo sapiens	L23333 (GB)	
CRF ₁ R változat	5,6	Homo sapiens	NM_004382 (GB)	
CRF ₁ R változat	7,8	Homo sapiens	AF180301 (GB)	
CRF ₂ R alfa	9,10	Homo sapiens	U34587 (GB) NM_001883 (GB)	E12752 (GB) T12247 (D) T66508 (D)
CRF ₂ R béta	11,12	Homo sapiens	AF011406 (GB)	
CRF ₂ R gamma	13,14	Homo sapiens	AF019381 (GB)	
CRF ₁ R	15,16	Rattus norvegicus	T28970 (D)	L25438 (GB) L24096 (GB) I92586 (D) Q81954 (D) AH006791 (GB)
CRF ₂ R alfa	17,18	Rattus norvegicus	U16253 (GB)	NM_022714 (GB) X01009 (D) T12243 (D)



CRF ₂ R béta változat	19,20	Rattus norvegicus	T12244 (D)	
CRF ₁ R	21,22	Mus musculus	NM_007762 (GB)	X72305 (D)
CRF ₂ R	23,24	Mus musculus	T28972 (D)	U17858 (GB)
CRF ₂ R	25,26	Mus musculus	NM_009953 (GB)	
CRF ₁ R	27,28	Ovis aries	AF054582 (GB)	
CRF ₁ R	29,30	Xenopus laevis	Y14036 (GB)	
CRF ₂ R	31,32	Xenopus laevis	Y14037 (GB)	
CRF ₁ R	33,34	Ameiurus nebulosus	AF229359 (GB)	
CRF ₁ R	35,36	Ameiurus nebulosus	AF229361 (GB)	
CRF ₂ R	37,38	Ameiurus nebulosus	AF229360 (GB)	
CRF ₁ R	39,40	Bos taurus	AB055434 (GB)	
CRF ₁ R	41,42	Gallus gallus	L41563 (GB)	
urokortin II	43	Mus musculus	AF331517	
urokortin-szerű peptid	44	Homo sapiens	BC002647	

Kifejezések és definíciók

Az alábbiakban a leírásban alkalmazott kifejezések definíciójának listája következik.

Az "agonista" kifejezés jelentése bármely vegyület, többek között nem korlátozó módon antitest, amely aktivál egy receptort. Például a CRFR agonisták közé tartoznak nem korlátozó módon a CRF és a CRF analógok.

Az "allélváltozat" kifejezés jelentése egy adott gén vagy géntermék egy változat alakja. A szakemberek számára ismert, hogy számos gén két vagy több allélváltozatban van jelen egy populációban és néhány gén nagyszámú allélváltozattal rendelkezik.



Az "antitest" kifejezés és különböző nyelvtani alakjainak jelentése immunglobulin molekula és immunglobulin molekulák immunológiailag aktív részei, azaz egy antigént specificikusan kötő antigén-kötő hellyel rendelkező molekulák. A "tisztított antitest" kifejezés jelentése olyan antitest, amelyet részlegesen vagy teljesen szétválasztottak a vele természetes állapotban együtt előforduló fehérjéktől és természetes eredetű szerves molekuláktól. A készítmény előnyösen legalább 60% antitestet, még előnyösebben legalább 75% antitestet, még előnyösebben legalább 90% antitestet és legelőnyösebben legalább 99% antitestet tartalmaz, szárazanyagra vetítve.

A "kötőaffinitás" kifejezés jelentése egy ligandum hajlandósága egy receptorral történő kölcsönhatásra, és fordítottnan arányos egy specifikus CRF ligandum-CRFR kölcsönhatás disszociációs állandójával. A disszociációs állandó mérhető közvetlenül standard telítéssel, kompetícióval vagy kinetikai kötés módszerekkel vagy közvetett módon, funkcionális vizsgálatokat és végpontokat alkalmazó farmakológiai módszerekkel.

A "kiméra antitest" kifejezés jelentése egy olyan antitest, amely két vagy több különböző antitest molekulából - azaz például különböző állatfajokból - származó szerkezeti elemeket tartalmaz. A kiméra antitestek közé tartoznak nem korlátozó módon a "humanizált antitestek", amelyek közé tartoznak nem korlátozó módon a komplementaritást meghatározó régió grafting elnevezésű módszerrel létrehozott kiméra antitestek.

A "CRF" kifejezés jelentése adrenokortikotrop hormon felszabadító faktor (corticotropin releasing factor), amely azonos az



adrenokortikotrop hormon felszabadító hormonnal (CRH). CRF peptidre példa többek között az r/h CRF és a birka CRF (lásd a 4,415,558 számú USA-beli szabadalmi leírást) stb.

A "CRF analóg" kifejezés olyan anyagokra vonatkozik, amelyek a CRFR ligandumként viselkednek. Megfelelő CRF analógok számos gerinces fajból hozzáférhetőek, amelyek közé tartozik nem korlátozó módon a sauvagine (lásd például a 4,605,642 számú USA-beli szabadalmi leírást), az urotenzin (lásd például a 4,908,352 és 4,533,654 számú USA-beli szabadalmi leírást), az egér urokortin II (43. számú szekvencia), a humán urokortin-szerű peptid (44. számú szekvencia) [Reyes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 2843-8 (2001)], urokortin (lásd például a WO 97/00063 számú nemzetközi közzétételi iratot) és a 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 és 5,869,450 számú USA-beli szabadalmi leírásokban leírt CRF analógokat, amelyek mindegyikét referenciaként építjük be. Előnyös CRF analóg a sauvagine, az urokortin, az urokortin-szerű peptid, az urokortin II és az urotenzin.

A "CRFR agonista" kifejezés jelentése olyan vegyület vagy molekula, amely képes aktiválni a CRF₁R-t vagy a CRF₂R-t vagy mindkettőt. A CRFR aktiválás az továbbiakban leírtak szerint mérhető.

A "CRFR" kifejezés jelentése CRF₁R vagy CRF₂R.

A "CRF₁R" kifejezés a CRF₁R bármely állatból származó bármely izoformáját jelenti. A CRF₁R korábbi jelölései: CRF-RA, PC-CRF, CRF [Perrin et al., Endocrinology 133, 3058-61 (1993); Chen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 8967-71 (1993); Chang et



al., Neuron 11, 1187-95 (1993); Kishimoto et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 1108-12 (1995); Vita et al., FEBS Lett. 335, 1-5 (1993)] vagy a CRH receptor.

A CRF₁R definíciója nem korlátozó módon magába foglalja azokat a receptorokat, amelyeknek cDNS vagy genomiális szekvenciáját szekvencia adatbázisban helyezték el. Ezek közé tartoznak az 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 ÉS L41563 azonosító számú szekvenciák. E receptorok nukleotid és fehérje szekvenciái hozzáférhetőek a Genbank vagy Derwent adatbázisokból és a könnyebb hozzáférhetőség kedvéért reprezentatív szekvenciákat tüntettünk fel a csatolt szekvencia listában.

A "CRF₂R" kifejezés a CRF₂R bármely állatból származó bármely izoformáját jelenti. A CRF₂R korábbi jelölései: HM-CRF, CRF-RB [Kishimoto et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 1108-12 (1995); Perrin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 2969-73 (1995)].

A CRF₂R definíciója nem korlátozó módon magába foglalja azokat a receptorokat, amelyeknek cDNS vagy genomiális szekvenciáját szekvencia adatbázisban helyezték el. Ezek közé tartoznak az U34587, E12752, NM_001883, T12247, T66508, AF011406, AF019381, U16253, T12244, T28972, U17858, NM_009953, Y14037 ÉS AF229360 azonosító számú szekvenciák. E receptorok nukleotid és fehérje szekvenciái hozzáférhetőek a Genbank vagy Derwent adatbázisokból és a könnyebb hozzáférhetőség kedvéért reprezentatív szekvenciá-



kat tüntettünk fel a csatolt szekvencia listában.

A "CRFR" kifejezés magába foglalja azokat a csonkolt és/vagy mutáns fehérjéket, amelyekben a receptor molekula ligandum kötéshez vagy jelátvitelhez nem szükséges régióit deletálták vagy módosították. A szakember például felismeri, hogy az elsődleges aminosav szekvenciájában egy vagy több konzervatív változtatással rendelkező CRFR hasznosítható a találmány számára. Szakemberek számára ismert, hogy bizonyos aminosavak szubsztitúciója hasonló szerkezetű vagy tulajdonságú aminosavakra (konzervatív szubsztitúció) egy néma változást eredményez, azaz egy, a funkciót nem szignifikánsan módosító változást. Konzervatív szubsztituensek a szakirodalomban jól ismertek. Tudjuk például, hogy ha a GPCR-k transzmembrán alfa-héliceinek lipidek felé irányuló aminosav maradékait más hidrofób aminosavakkal szubsztituáljuk, azok működőképesek maradnak. A természetesen előforduló szekvenciától csonkolás és/vagy mutáció, mint például konzervatív aminosav szubsztitúciók révén különböző CRF₁R-ek szintén a CRF₁R definíciójába tartoznak. A természetesen előforduló szekvenciától csonkolás és/vagy mutáció, mint például konzervatív aminosav szubsztitúciók révén különböző CRF₂R-ek szintén a CRF₂R definíciójába tartoznak.

A szakemberek hasonlóképpen felismerik, hogy a fent említettektől eltérő fajokból, különösen emlősökből származó CRFR-k hasznosíthatóak a találmány számára. A szakemberek továbbá felismerik, hogy az ismert CRFR faj szekvenciájából származó próbák alkalmazásával az ismert szekvenciával homológ cDNS vagy genomiális szekvenciákat nyerhetünk ugyanazon vagy eltérő fajból is-



mert klónozási módszerekkel. Az ilyen CRF₁R receptorok hasonlóképpen beletartoznak a CRF₁R definíciójába, és az ilyen CRF₂R receptorok hasonlóképpen beletartoznak a CRF₂R definíciójába.

Ezen túlmenően a szakember felismeri, hogy a CRFR-k működőképes allélváltozatai vagy működőképes splice változatai jelen lehetnek egy adott fajban, és e változatok alkalmazhatóak a találmány számára. CRFR splice változatokat ír le például az 5,888,811, 5,786,203 és 5,728,545 számú USA-beli szabadalmi leírás, amelyek mindegyikét referenciaként építjük be. Az ilyen CRF₁R változatok hasonlóképpen beletartoznak a CRF₁R definíciójába és ilyen CRF₂R változatok hasonlóképpen beletartoznak a CRF₂R definíciójába.

Egy CRF₁R vagy egy CRF₂R polipeptid, illetve egy CRF₁R vagy egy CRF₂R polipeptid fragmentum fúziói nem CRFR polipeptiddel a CRFR fúziós fehérje elnevezést kapják. A szakember ismert módszerek alkalmazásával képes egy CRF₁R vagy egy CRF₂R fúziós fehérjét létrehozni, amely hasznosítható a találmány számára, bár különbözik a natív CRF₁R-től és CRF₂R-től. A nem-CRFR fehérje például lehet egy szignál (vagy leader) polipeptid szekvencia, amely ko-transzlációsan vagy poszt-transzlációsan irányítja a fehérje transzferét a szintézis helyéről egy másik helyre (például az élesztő α -faktor leader). Vagy a nem-CRFR fehérje a tisztítás vagy a CRFR azonosítás (például poli-His vagy Flag peptid) megkönnyítése végett kerül hozzáadásra. A CRF₁R fúziós fehérjék hasonlóképpen beletartoznak a CRF₁R definíciójába és a CRF₂R fúziós fehérjék hasonlóképpen beletartoznak a CRF₂R definíciójába.

A "CRF₂R szignál transzdukciós reakcióút" kifejezés jelentése bármely szignalizációs reakcióút (például cAMP, MAP kináz) vagy szignalizációs reakcióutak kombinációja, amelyeket a CRF₂R endogén vagy exogén ligandumai szabályoznak.

A "működőképes CRFR-k" kifejezés olyan CRFR-kre vonatkozik, amelyek in vivo vagy in vitro kötik a CRF-t vagy egy CRF analógot és a ligandumkötés hatására aktiválódnak.

A "fúziós gén" kifejezés jelentése két vagy több, működőképesen összekapcsolt DNS kódoló szekvencia, amely egy hibrid fehérjét kódol. Egy "fúziós fehérje" egy fúziós gén fehérje terméke.

A "gátol" kifejezés jelentése egy adott folyamat vagy aktivitás részleges vagy teljes leállítása. Például, egy vegyület gátolja a vázizom atrófiát, ha akár teljesen, akár részlegesen megelőzi az izom atrófiát.

Két DNS szekvencia "működőképesen összekapcsolt", amennyiben a két DNS szekvencia közötti kötés természete 1) nem vezet frame-shift mutációhoz; 2) nem befolyásolja a promóter régió képességét a kódoló szekvenciák transzkripciójának irányítására; vagy 3) nem befolyásolja a megfelelő DNS transzkript fehérjévé történő transzlációját. Például, egy kódoló szekvencia és a szabályozó szekvenciák működőképesen összekapcsoltak, ha kovalensen oly módon összekapcsoltak, hogy a kódoló szekvencia transzkripciója a szabályozó szekvenciák hatása vagy irányítása alatt áll. Vagyis, egy promóter régió működőképesen összekapcsolt egy kódoló szekvenciával, amikor a promóter régió képes a DNS szekvencia transzkripciójának létrehozására oly módon, hogy a keletkező transzkript alkalmas a kívánt fehérjévé vagy polipeptiddé történő

nő transzlációra.

A "százalékos azonosság" kifejezés jelentése az a nukleotid vagy aminosav százalék, amely közös a két szekvencia között, a következőképpen számolva. Egy specifikus szekvencia (a vizsgált szekvencia) százalékos azonosságának kiszámításához a vizsgált szekvencia lényeges részét egy referencia szekvenciával hasonlítjuk össze a BestFit összehasonlító számítógépes program (Wiscinsin Package, Version 10.1) (Genetics Computer Group Inc.) alkalmazásával. Ez a program Smith és Waterman [Advances in Applied Mathematics 2, 482-9 (1981)] algoritmusát használja. A százalékos azonosságot a BestFit program következő alapértelmezési paramétereivel számítjuk ki: scoring matrix = blosum62.cmp; gap creation penalty = 8; gap extension penalty = 2. Amikor egy szekvenciát a referencia szekvenciával összehasonlítunk, a vizsgált szekvencia lényeges része az, amelyik a CRFR szekvenciából származik. Például ha a vizsgált szekvencia egy CRFR/tisztítási jel fúziós fehérje, a szekvenciának csak a CRFR polipeptid részét hasonlítjuk a százalékos azonosság kiszámításához.

A "polipeptid" kifejezés jelentése bármely aminosav lánc, függetlenül annak hosszától vagy poszt-transzlációs módosítástól (például foszforilálás vagy glikozilálás).

A "promóter" kifejezés jelentése egy DNS szekvencia, amely egy gén vagy kódoló régió transzkripció iniciációját és transzkripció rátáját szabályozza.

A "profilaktikus kezelés" kifejezés jelentése egy, vázizom atrófia jeleit nem mutató alany megelőző kezelése, vázizom atrófia megjelenésének teljes vagy részleges gátlása céljából. A



szakember felismerheti, hogy bizonyos egyedeket a vázizom atrófia veszélye fenyeget, mint azt a fentiekben kifejtettük. Továbbá a szakember felismeri, hogy amennyiben a vázizom atrófiához vezető biokémiai változásokat megfelelően szabályozzuk, az atrófia megjelenése megelőzhető vagy lecsökkenthető a veszélyeztetett egyedeknél. Például kortikoszteroid kezelést megkezdő izomdisztrófiás betegeknél fennáll vázizom atrófia kialakulásának veszélye, tehát ilyen betegek profilaktikus kezelése indokolt lenne.

A "szabályoz" kifejezés jelentése - minden nyelvtani alakjában - növelni, csökkenteni vagy fenntartani, például vázizom-tömeget vagy -funkciót szabályozni azt jelenti, hogy a vázizom-tömeg vagy -funkció szintjét növelni, csökkenteni vagy fenntartani.

A "vázizom-tömeg vagy -funkció szabályozás" magába foglalja a vázizom-tömeg, a vázizom-funkció vagy mindkettő szabályozását.

A "szabályozó elem" kifejezés jelentése egy DNS szekvencia, amely képes egy működőképesen hozzákapcsolt DNS szekvencia transzkripciójának szintjét irányítani. A szabályozó elemek definíciója magába foglalja a promótereket és enhanszereket. Például egy CRFR gén szabályozó elem egy olyan DNS szekvencia, amely képes a CRFR gén transzkripciójának szintjét irányítani.

A "riporter gén" kifejezés jelentése egy kódoló szekvencia, amelynek terméke detektálható, előnyösen kvantitatív módon, ahol a riporter gén a mérni kívánt jelre érzékeny heterológ promóterrel vagy enhanszer elemmel működőképesen kapcsolt. Ebben az összefüggésben a promóter vagy enhanszer elem elnevezése a leírásban "érzékeny elem".



A "szelektív agonista" kifejezés jelentése, hogy az agonista szignifikánsan nagyobb aktivitást mutat egy bizonyos receptor (bizonyos receptorok) iránt összehasonlítva más receptorokkal, amelyekkel szemben nem feltétlenül teljesen inaktív.

A "vázizom hipertrófia" kifejezés jelentése vázizom-tömeg vagy vázizom funkció, vagy mindkettő növekedése.

A "vázizom atrófia" kifejezés jelentése vázizom-tömeg vagy vázizom funkció, vagy mindkettő csökkenése.

A "splice változat" kifejezés jelentése olyan mRNS vagy fehérje, amely alternatív exon felhasználás eredménye. A szakember felismeri, hogy a sejttípustól függően vagy akár egy sejttípuson belül egy mRNS expresszáldhat egy más formában, splice változatként, s így a lefordított fehérje az expresszált mRNS-től függően különböző lesz.

Egy anyag "terápiásan hatékony mennyisége" egy olyan mennyiséget jelent, amely képes gyógyászatilag kívánatos eredményt előidézni a kezelt betegnél, például csökkenti a vázizom atrófiát, növeli a vázizom-tömeget vagy növeli a vázizom funkciót, elfogadható előny-kockázat arány mellett humán vagy nem-humán emlős esetében.

A "terápiás kezelés" kifejezés jelentése egy olyan alany kezelése, amelynél izomtömeg vagy izomfunkció növelése kívánatos. Például, vázizom atrófia tüneteit mutató alany kezelése a már meglévő vázizom atrófia részleges vagy teljes megfordítása céljából, vagy további vázizom atrófia részleges vagy teljes gátlása céljából az illető alany terápiás kezelését jelenti. A "terápiás kezelés" kifejezés magába foglalja például vázizom atrófia tüneteit nem muta-



tó alany kezelését vázizom hipertrófia előidézése céljából, például haszonállatok kezelése izomtömeg növelésére.

A "kezelés" kifejezés jelentése profilaktikus vagy terápiás kezelés.

Amennyiben másképp nem definiált, a leírásban szereplő tudományos kifejezések mindegyike a fehérjekémia, gyógyszerészet vagy molekuláris biológia szakemberei által alkalmazott általános jelentéssel bír. A leírásban szereplő módszerek, anyagok és példák nem korlátozó jellegűek. A leírtakhoz hasonló vagy azzal egyenértékű más módszerek és anyagok alkalmazhatóak a találmány gyakorlatában vagy vizsgálatában.

A CRF receptorok szerepe a vázizom-tömeg szabályozásában

A szakember számára felismerhető a találmány alkalmazhatósága a technika állása szerint elérhető információ és az alábbiakban leírtak alapján. A bemutatott eredmények alátámasztják, hogy egy CRF_1R -t és CRF_2R -t egyaránt aktiváló CRF receptor agonista (nem-szelektív CRFR agonista) beadása leállítja és/vagy meggátolja a denerváció, az igénybevétel hiánya vagy a dexamethasone kezelés vázizom atrófiát előidéző hatását vázizom atrófiás modellekben. Ezen túl adatok bizonyítják, hogy CRFR agonisták anti-atrófiás hatása nem mutatkozik CRF_2R knock-out egerekben. Továbbá, azokban a patkányokban, amelyekben a CRF_1R -mediált HPA tengely a mellékvese eltávolítása (műtéti eltávolítás) következtében megszakad, az állatok kezelése nem-szelektív CRFR agonistával anti-atrófiás hatást mutat, tanúskodván arról, hogy az anti-atrófiás hatást a CRF_2R közvetíti. Ezenkívül eredmények mutatják, hogy nem-szelektív CRFR agonista alkalmazása hipertrófia előidéző hatással jár.



Ezen adatok összessége bizonyítja a CRF₂R szabályozó szerepét a vázizom atrófia folyamatában. A CRFR-k specifikus in vivo szerepének vizsgálatához gyógyászati hatóanyagként sauvagine-t (Bachem Biosciences, Inc. King of Prussia, PA) és urokortint (Bachem Biosciences, Inc.) alkalmazunk, amelyek szelektív CRFR agonisták az alábbiakban leírt különböző vázizom atrófiás modellekben. Ezek a hatóanyagok részletes jellemzése a szakirodalomban leírt.

Az 1-7. és 9. ábrákon bemutatott kísérleti eredmények bizonyítják, hogy szelektív CRFR agonisták alkalmazása a vázizom atrófia statisztikailag szignifikáns gátlását eredményezi. A 8. ábra mutatja, hogy a sauvagine CRFR agonista anti-atrófiás hatását a CRF₂R közvetíti. CRFR agonisták napi kétszeri beadása, teofillin foszfodieszteráz gátlóval kombinálva a vázizom atrófia gátlását eredményezte vázizom atrófiás állatmodellekben. A teofillin hozzáadása a CRFR agonista hatás időtartamának és erősségének fokozása érdekében történt, s így e vegyületek hatékonyságának növekedését idézte elő. Egyedül teofillin beadása nem volt hatékony ezen atrófiás modellekben, tehát a teofillinnel együttesen alkalmazott CRFR agonista anti-atrófiás hatása a CRFR agonista hatásának eredménye. Továbbá, amikor teofillin adagolása nélkül a CRFR agonistát ozmotikus minipumpa segítségével folyamatosan adagoltuk, hasonlóképpen vázizom atrófia gátlás és/vagy vázizom hipertrófia következett be. Az eredmények statisztikai szignifikanciáját ANCOVA módszerrel [Montgomery, "Design and Analysis of Experiments", John Wiley and Sons, New York (1984)] határoztuk meg. Az 1-9. ábrákon alkalmazott rövidítések:



g - gramm; SEM - középérték szórása.

Részletesebben, az 1. ábra mutatja, hogy a sauvagine gátolja a középső lábikra-izom denerváció-indukált atrófiáját egy egér ülőideg denervációs sorvadás modell során. Jelmagyarázat: A - fiziológiás sóoldat (kontroll); B - sauvagine (0,01 mg/kg) + teofillin; C - sauvagine (0,03 mg/kg) + teofillin; D - sauvagine (0,1 mg/kg) + teofillin; E - sauvagine (1,0 mg/kg) + teofillin; * - $p \leq 0,05$ a sóoldathoz viszonyítva. Jobb oldali ülőidegük denerválását követően hím egerek lapockájának középső részébe naponta kétszer a fentiekben jelzett mennyiségű sauvagine-t vagy kontrollként hordozóanyagot (fiziológiás sóoldat) injektálunk szubkután 9 napon keresztül. A sauvagine-t 30 mg/kg teofillinnel együtt adjuk be. A kilencedik napon eltávolítjuk a lábikra-izmot, majd megmérjük tömegét az atrófia mértékének megállapítása céljából.

A 2. ábra mutatja, hogy a sauvagine gátolja az elülső sípcsonti izom denerváció-indukált atrófiáját egy egér ülőideg denervációs sorvadás modell során. Jelmagyarázat: A - víz (kontroll); B - sauvagine (0,1 mg/kg); C - sauvagine (0,3 mg/kg); D - sauvagine (1,0 mg/kg); * - $p \leq 0,05$ a vízhez viszonyítva. Jobb oldali ülőidegük denerválását követően hím egerekbe sauvagine-t vagy kontrollként hordozóanyagot (fiziológiás sóoldat) adunk be folyamatos infúzióval egy Alzet ozmotikus minipumpa segítségével (5 μ l/óra) a kísérleti időszak végéig (teofillin hozzáadása nélkül). A sauvagine napi beadott mennyiségét fent jelöljük. A minipumpa beültetése az ülőideg denerválással egyidejűleg történt. A kilencedik napon eltávolítjuk az elülső sípcsonti izmot,



majd megmérjük tömegét az atrófia mértékének megállapítása céljából.

A 3. ábra mutatja, hogy a sauvagine gátolja az elülső sípcsonti izom (3A. ábra) és a középső lábikra-izom (3B. ábra) glukokortikoid-indukált atrófiáját az egér glukokortikoid-indukált atrófia modell során. Jelmagyarázat: A - víz, az ivóvízben nincs dexamethasone (nem-atrófiás kontroll); B - víz + dexamethasone (atrófiás kontroll); C - sauvagine (0,1 mg/kg) + dexamethasone; D - sauvagine (0,3 mg/kg) + dexamethasone; E - sauvagine (1,0 mg/kg) + dexamethasone; * - $p \leq 0,05$ a vízhez viszonyítva; # - $p \leq 0,05$ a víz + dexamethasone-hoz viszonyítva. Glukokortikoid (dexamethasone) ivóvízbe történő adagolását (1,2 mg/kg/nap) követően hím egerekbe a fent jelölt hatóanyagot vagy kontrollként hordozóanyagot (fiziológias sóoldat) adunk be folyamatos infúzióval egy Alzet ozmotikus minipumpa segítségével (5 μ l/óra) a kísérleti időszak végéig (teofillin hozzáadása nélkül). A sauvagine napi beadott mennyiségét fent jelöljük. A minipumpa beültetése a dexamethasone adagolás megkezdésével egyidejűleg történt. A sauvagine adagolásának megkezdésétől számított kilencedik napon eltávolítjuk a középső lábikra-izmot és az elülső sípcsonti izmot, majd megmérjük tömegét az atrófia mértékének megállapítása céljából.

A 4. ábra mutatja, hogy a sauvagine gátolja az elülső sípcsonti izom (4A. ábra) és a középső lábikra-izom (4B. ábra) igénybevétel hiánya következtében kialakuló atrófiáját. Jelmagyarázat: A - fiziológias sóoldat (kontroll); B - teofillin; C - sauvagine (0,03 mg/kg) + teofillin; D - sauvagine (0,1 mg/kg) +



teofillin; E - sauvagine (0,3 mg/kg) + teofillin; * - $p \leq 0,05$ a sóoldathoz viszonyítva. Jobb hátsó lábuk begipszelését követően hím egerek lapockájának középső részébe naponta kétszer a fenti-ekben jelzett mennyiségű sauvagine-t vagy kontrollként hordozóanyagot (fiziológias sóoldat) injektálunk szubkután 10 napon keresztül. A sauvagine-t a naponta kétszer intra-peritoneálisan beadott foszfodieszteráz inhibitor teofillin-nel (30 mg/kg) együtt alkalmazzuk. A tizedik napon eltávolítjuk a középső lábikraizmot és az elülső sípcsonti izmot, majd megmérjük tömegét az atrófia mértékének megállapítása céljából.

Az 5. ábra mutatja, hogy a sauvagine és az urokortin egyaránt gátolja az elülső sípcsonti izom denerváció-indukált atrófiáját egy egér ülőideg denervációs sorvadás modell során. Ezen túlmenően urokortin kezelés esetében a nem-denervált láb hipertrófiája figyelhető meg. Jelmagyarázat: A - víz (kontroll); B - sauvagine (1 mg/kg/nap); C - urokortin (1,0 mg/kg/nap); * - $p \leq 0,05$ a vízhez viszonyítva. Jobb oldali ülőidegük denerválását követően hím egerekbe a fent jelölt hatóanyagokat vagy kontrollként hordozóanyagot (fiziológias sóoldat) adunk be folyamatos infúzióval egy Alzet ozmotikus minipumpa segítségével (5 μ l/óra) a kísérleti időszak végéig (teofillin hozzáadása nélkül). A hatóanyagok napi beadott mennyiségét fent jelöljük. A minipumpa beültetése az ülőideg denerválással egyidejűleg történt. A kilencedik napon eltávolítjuk az elülső sípcsonti izmot, majd megmérjük tömegét az atrófia mértékének megállapítása céljából.

A 6. ábra mutatja, hogy az urokortin gátolja az elülső sípcsonti izom (6A. ábra) és a középső lábikra-izom (6B. ábra)

igénybevétel hiánya következtében kialakuló atrófiáját az egér láb begipszelését követő atrófia modellben. Jelmagyarázat: A - fiziológiás sóoldat (kontroll); B - urokortin (0,3 mg/kg) + teofillin; * - $p \leq 0,05$ a sóoldathoz viszonyítva. Jobb hátsó lábuk begipszelését követően hím egerek lapockájának középső részébe naponta kétszer urokortint vagy kontrollként hordozóanyagot (fiziológiás sóoldat) injektálunk szubkután 10 napon keresztül. Az urokortint a 6A. és 6B. ábrákon feltüntetett mennyiségben adagoljuk. Az urokortint a naponta kétszer intra-peritoneálisan beadott foszfodieszteráz inhibitor teofillin-nel (30 mg/kg) együtt alkalmazzuk. A tizedik napon eltávolítjuk a középső lábikraizmot és az elülső sípcsonti izmot, majd megmérjük tömegét az atrófia mértékének megállapítása céljából.

A 7. ábra mutatja, hogy a sauvagine gátolja az elülső sípcsonti izom (7A. ábra), az EDL (7B. ábra), a talpemelő izom (7C. ábra), a középső lábikra-izom (7D. ábra) és a talpizom denerváció-indukált atrófiáját. Ezen túlmenően a sauvagine statisztikailag szignifikáns mértékű hipertrófiát okozott a nem-denervált EDL izomban (7B. ábra). Jelmagyarázat: A - fiziológiás sóoldat (kontroll); B - sauvagine (0,003 mg/kg) + teofillin; C - sauvagine (0,01 mg/kg) + teofillin; D - sauvagine (0,03 mg/kg) + teofillin; # - $p \leq 0,05$ a megfelelő kontrollhoz viszonyítva. Jobb oldali ülőidegük denerválását követően hím mellékvese-eltávolított patkányok (mellékvese-eltávolított patkányokat alkalmazunk, hogy kiküszöböljük a HPA tengely CRF₁R agonizmus révén bekövetkező aktiválásának vázizom atrófia indukáló hatásait) lapockájának középső részébe naponta kétszer a fentiekben jelzett

mennyiségű sauvagine-t vagy kontrollként hordozóanyagot (fiziológias sóoldat) injektálunk szubkután 9 napon keresztül. A sauvagine-t 30 mg/kg teofillin-nel együtt adjuk be. A kilencedik napon eltávolítjuk az elülső sípcsonti izmot, a hosszú ujjfesztő izmot (EDL), a talpemelő izmot, a középső lábikraizmot és a talpizmot, majd megmérjük tömegüket az atrófia mértékének megállapítása céljából.

A 8. ábra mutatja, hogy a sauvagine a vad típusú egerekben gátolja, azonban CRF₂R knockout egerekben nem gátolja az atrófiát az egér ülőideg denervációs sorvadás modell során. Jelmagyarázat: A-C - vad típusú egér; D-F CRF₂R knockout egér. A és D - víz (kontroll); B és E - sauvagine (0,3 mg/kg); C és F - sauvagine (1,0 mg/kg); * - $p \leq 0,05$ a vízhez viszonyítva. Jobb oldali ülőidegük denerválását követően nőstény vad típusú és CRF₂R knockout egerekbe sauvagine-t vagy hordozóanyagot adunk be folyamatos infúzióval egy Alzet ozmotikus minipumpa segítségével (5 µl/óra) 9 napon keresztül a fent jelölt napi beadott mennyiségben. A kilencedik napon eltávolítjuk az elülső sípcsonti izmot, majd megmérjük tömegét az atrófia mértékének megállapítása céljából.

A 9. ábra mutatja, hogy a sauvagine gátolja az EDL és a talpemelő izom tömegének igénybevétel hiánya következtében kialakuló csökkenését (9A. ábra) és gátolja az izomfunkció csökkenését (az abszolút izomerő méréssel meghatározva) (9B. ábra) az egér láb begipszelését követő atrófia modellben. Jelmagyarázat: A - nem gipszelt izom (kontroll); B - gipszelt izom, sóoldat (kontroll); C - gipszelt izom, sauvagine (0,3 mg/kg) + teofillin (30 mg/kg); * - $p \leq 0,05$ a sóoldathoz viszonyítva. Jobb hátsó lábuk begipsze-

lését követően hím egerek lapockájának középső részébe naponta kétszer a fentiekben jelzett mennyiségű sauvagine-t vagy kontrollként hordozóanyagot (fiziológiai sóoldat) injektálunk szubkután 10 napon keresztül. A sauvagine-t teofillin-nel (30 mg/kg) együtt alkalmazzuk. A tizedik napon eltávolítjuk az EDL-t és a talpemelő izmot, majd megmérjük abszolút erejüket és tömegüket az atrófia mértékének megállapítása céljából.

CRFR-k, CRF vagy CRF analógok, vagy CRFR-eket expresszálo sejtvonalak előállítása

CRF₁R és CRF₂R receptorokat, CRF-et és CRF analógokat számos célra előállíthatunk, amelyek közé tartozik nem korlátozó módon antitestek létrehozása a találmány szerinti szűrővizsgálatokban reagensként történő alkalmazásra, és vázizom atrófia kezelése során gyógyászati reagensként történő alkalmazásra. A szakember számára egyértelmű, hogy a találmány bizonyos megvalósítási módjaira tisztított polipeptidek alkalmasak, míg más megvalósítási módokban a polipeptideket expresszálo sejtvonalak hasznosíthatóak. Például olyan helyzetben, amikor fontos megőrizni a CRFR szerkezeti és működési jellegzetességeit, például CRFR-eket aktiváló vegyület-jelöltek azonosítására szolgáló szűrővizsgálat során, működőképes CRFR receptorokat expresszálo sejtek alkalmazása kívánatos.

Mivel a CRF és a CRF analógok rövid polipeptidek, a szakember számára egyértelmű, hogy e polipeptidek legkönnyebben közvetlen szintézissel állíthatóak elő, a szakemberek számára jól ismert módszerek segítségével, szemben a rekombináns technikákkal. Ezen túl, e molekulák közül több kereskedelmi forgalomban hozzáférhető.

Amennyiben a CRFR forrás a polipeptidet expresszáló sejtvonal, a sejtek például endogén CRFR expresszióval rendelkezhetnek, az endogén CRFR expresszió növelésére stimuláltak vagy genetikailag módosítottak CRFR expresszálása céljából. Szakemberek számára jól ismertek a módszerek annak meghatározására, hogy egy sejtvonal expresszálja-e a kívánt polipeptidet: például a polipeptid detektálható egy megfelelő antitesttel, alkalmazható DNS próba a fehérjét kódoló mRNS detektálására (például Northern blot vagy PCR módszerek), vagy mérhető a kívánt polipeptidre szelektív hatóanyag kötése (például radioaktívan jelölt szelektív agonista).

Rekombináns DNS technológia alkalmazása a CRFR-k, CRF vagy CRF analógok, vagy CRFR-eket expresszáló sejtvonalak előállítása során különösen indokolt. E rekombináns módszerek a szakemberek számára jól ismertek. Rekombináns CRF₁R vagy CRF₂R expresszálása céljából a kívánt polipeptidet egy vagy több szabályozó elem irányítása alatt kódoló nukleinsavat magába foglaló expressziós vektort készítünk. CRF₁R-t és CRF₂R-t kódoló genomiális vagy cDNS szekvenciák több faj esetében leírásra kerültek és könnyen hozzáférhetőek a GenBank adatbázisból (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) vagy a Derwent adatbázisból (<http://www.derwent.co.uk./geneseq/index.html>), valamint a bejelentés szekvencia listájából. A CRF₁R és CRF₂R szekvenciák azonosító számai és a nekik megfelelő szekvencia számozás az 1. táblázatban található. A nyilvánosan hozzáférhető szekvencia információ alkalmazása esetén egy CRF₁R-t vagy CRF₂R-t kódoló nukleinsav izolálásának egyik módszere egy genomiális vagy cDNS könyvtár szűrése egy természetes vagy mesterségesen

szintetizált DNS próbával, a szakirodalomban jól ismert módszerekkel, például a szekvencia megfelelő könyvtárból történő PCR amplifikációja segítségével. Egy másik módszer a kívánt receptorra specifikus oligonukleotid primerek alkalmazása cDNS PCR amplifikálására közvetlenül egy adott szövetből (például vázizom) izolált mRNS-ből. Ilyen izolált mRNS kereskedelmi forgalomban hozzáférhető. Szakemberek számára hasonlóképpen egyértelmű, hogy az ismert CRFR receptor szekvenciák szakaszainak megfelelő nukleinsav próbák alkalmazásával más fajok a homológ cDNS-ei vagy genomiális szekvenciái kinyerhetőek ismert módszerek segítségével. A találmány módszerei során különösen hasznosak nem korlátozó módon megemlítve a humán, egér, patkány, sertés, majom, csimpánz, selyemmajom, kutya, szarvasmarha, birka, macska, csirke és pulyka fajokból származó CRFR receptorok. A kívánt CRFR-t kódoló izolált nukleinsav molekulát a szakemberek által jól ismert módszerekkel egy megfelelő expressziós vektorba ligáljuk. Az így elkészített expressziós vektort egy gazdasejtben expresszáljuk, és a receptort expresszáló gazdasejteket közvetlenül a szűrővizsgálatban alkalmazzuk, vagy a receptort izoláljuk a receptort expresszáló gazdasejtekből és az izolált receptort használjuk a szűrővizsgálat során.

A találmány céljaira alkalmazható gazdasejt - expressziós vektor rendszerek közül megemlíthetőek nem korlátozó módon a CRFR nukleotid szekvenciákat tartalmazó rekombináns bakteriofág DNS-sel, plazmid DNS-sel vagy kozmid DNS-sel transzformált mikroorganizmusok, például baktériumok (például E. coli, B. subtilis); CRFR nukleotid szekvenciákat tartalmazó rekombináns



élesztő expressziós vektorral transzformált élesztőgombák (például *Saccharomyces*, *Pichia*); CRFR nukleotid szekvenciákat tartalmazó rekombináns vírus expressziós vektorral (például Baculovirus) fertőzött rovarsejt rendszerek; CRFR nukleotid szekvenciákat tartalmazó rekombináns vírus expressziós vektorokkal (például karfiol mozaik vírus, dohánymozaik vírus) fertőzött vagy rekombináns plazmid expressziós vektorokkal (például Ti plazmid) transzformált növényi sejtszisztemek; emlős sejtek genomjából (például metallothionein promóter) vagy emlős vírusokból (például retrovírus LTR) származó promótereket és CRFR nukleotid szekvenciákat tartalmazó rekombináns expressziós szerkezeteket hordozó emlős sejtszisztemek (például COS, CHO, HEK293, NIH3T3).

A gazdasejtet a kívánt polipeptid előállítására használjuk. Mivel a CRFR egy membrán-kötött molekula, a gazdasejt membránjából tisztítjuk vagy a sejtmembránba beágyazva használjuk fel, azaz az egész sejteket vagy a sejtek membrán frakcióit alkalmazzuk. A CRFR receptorok expressziós rendszerekből történő tisztítása megfelelő detergenssek és lipid micellák alkalmazásával történik, a szakemberek számára jól ismert módszerekkel.

Bakteriális rendszerekben számos előnyös expressziós vektor választható az expresszált géntermék alkalmazásának függvényében. Például amikor nagymennyiségű fehérje termelésére van szükség CRFR-ek elleni antitest létrehozása céljából, magas szintű fehérje termék expressziót irányító vektorok alkalmazása kívánatos. A szakember számos módszerrel képes ilyen vektor szerkezetek előállítására és a fehérjék tisztítására, többek között sze-



lektív tisztítási technológiákkal, mint például fúziós fehérje szelektív oszlopok és antitest oszlopok segítségével, és nem-szelektív tisztítási technológiákkal.

Egy rovar fehérje expressziós rendszerben egy bakulovírust, az *A. californica* nukleáris polyhedrosis vírust (AcNPV) alkalmazzuk vektorként idegen gén expresszáására *S. frugiperda* sejtekben. Ebben az esetben CRFR nukleotid szekvenciákat klónozzuk a vírus nem-esszenciális régióiba és azokat AcNPV promóter irányítása alá helyezzük. A rekombináns vírusokkal sejteket fertőzünk meg, amelyekben az inszertált gén expresszálódik és a fehérjét a szakemberek számára ismert számos módszer egyikevel tisztítjuk.

Emlős gazdasejtekben számos vírus-alapú expressziós rendszer alkalmazható. Ilyen expressziós rendszerek esetében gyakran szükséges specifikus iniciációs szignálok létrehozása a vektorokban az inszertált nukleotid szekvenciák hatékony transzlációja érdekében. Ez különösen fontos abban az esetben, ha az alkalmazott CRFR gén szakasz nem tartalmaz endogén iniciációs szignált. Az iniciációs szignál elhelyezése az inszertált nukleotid szekvencia kódoló régiójával azonos leolvasási keretben, transzkripció és transzláció enhanszer elemek bevitele és a rekombináns fehérje tisztítása a szakemberek számára ismert számos módszer egyikével végezhető. Emlős gazdasejtekben hasonlóképpen fontos egy megfelelő sejttípus kiválasztása, amely a rekombináns fehérje szükséges poszttranszlációs módosításait végre tudja hajtani. Ezek a módosítások, például hasítás, foszforilálás, glikozilálás stb. a módosító enzimet hordozó meg-



felelő gazdasejt kiválasztását teszik szükségessé. Ilyen gazdasejtek közé tartozik nem korlátozó módon a CHO, HEK293, NIH3T3, COS stb, amelyek a szakemberek számára jól ismertek.

Rekombináns fehérjék hosszú távú, magas szintű expressziója céljára stabil expresszió előnyös. Például szerkeszthetőek CRFR-eket stabilan expresszáló sejtvonalak. A szakemberek ismert módszerekkel, például elektroporáció, kalcium-foszfát transzfekció vagy liposzóma-mediált transzfekció segítségével előállíthatnak CRFR-eket stabilan expresszáló sejtvonalat. Ez általában úgy történik, hogy megfelelő expresszió szabályozó elemeket (például promóter szekvenciák, enhanszer szekvenciák, transzkripció terminációs szekvenciák, poliadenilációs helyek, transzláció kezdőhelyek stb.), egy szelektálható markert és a kívánt gént tartalmazó expressziós vektor segítségével transzfektálunk sejteket. A szelektálható marker elhelyezkedhet a kívánt génnel azonos vektorban vagy egy különálló vektorban, amelyet ko-transzfektálunk a CRFR szekvenciát hordozó vektorral. Az expressziós vektorban a szelektálható marker rezisztenciát biztosíthat és lehetővé teheti, hogy a sejt stabilan integrálja a vektort a kromoszómáiba, hogy góccokká növekedjen, amelyek klónozhatóak és sejtvonallá fejleszthetőek. Alternatív módon az expressziós vektor lehetővé teheti a szelektálható markert expresszáló sejtek szelekcióját a marker fizikai tulajdonságára alapozva, például a zöld fluoreszcens fehérje (Green Fluorescent Protein = GFP) expressziója lehetővé teszi a markert expresszáló sejtek kiválasztását fluoreszcencia-aktivált sejt osztályozás (Fluorescence Activated Cell Sorting = FACS) analízis alkalmazá-



sával.

A szakember képes kiválasztani egy megfelelő transzfektálandó sejttípust annak érdekében, hogy lehetővé váljon a kívánt gént sikeresen integráló sejtek szelekciója. Például, ha a szelektálható marker herpes simplex vírus timidin kináz, hipoxantinguanin foszforibozil-transzferáz vagy adenin foszforibozil-transzferáz, a megfelelő sejttípus tk-, hgprt- illetve aprt-sejt lehetne. Vagy alkalmazhatunk normál sejteket, ha a szelektálható marker dhfr, gpt, neo vagy hygromycin rezisztenciát biztosítanak. Ilyen rekombináns sejtvonalak alkalmazhatóak a CRFR aktivítást befolyásoló vegyület-jelöltek azonosítására.

CRFR antitestek előállítása

A találmány tárgyát képezik egy CRFR egy vagy több epitopját szelektíven felismerő antitestek. Ilyen antitest lehet például poliklonális antitest, monoklonális antitest, kiméra antitest, humán antitest, egyláncú antitest, Fab fragment, F(ab')₂ fragment, egy Fab expressziós könyvtár segítségével létrehozott molekula, transzgénikus egérben előállított humán antitest (poliklonális vagy monoklonális) vagy bármely említett molekula epitop kötő szakasza. Terápiás alkalmazás esetén előnyösek a kiméra vagy humán antitestek, még előnyösebbek a humán antitestek.

Az antitesteket használhatjuk a leírásban teszt vegyületek kiértékelésére bemutatott vegyület-szűrővizsgálati módszerekkel együtt, például CRFR polipeptidek immobilizálására, vagy ilyen antitestek alkalmazhatóak génterápiás módszerekkel együtt például CRFR-k expressziójának vizsgálatára akár sejtekben vagy a pá-



ciens szöveteiben, amelyekbe géneket vittünk be. Ezen túlmenően a találmány szerinti antitestek alkalmazhatóak vázizom atrófia kezelése során. CRFR-re szelektív antitestek szűrhetőek a találmány szerinti módszerekkel CRFR agonista antitestek csoportjának azonosítása céljából. Ezen túl, CRF-re vagy egy CRF analógra specifikus antitestek ellen létrehozott anti-idiotípusos antitestek alkalmazhatóak CRFR agonistaként, és az anti-CRFR antitestekhez hasonlóan szűrhetőek CRFR aktiváló képességük alapján a találmány szerinti módszerekkel.

Antitestek előállítására céljából különféle gazdaállatokat immunizálhatunk CRFR, CRF vagy VRF analóg, anti-CRF antitest, anti-CRF analóg antitest vagy ezek immunogén szakaszainak injekálásával a szakirodalomban jól ismert módszerekkel. Egy anti-idiotípusos antitest létrehozásakor az immunogén egy anti-CRF antitest vagy anti-CRF analóg antitest. Anti-idiotípusos antitestek előállítását leírja például a 4,699,880 számú USA-beli szabadalmi leírás, amelyet referenciaként építünk be. Megfelelő gazdaállatra példaképpen nem korlátozó módon megemlíthetjük a nyulat, egeret, kecskét, juhot és lovat. Az immunizációs módszerek a szakirodalomban jól ismertek. Poliklonális antitesteket tisztíthatunk az immunizált állatok szérumból, vagy monoklonális antitesteket előállíthatunk a szakirodalomban jól ismert módszerekkel. E módszerek közé tartozik nem korlátozó módon Kohler és Milstein hibridóma technikája, a humán B-sejt hibridóma módszer és az EBV hibridóma módszer. A monoklonális antitestek bármely immunglobulin osztályba tartozhatnak, többek között IgG, IgE, IgM, IgA és IgD, hordozhatnak akár kappa vagy



lambda könnyű láncot.

Mivel a nem-humán antitestek emberben immunogének, a nem-humán antitestekkel szemben előnyben részesítjük a kiméra antitesteket humán páciensek terápiás kezelésekor. Kiméra antitestek előállításának és alkalmazásának módszerei a szakirodalomban ismertek, ezeket leírja például az 5,807,715; 4,816,397; 4,816,567; 5,530,101; 5,585,089; 5,693,761; 5,693,762; 6,180,370 és 5,824,307 számú USA-beli szabadalmi leírás, amelyeket referenciaként építünk be.

Teljes egészében humán antitestek különösen kívánatosak humán páciensek terápiás kezelésekor, mivel kevésbé immunogének, mint a nem-humán antitestek vagy kiméra antitestek. Ilyen antitesteket előállíthatunk transzgénikus egerek alkalmazásával, amelyek lényegében képtelenek endogén immunglobulin nehéz és könnyű lánc gének expresszáására, azonban képesek humán nehéz és könnyű lánc gének expresszáására. A transzgénikus egereket a választott antigénnel, például egy CRF₂R egészével vagy egy szakaszával a szokásos módon immunizáljuk. Antigén ellen irányított monoklonális antitesteket hagyományos hibridóma módszerekkel nyerhetünk az immunizált transzgénikus egerekből. Ezt a módszert részletesen leírja az 5,874,299; 5,877,397; 5,569,825; 5,661,016; 5,770,429 és 6,075,181 számú USA-beli szabadalmi leírás, amelyeket referenciaként építünk be. A humán immunglobulinok hibridóma sejtek tenyészetéből történő közvetlen kinyerésének alternatívájaként a hibridóma sejteket használhatjuk újra-rendeződött nehéz lánc és könnyű lánc lokuszok forrásaként további expresszió vagy genetikai manipuláció céljára. A gének



izolálása az ilyen antitest-termelő sejtekből egyszerű, mivel a megfelelő mRNS-ek nagy mennyiségben hozzáférhetőek. A visszanyert újrarendeződött lokuszokat a kívánt módon módosíthatjuk. Például a konstans régiót eltávolíthatjuk vagy kicserélhetjük egy másik izotípusával, vagy a változékony régiókat összekapcsolhatjuk egyláncú Fv régiók kódolása céljából. Ilyen módszereket ír le a WO 96/33735 és a WO 96/34096 számú nemzetközi közzétételi irat, amelyeket referenciaként építünk be.

A teszt vegyületek kiválasztása

A találmány szerinti vizsgálatokkal szűrhető vegyületek közé tartoznak nem korlátozó módon ismert vegyületek könyvtárai, beleértve természetes anyagokat, mint például növényi vagy állati kivonatok, szintetikus vegyszereket, biológiailag aktív anyagokat, többek között fehérjéket, peptideket, mint például oldható peptideket, beleértve nem korlátozó módon random peptid könyvtárakat és D- vagy L-konfigurációjú aminosavakat, foszfopeptideket (beleértve nem korlátozó módon random vagy részlegesen degenerált foszfopeptid könyvtárak tagjait), antitesteket [beleértve nem korlátozó módon a poliklonális, monoklonális, kiméra, humán, anti-idiotípusos vagy egyláncú antitesteket, Fab, F(ab')₂ vagy Fab expressziós könyvtár fragmenteket, és azok epitop kötő szakaszait], szerves vagy szervetlen molekulákat.

A teszt vegyületek hagyományos forrásain túl a számítógépes modellezés és kutatótechnológiák lehetővé teszik teszt vegyületek átgondolt szelekcióját a CRFR ligandum kötő helyéről vagy már azonosított CRFR agonistákról szerzett szerkezeti információ alkalmazásával. A teszt vegyületek e racionális szelekciója



csökkentheti a terápiás vegyület-jelöltek azonosítása céljából vizsgálendő teszt vegyületek számát. A CRFR receptorok GPCR receptorok, és így a CRFR fehérje szekvencia ismerete lehetővé teszi kötőhelyének modellezését, amelyet potenciális ligandumok szűrésére használhatunk. Ezt a folyamatot a szakirodalomból ismert többféle módon végrehajthatjuk. Röviden, a leghatékonyabb megközelítés során a CRFR szekvenciát egy templáthoz (amely a bakterio-rodopszin vagy rodopszin kristály szerkezetből vagy más GPCR modellből származik) illesztjük, átalakítjuk az aminosav szerkezeteket és finomítjuk a modellt molekuláris mechanizmusok és vizuális vizsgálat révén. Amennyiben szoros szekvencia illesztés nem elérhető, létrehozhatunk egy modellt a hidrofób hélixek modelljének felépítésével. Ezután összeillesztjük a hélixeket oly módon, hogy egymáshoz képest forgatjuk és elfordítjuk azokat az ismert rodopszin szerkezet általános felépítéséből kiindulva. Maradék-maradék érintkezésekre utaló mutációs adatokat hasonlóképpen felhasználhatunk a hélixek egymáshoz viszonyított helyzetének meghatározására úgy, hogy ezek az érintkezések létrejöjjenek. A folyamat során az ismert ligandumokat kapcsolhatjuk a hélixek kötőhely-üregébe, s a hélixek pozicionálását segíthetjük olyan kölcsönhatások kialakításával, amelyek stabilizálják a ligandum kötését. A modellt befejező lépésként finomíthatjuk molekuláris mechanika alkalmazásával és az intracelluláris és extracelluláris hurkok standard homológia modellező technikákkal történő felépítésével. A GPCR szerkezetéről és modellezésről általános információt közölnek Schoneberg és munkatársai [Molecular and Cellular Endocrinology 151, 181-93



(1999)], Flower [Biochimica et Biophysica Acta 1422, 207-34 (1999)] és Sexton [Current Opinion in Drug Discovery and Development 2(5), 440-8 (1999)].

Amikor egy modell elkészül, a többféle jelenlegi számítógépes program egyikével együtt alkalmazható a találmány szerinti szűrési módszerekkel vizsgálandó vegyületek számának leszűkítésére. E programok közül a legáltalánosabb a DOCK program (UCSF Molecular Design Institute, 533 Parnassus Ave, U-64, Box 0446, San Francisco, California 94143-0446). Ennek számos változata képes kereskedelmi forgalomban hozzáférhető és/vagy saját tulajdonú vegyületek adatbázisainak szűrésére a kötőhelyhez történő térbeli illesztés és megközelítő elektrosztatikus komplementaritás szempontjából. Gyakran előfordult, hogy a DOCK által kiválasztott molekulák nagyobb valószínűséggel voltak ligandumok. Egy másik használható program a FLEXX [Tripos Inc., 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144-2913 (www.tripos.com)]. Ez a program jelentősen lassúbb, és általában kisebb vegyület-adatbázisok szűrésére korlátozódik. A FLEXX kiértékelő rendszere részletesebb, és általában a DOCK-nál jobban megbecsüli egy vegyület kötőkéességét. A FLEXX igen alkalmas a DOCK által javasoltak megerősítésére vagy ismert ligandumokból vagy templátokból kombinatorikus úton létrehozott vegyületek könyvtárainak vizsgálatára.

Szűrővizsgálati módszerek vázizom-tömeg vagy -funkció szabályozására alkalmas vegyület-jelöltek azonosítására

Annak megállapítása, hogy a CRF₂R szerepet játszik a vázizom atrófia szabályozásában, számos módszert kínál egy vagy több

teszt vegyület szűrésére vegyület-jelöltek azonosítása céljából, amelyek a továbbiakban vázizom atrófia profilaktikus vagy terápiás kezelésére alkalmazhatóak. A találmány módszereket szolgáltat teszt vegyületek CRF_2R kötő, CRF_2R aktiváló, egy CRF_2R vagy a CRF_2R szignál transzdukciós reakcióút agonista-indukált aktiválását fenntartó vagy felerősítő, vagy a CRF_2R vagy CRF gének expresszióját fokozó képességének szűrésére.

Mivel a CRF_2R és CRF_1R homológ fehérjék, a CRF_2R agonisták bizonyos százaléka feltehetőleg CRF_1R agonistaként is működik. Mint fentebb említettük, a CRF_1R aktiválása indukálja a HPA tengely aktiválását és ezáltal kortikoszteroidok termelődését. A legtöbb esetben, amikor vázizom-tömeg vagy -funkció növekedése szükséges, a HPA tengely aktiválása nem kívánatos. Tehát teszt vegyületek CRF_2R aktiváló képességének szűrővizsgálatán túl a találmány módszert szolgáltat a CRF_2R és CRF_1R alkalmazására szelektív CRF_2R agonisták szűrése céljából. Amikor izomdisztrófiával nem kapcsolatos akut vagy krónikus izom atrófia kezelésére alkalmas vegyület-jelölteket szelektálunk, előnyös, ha a vegyület-jelölt CRF_2R -re szelektív. A vegyület-jelölt előnyösen 10-szeres szelektivitást mutat a CRF_2R -re, mint a CRF_1R -re (azaz 10-szer aktívabb CRF_2R esetén, mint CRF_1R esetén), még előnyösebben 100-szoros szelektivitást, legelőnyösebben 1000-szer nagyobb szelektivitást. Mivel több tanulmányban kimutatták a kortikoszteroid terápia jótékony hatását izomdisztrófiák kezelése során, kedvező lehet, ha izomdisztrófiák kezelése esetében egy CRF_2R agonista rendelkezik bizonyos mértékű CRF_1R agonizmussal. Tehát izomdisztrófiák kezelése számára előnyösebb egy alacsonyabb szelek-

tivitású vegyület, amely hasonló koncentráció tartományban aktíválja a CRF_2R -t és CRF_1R -t egyaránt. A vegyület-jelölt előnyösen 100-szoros szelektivitást mutat a CRF_2R -re a CRF_1R -rel szemben, még előnyösebben 10-szeres szelektivitást és legelőnyösebben nem CRF_2R szelektív a CRF_1R -rel szemben (azaz a vegyület-jelölt aktivitása lényegében megegyező CRF_2R és CRF_1R esetében). Ebben a helyzetben előnyösebb lehet, ha a vegyület teljes CRF_2R agonista, és részleges CRF_1R agonista. Egy ilyen vegyület-jelölt tehát beépített határt szab a kortizol termelés és az izom atrófia potenciál maximális mértékének, míg a CRF_2R által közvetített anti-atrófiás hatás növelhető lenne a mennyiség emelésével. A szakember könnyen képes annak meghatározására, hogy egy vegyület-jelölt a CRF_1R vagy CRF_2R teljes vagy részleges agonistája-e, a szakirodalomban ismert módszerek alkalmazásával.

A későbbiekben CRF_2R révén humán vázizom-tömeg vagy -funkció szabályozására alkalmazandó vegyületek szűrése céljából előnyös, ha a kezdeti in vitro szűrés végrehajtásakor a 10. számú szekvenciával legalább 80%-ban megegyező aminosav szekvenciájú CRF_2R -t alkalmazunk, még előnyösebben a 10. számú szekvenciával 90%-ban megegyezőt. A teszt vegyületeket előnyösen humán, egér vagy patkány CRF_2R ellen vizsgáljuk, még előnyösebben humán CRF_2R -ről van szó. A későbbiekben a CRF_2R révén nem-humán fajnál vázizom-tömeg vagy -funkció szabályozására alkalmazandó vegyületek szűrése céljából előnyös, ha a CRF_2R a kezelendő állatfajból származik.

Egy teszt vegyület vagy vegyület-jelölt CRF_1R irányában mutatott aktivitási szintjének, valamint a vegyület-jelölt CRF_2R és CRF_1R közötti szelektivitásának meghatározása céljából előnyös,

ha a kezdeti in vitro szűrés végrehajtásakor a 2. számú szekvenciával legalább 80%-ban megegyező aminosav szekvenciájú CRF₁R-t alkalmazunk, még előnyösebben a 2. számú szekvenciával 90%-ban megegyezőt. A teszt vegyületeket előnyösen humán, egér vagy patkány CRF₁R ellen vizsgáljuk, még előnyösebben humán CRF₁R-ről van szó. A későbbiekben a CRF₁R révén nem-humán fajnál vázizom-tömeg vagy -funkció szabályozására alkalmazandó vegyületek szűrése céljából előnyös, ha a CRF₁R a kezelendő állatfajból származik.

A találmány szerinti módszerek alkalmasak nagy teljesítményű alkalmazások céljára, mindazonáltal a "szűrővizsgálat" kifejezés csupán egy teszt vegyület vizsgálatát is magába foglalja. A "vegyület-jelöltek" jelentése a leírásban: CRF₂R-t kötő, CRF₂R-t aktiváló, CRF₂R vagy egy CRF₂R szignál transzdukciós reakcióút agonista-indukált aktiválását fenntartó illetve felerősítő, vagy CRF₂R illetve CRF gének expresszióját fokozó teszt vegyületek a találmány módszereivel meghatározva. Ilyen vegyület-jelöltek alkalmazhatóak vázizom-tömeg vagy -funkció szabályozására. Mindazonáltal, jellemzően az in vitro szűrővizsgálat első szintje módszert szolgáltat vegyületek egy szűkebb csoportja, azaz a vegyület-jelöltek kiválasztásához, amelyek a szűrővizsgálat magasabb szintjein kerülnek további tanulmányozásra. A szakember könnyen felismeri a találmány alkalmazhatóságát arra a célra, hogy egy vagy több teszt vegyület egy csoportjából azonosítsa a vegyületek azon alcsoportját, amelyek további vizsgálatra érdekesek. A szakember hasonlóképpen felismeri, hogy a találmány szerinti vizsgálatok alkalmasak egy adott vegyület-jelölt feltételezhető hasznosíthatóságának besorolására más vegyület-



jelöltekhez képest. Például egy, a CRF₂R-t 1000 nM koncentrációban aktiváló (10 nM koncentrációban nem aktiváló) vegyület-jelölt kevésbé jelentős, mint a CRF₂R-t 10 nM koncentrációban aktiváló. Ilyen információ alkalmazásával a szakember kiválaszthatja a szűrővizsgálatok első szintjének alkalmazásával vegyület-jelöltek egy alcsoportját további vizsgálatok céljára. Példaképpen megemlítjük, hogy a CRF₂R-t 200 nM koncentráció alatt aktiváló vegyületek tovább vizsgálhatóak egy vázizom atrófiás állat modellben, míg a küszöb fölöttiek nem kerülnének további vizsgálatra. A szakember azt is felismeri, hogy a teszt vegyületek csoportjának kiválasztási módjától, valamint a pozitívak meghatározásának módjától függően a teszt vegyületek csak egy bizonyos hányada kerül vegyület-jelöltként azonosításra, és ez a hányad lehet igen csekély.

Az alábbiakban leírt vizsgálati rendszerek formulázhatóak CRF₂R-t vagy CRF₂R-t expresszáló sejteket tartalmazó készletekké, amelyek különbözőképpen csomagolhatóak, például fiolákba, csövekbe, mikrotitráló lemezekre, üvegekbe stb. Különálló tartályokban más reagenseket is magába foglalhat a készlet, például pozitív kontroll mintákat, negatív kontroll mintákat, puffereket és sejttenyésztő tápközeget.

A találmány egy megvalósítási módja egy vagy több teszt vegyület szűrésére alkalmas módszert szolgáltat a CRF₂R-t kötő vegyület-jelöltek azonosítására. Egy vegyület adott receptorhoz való kötését meghatározó módszerek a szakirodalomban jól ismertek. A vizsgálat jellemzően magába foglalja a CRF₂R forrás egy ismert receptor-kötő jelölt vegyülettel történő inkubálásának

lépését, egy teszt vegyület jelenlétében vagy hiányában, majd a kötött jelölt vegyület mennyiségének meghatározását. A CRF₂R forrás lehet CRF₂R-t expresszáló sejtek vagy izolált CRF₂R valamilyen formája, mint az a leírásban olvasható. A jelölt vegyület lehet CRF vagy bármely CRF analóg, előnyösen kvantitatíven meghatározható jelöléssel (például ¹²⁵I-jelölt, európiummal jelölt, fluoreszceinnel jelölt, GFP jelölt, ³⁵S-metionin jelölt). A jelölés e módszerei a szakirodalomban jól ismertek. A CRFR-t kötő teszt vegyületek a receptorhoz kötődő jelölt ligandum mennyiségének csökkenését idézik elő, ezáltal csökken a jel szintje a kontroll mintákhoz (teszt vegyület nélküli) viszonyítva. Leírták a módszer változatait, amelyben G-fehérje szétkapcsoló szerek jelenlétében és hiányában kapott receptor kötés révén különbséget tehetünk az agonisták és antagonisták között (például kötés egy guanin nukleotid analóg, GpppNHp jelenlétében és hiányában) [Keen, "Radioligand Binding Methods for Membrane Preparations and Intact Cells" in Challis, "Receptor Signal Transduction Protocols", Humana Press Inc., Totoway N.J. (1997)].

Mivel szükséges, hogy meg tudjuk különböztetni a specifikusan CRF₂R-hez kötő vegyületeket, a fentiekben leírt vizsgálatot csak CRF₂R-t expresszáló sejt vagy sejtmembrán alkalmazásával végezzük, vagy rekombináns CRF₂R forrás alkalmazásával. A CRFR mindkét formáját expresszáló sejteket módosíthatjuk homológ rekombinációval a CRF₁R gén inaktiválása céljából vagy működésképtelenné tehetjük azt más módszerekkel. Alternatív módon, amennyiben a CRFR forrás több, mint egyfajta CRFR-t tartalmaz, a nem kívánt receptor által keltett háttér-jelet ki kell vonni a vizs-

gálatban kapott jelből. A háttér jelet számos módszerrel meghatározhatjuk, többek között a nem kívánt CRFR jel antiszensz antitestek vagy szelektív antagonisták segítségével történő kiiktatásával. A CRFR-ek ismert antagonistái közé tartozik az antalarmin (CRF_1R szelektív), az anti-sauvagine-30 (CRF_2R szelektív) és az astressin (nem $\text{CRF}_1\text{R}/\text{CRF}_2\text{R}$ szelektív).

A találmány egy megvalósítási módja teszt vegyületek szűrésére alkalmas eljárást szolgáltat a CRF_2R -t és/vagy CRF_1R -t aktiváló vegyület-jelöltek azonosítására. A vizsgálatok jellemzően sejt-alapúak; mindazonáltal sejtmentes vizsgálatok is ismertek, amelyek képesek különbséget tenni az agonista és antagonisták kötés között a fent leírtak szerint. A sejt-alapú vizsgálatok során a CRF_1R -t vagy CRF_2R -t expresszáló sejteket érintkeztetjük egy teszt vegyülettel vagy kontrollal, és megmérjük a CRFR aktivációt a CRFR szignál transzdukciós reakcióút komponensek expressziójának vagy aktivitásának mérése révén.

Amint azt a fentiekben leírtuk, a CRF receptorok feltehetőleg számos különböző reakcióúton keresztül kapcsolódnak, többek között $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha q}$ vagy $G_{\alpha i}$, sejtípustól függően. Feltételezhető, hogy a CRF receptorok agonista aktiválása lehetővé teszi, hogy a receptor jelátadása ezen reakcióutak bármelyikén keresztül történjen, feltéve, hogy a szükséges reakcióút komponensek jelen vannak az adott sejtípusban. Így a CRFR aktiválás szűrése során a vizsgálat bármely szignál transzdukciós reakcióutat alkalmazhatja mutatónak, még ha a kezelni kívánt sejtípus *in vivo* más reakcióúton köti a CRFR-t. A szakember felismeri, hogy egy szűrővizsgálat hatékonyan azonosíthat alkalmas CRFR agonistákat füg-



getlenül a receptor aktiválás mérésére szolgáló reakcióúttól. A szignalizációs reakcióutak aktiválásának mérésére szolgáló vizsgálatok a szakirodalomban ismertek.

Például a teszt vegyülettel történő érintkezést követően sejtlizátumot készíthetünk és végezhetünk cAMP indukciós vizsgálatot. A cAMP a $G_{\alpha s}$ aktiváció hatásaként indukálódik. Mivel a $G_{\alpha s}$ -t a CRFR-en kívül más receptorok is aktiválják, és mivel a teszt vegyület a hatását kifejezheti a CRFR-en keresztül vagy más úton is, két kontroll összehasonlítás szükséges annak meghatározásához, hogy egy teszt vegyület egy CRFR aktiválásán keresztül emeli-e a cAMP szintet. Az egyik kontroll összehasonlítja a teszt vegyülettel érintkeztetett sejtek cAMP szintjét és egy kontroll vegyülettel (azaz a hordozóval, amelyben a teszt vegyületet feloldjuk) érintkeztetett sejtek cAMP szintjét. Amennyiben a teszt vegyület növeli a cAMP szintet a kontroll vegyülethez képest, ez arra utal, hogy a teszt vegyület emeli a cAMP szintet valamilyen módon. A másik kontroll összehasonlítja egy CRFR expresszálo sejtvonal és egy lényegében ugyanolyan, azonban CRFR-t nem expresszálo sejtvonal cAMP szintjét, miután mindkét sejtvonalat kezeljük a teszt vegyülettel. Amennyiben a teszt vegyület növeli a cAMP szintet a CRFR expresszálo sejtvonalban a CRFR-t nem expresszálo sejtvonalhoz képest, ez arra utal, hogy a teszt vegyület a cAMP szintet a CRFR receptorok aktiválása révén emeli.

A találmány egy sajátos megvalósítási módja szerint a cAMP indukciót a CRFR expresszálo sejtekbe bevezethető számos riporter gén bármelyikéhez kapcsolt cAMP érzékeny elemet tartalmazó DNS szerkezetek alkalmazásával mérjük. Ilyen riporter gének közé



tartozik nem korlátozó módon a kloramfenikol-acetiltranszferáz (CAT), a luciferáz, a glukuronid-szintetáz, a növekedési hormon, a fluoreszcens fehérjék (például zöld fluoreszcens fehérje) vagy az alkalikus-foszfátáz. A sejtek teszt vegyülettel történő érintkeztetését követően a riporter gén expressziójának szintjét megmérhetjük annak meghatározására, hogy a teszt vegyület képes-e a cAMP szint növelésére és ezáltal meghatározhatjuk egy teszt vegyület CRFR aktiváló képességét.

A vizsgálat során alkalmazható sejtek ugyanazok, mint a fentiekben leírt CRFR kötő vizsgálat esetében, azzal a különbséggel, hogy az aktivációs vizsgálatban alkalmazott sejtek előnyösen expresszálnak egy működőképes receptort, amely a CRF-re vagy egy vagy több CRF analógra statisztikailag szignifikáns választ ad. A teljes hosszúságú CRFR-eket expresszáló sejteken túl létrehozhatunk olyan sejteket, amelyek által expresszált CRFR-k ligandum kötő doménje riporter elemekhez kötött vagy azokat fizikai módosítás révén tartalmazza. Például egy vad típusú CRFR-t vagy CRFR fragmentumot fuzionálhatunk G-fehérjéhez, amelynek eredményeképpen a fúziós fehérje CRFR részének agonista kötése esetén a fuzionált G-fehérje aktiválódik [Siefert et al., Trends Pharmacol. Sci. 20, 383-9 (1999)]. A sejtek előnyösen szintén rendelkeznek néhány jellegzetességgel a CRF vagy a CRF analóg induktív válaszának maximalizálása céljából, például egy CRE riporter gén erős indukciójának detektálásához előnyös: a) alacsony természetes cAMP szint; b) CRFR receptorokkal kölcsönhatásra képes G- fehérjék; c) magas adenilil-cikláz szint; d) magas protein kináz-A szint; e) alacsony foszfodiesteráz szint;



és f) magas cAMP érzékeny elem-kötő fehérje szint. A CRF vagy CRF analógra adott válasz erősségének fokozásához a gazdasejteket módosíthatjuk előnyös faktorok nagyobb mennyiségének expresszáására vagy a kedvezőtlen faktorok kisebb mennyiségének expresszáására. Ezen túlmenően a CRE riporter indukciójának alternatív reakcióútjai kiküszöbölhetőek a háttér csökkentésére.

Néhány esetben a G-fehérje kapcsolt receptor válasz alábbhagy vagy deszenzitizálódik egy agonista hosszantartó jelenléte során. A találmány egy másik megvalósítási módja módszert szolgáltat olyan vegyületek azonosítására, amelyek fenntartják vagy felerősítik egy CRF_2R vagy a CRF_2R szignál transzdukciós reakcióút agonista-indukált aktiválását, válaszképpen egy CRF_2R agonistára. Ilyen vegyületek alkalmazhatóak például egy CRF_2R agonistával együtt vázizom atrófia kezelésére. Az eljárás jellemzően egy sejt-alapú vizsgálatot alkalmaz, amely során bármely sorrendben: (i) a sejteket érintkezésbe hozzuk egy teszt vegyülettel; (ii) a működőképes CRF_2R -t expresszáló sejteket egy CRF_2R agonistával kezeljük olyan agonista koncentrációban és az agonista-receptor expozíció olyan időtartamában, amely elegendő a CRF_2R deszenzitizáláshoz; majd (iii) meghatározzuk a CRF_2R aktiválás szintjét. A szakember felismeri, hogy számos folyamat hozzájárul a receptor deszenzitizálódáshoz, amelyek közül nem korlátozó módon megemlíthető a receptor foszforiláció, a receptor internalizáció vagy lebomlás és a CRF_2R szignál transzdukciós reakcióút alulszabályozása. A szakember képes meghatározni a sejtek teszt vegyülettel történő érintkeztetésének megfelelő idejét (azaz az agonista kezelés előtt, alatt vagy után), a célzott



deszenzitizálási mechanizmustól függően. Például ha a sejteket az agonista kezelést követően érintkeztetjük teszt vegyületekkel, detektálhatóak a receptor foszforilációja következtében létrejött receptor deszenzitizációt gátló teszt vegyületek.

A találmány egy másik megvalósítási módja módszert szolgáltat egy vagy több teszt vegyület szűrésére a CRF_2R gén transzkripcióját vagy CRF_2R expressziót szabályozó vegyület-jelöltek azonosítása céljából. A $CRFR$ gének transzkripció aktivitását szabályozó vegyület-jelölteket azonosíthatunk egy CRF_2R szabályozó régióhoz működőképesen kapcsolt riporter gén alkalmazásával (riporter gén szerkezet). Ilyen módszerek a szakirodalomban jól ismertek. Egy ilyen módszer során a riporter gén szerkezetet érintkeztetjük egy teszt vegyülettel sejtfaktor forrás jelenlétében és meghatározzuk a riporter gén expresszió szintjét. Az expresszió szintjében a kontroll mintához képest növekedést előidéző teszt vegyület következtetni enged arra, hogy a CRF_2R gén transzkripcióját fokozó vegyület-jelöltről van szó. Az in vitro vagy in vivo transzkripcióhoz szükséges sejtfaktorok biztosításához megfelelő sejtek vagy sejt kivonatok bármely, CRF_2R -t alapállapotban expresszáló sejttípusból készülnek.

A CRF_2R expressziót szabályozó vegyület-jelöltek azonosíthatóak egy olyan módszerrel, ahol egy sejtet érintkeztetünk egy teszt vegyülettel és meghatározzuk a $CRFR$ expressziót. Összehasonlítjuk a teszt vegyület jelenlétében és hiányában tapasztalt CRF_2R expresszió szintjét. A CRF_2R expresszió szintjét fokozó teszt vegyületeket izomtömeg vagy izomfunkció növelésére alkalmas vegyület-jelöltként azonosítjuk. A módszer olyan vegyület-



jelölteket detektál, amelyek fokozzák a CRF₂R transzkripcióját vagy transzlációját, vagy növelik az mRNS vagy a CRF₂R fehérje stabilitását.

A találmány egy további megvalósítási módja módszert szolgáltat egy vagy több teszt vegyület szűrésére a CRF vagy egy CRF analóg expresszióját szabályozó vegyület-jelöltek azonosítása céljából. A vizsgálatokat lényegében a fentiekben leírt, CRFR expressziót szabályozó vegyület-jelöltek azonosítására szolgáló vizsgálatokkal azonos módon végezzük, a következő módosításokkal. A CRF gén vagy egy CRF analóg gén transzkripcióját szabályozó vegyület-jelöltek azonosítása céljából a riporter gént működőképesen kapcsoljuk a kívánt CRF gén vagy CRF analóg gén szabályozó régiójához, valamint fontos, hogy a sejt faktorok forrása a kívánt gént expresszáló sejttípus legyen.

Vegyület-jelöltek szűrése vázizom atrófiás modellek alkalmazásával

Egy vagy több teszt vegyület közül in vitro vizsgálattal kiválasztott vegyület-jelöltek tovább tesztelhetők vázizom-tömeg vagy -funkció szabályozó képességük alapján vázizom atrófiás és/vagy hipertrófiás modell rendszerekben. Vázizom atrófiás vagy hipertrófiás modellek közé tartoznak in vitro sejttenyészet modellek és in vivo vázizom atrófiás állati modellek egyaránt. A szűrővizsgálatok e kiegészítő szintjei alkalmasak a vegyület-jelöltek csoportjának leszűkítésére azokra, amelyek további vizsgálatra, például klinikai kísérletekre érdemesek.

Izom atrófia sejttenyészet modelljei

A szakirodalomban ismertek a vázizom atrófia in vitro modell-



jei. Ilyen modellt ír le például Vandeburgh [In Vitro 24, 609-19 (1988)], Vandeburgh és munkatársai [J. of Biomechanics 24 Suppl 1, 91-99 (1991)], Vandeburgh és munkatársai [In Vitro Cell Dev. Biol. 24(3), 166-74 (1988)], Chromiak és munkatársai [In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. 34(9), 694-703 (1998)], Shansky és munkatársai [In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. 33(9), 659-61 (1997)], Perrone és munkatársai [J. Biol. Chem. 270(5), 2099-106 (1995)], Chromiac és Vandeburgh [J. Cell Physiol. 159(3), 407-14 (1994)], Vandeburgh és Karlisch [In Vitro Cell Dev. Biol. 25(7), 607-16 (1989)]. E modellek hasznosak, de nem nélkülözhetetlenek a fentiekben leírt in vitro szűrést követően, a vegyület-jelöltek csoportjának további szűkítéséhez azokra, amelyeket érdemes állati modellben vizsgálni. Sejtenyészet modelleket vegyület-jelöltekkel kezelünk, és vizsgáljuk a modell válaszát a kezelésre oly módon, hogy izom markerek változásait követjük: például az izomfehérje szintézist vagy bomlást, a vázizom tömeg vagy a kontraktilis funkció változását. Az izom markerekben szignifikáns változásokat okozó vegyületeket jellemzően egy vázizom atrofias állati modellen vizsgáljuk tovább.

Vázizom atrofias állati modelljei

Vegyület-jelölteket adunk be nem-humán állatoknak és megfigyeljük a válaszreakciót, például megállapítjuk az atrofias vagy hipertrófias markerek, a vázizom-tömeg, vázizom-funkció, izom vagy izomrost keresztmetszet terület, kontraktilis fehérje tartalom vagy nem-kontraktilis fehérje tartalom változásait, vagy a vázizom-tömeg vagy -funkció változásaival korreláló biokémiai vagy genetikai markerek változásait. A vázizom hipertrófiát in-

dukáló vagy vázizom atrófia bármely formáját gátló vegyület-jelöltek humán vázizom atrófia kezelésére szolgáló feltételezett terápiás vegyület-jelöltnek tekintendők, és a leírásban terápiás vegyületek-jelöltként említjük ezeket. Egy vegyület-jelölt vázizom atrófiát szabályozó képességén túlmenően a nemkívánatos mellékhatások, mint például toxicitás hasonlóképpen kimutathatóak egy ilyen szűrővizsgálat során. Elfogadhatatlanul magas szintű mellékhatások hiánya további szempont lehet a terápiás vegyület-jelöltek kiválasztása során.

A vázizom atrófia számos állati modellje ismert a szakirodalomban [Herbison et al., Arch. Phys. Med. Rehabil. 60, 401-4 (1979); Appell, Sports Medicine 10, 42-58 (1990); Hasselgren et Fischer, World J. Surg. 22, 203-8 (1998); Agbenyega et Wareham, Comp. Biochem. Physiol. 102A, 141-5 (1992); Thomason et Booth, J. Appl. Physiol. 68, 1-12 (1990); Fitts et al., J. Appl. Physiol. 60, 1946-53 (1986); Bramanti et al., Int. J. Anat. Embryol. 103, 45-64 (1998); Cartee, J. Gerontol. A Biol. Med. Sci. 50, 137-41 (1995); Cork et al., Prog. Clin. Biol. Res. 229, 241-69 (1987); Booth et Gollnick, Med. Sci. Sports Exerc. 15, 415-20 (1983); Bloomfield, Med. Sci. Sports Exerc. 29, 197-206 (1997)]. A modellek számára előnyös állatfaj az egér és a patkány. Ilyen modellek közé tartoznak például az igénybevétel hiánya miatt kialakuló atrófia modelljei, mint például a végtagok begipszelése vagy mozgásképtelenné tétele más módon, a hátsó végtag felfüggesztése, az állat teljes mozgásképtelenné tétele és csökkentett gravitációs állapotok. Az idegkárosodás által kiváltott atrófiás modellek közé tartozik például az ideg összezú-

zása, meghatározott izmokat beidegző idegek szakaszainak eltávolítása, idegek kezelése toxinnal és idegek fertőzése virális, bakteriális vagy eukarióta fertőző ágensekkel. A glukokortikoid által kiváltott atrófiás modellek közé tartozik exogén glukokortikoid atrófiát indukáló mennyiségének alkalmazása állatoknál, és az endogén kortikoszteroid termelés serkentése például a hipotalamusz - hipofízis - mellékvese (HPA) tengelyt aktiváló hormonok alkalmazásával. A vérmérgezés által indukált atrófiás modellek közé tartozik például a beoltás vérmérgezés-indukáló szervezetekkel, mint például baktériumokkal, az állat kezelése immun-aktiváló vegyületekkel, mint például bakteriális sejtfal-kivonat vagy endotoxin, vagy a bélfal perforációja. A cachexia által indukált atrófiás modellek közé tartozik például egy állat beoltása cachexia-képző potenciállal rendelkező daganatkeltő sejtekkel, egy állat megfertőzése cachexiát okozó fertőző ágensekkel (mint például AIDS-t okozó vírusok), és az állat kezelése cachexiát indukáló hormonokkal vagy citokinekkel, mint például CNTF, TNF, IL-6, IL-1 stb. Szívbénulás által indukált atrófiás modellek közé tartozik az állat kezelése oly módon, hogy vázizom atrófiával együttjáró szívbénulás következzen be. A neurodegeneratív megbetegedés által indukált atrófiás modellek közé tartoznak az autoimmun állati modellek, mint például egy állat immunizálása idegrendszeri komponensekkel. Az izomdisztrófia által indukált atrófiás modellek közé tartoznak az izomdisztrófia természetes és ember által genetikai úton létrehozott modelljei, mint például a disztrofin gén mutációja, amely az Mdx egérben fordul elő.

A vázizom hipertrófia állati modelljei közé tartoznak például az átellenes végtag inaktiválása következtében megnövekedett végtag izomzat modelljei, igénybevétel hiány miatti atrófiát követő súlygyarapodás, átmeneti idegkárosodás miatt atrófiás izom újrahasználat, bizonyos izmok megnövekedett használata egy szinergista izom inaktiválása következtében (például kompenzációs hipertrófia), megnövekedett izomhasználat az izomra helyezett teher miatt, és a glukokortikoid megszűnése által létrejött hipertrófia glukokortikoid-indukált atrófiát követően. Előnyös állati atrófiás modellek közé tartozik az alábbiakban részletesen bemutatott ülőideg denervációs atrófia modell, glukokortikoid által kiváltott atrófiás modell és a láb-begipszelés okozta igénybevételi hiány atrófiás modell.

Az ülőideg denervációs atrófia modellben az állat érzéstelenítését követően a jobb vagy a bal ülőideg egy rövid szakaszát sebészetiileg eltávolítjuk, azaz egerekben az ülőideget körülbelül a comb közepén izoláljuk és egy 3-5 mm hosszú szakaszt eltávolítunk. Ez denerválja a hátsó végtag alsó felének izomzatát, amely az izmok atrófiáját eredményezi. A comb kétfejű izmának (biceps) beidegzését jellemzően érintetlenül hagyjuk, hogy a térd kielégítő mozgását biztosítsuk a gyakorlatilag normális járáshoz. A kezeletlen állatoknál a denervált izmok tömege jellemzően 30-50%-kal csökken a denerválást követő tizedik napra. A denerváció után a teszt vegyületeket például injekcióval vagy folyamatos infúzióval, például egy ozmotikus minipumpa beültetésével (például Alzet, Palo Alto, CA) juttatjuk be, hogy meghatározzuk a denerváció által kiváltott vázizom atrófiára gyakorolt



hatásukat. A denervációt követően különböző időpontokban előljük az állatokat, majd gyorsan kivágjuk mind a denervált, mind az intakt lábak hátsó végtagjának izmait, megtisztítjuk az inaktól és kötőszövettől, majd lemérjük. Elemezzük az érintett izmok atrófiájának mértékét az izomtömeg, az izom keresztmetszet terület, az izomrost keresztmetszet terület vagy a kontraktilis fehérje tartalom mérése segítségével.

A glukokortikoid által kiváltott atrófiás modellben a teszt állatnak glukokortikoidot adunk, például 1,2 mg/kg/nap dexamethasone-t az ivóvízben. A kezeletlen állatoknál a vázizomtömeg jellemzően 30-50%-kal csökken a dexamethasone kezelés tizedik napjára. A glukokortikoid beadásával egyidejűleg vagy azt követően teszt vegyületeket adunk be, például injekcióval vagy folyamatos infúzióval acélból, hogy meghatározzuk a glukokortikoid által kiváltott vázizom atrófiára gyakorolt hatásukat. A glukokortikoid adagolásának különböző időpontjaiban elemezzük az érintett izmok atrófiájának mértékét a denervációs modell esetében fent leírt módon.

A láb-begipszelés okozta igénybevételi hiány atrófiás modell során az állat egyik hátsó lábát begipszeljük a térdtől a lábfej végéig. A gipszelést követő tizedik napon az izomtömeg jellemzően 20-40%-kal csökken. A gipszelést követően teszt vegyületeket adunk be injekcióval vagy folyamatos infúzióval, egy ozmotikus minipumpa beültetésével (például Alzet, Palo Alto, CA), hogy meghatározzuk a begipszelés által kiváltott vázizom atrófiára gyakorolt hatásukat. A begipszelést követően különböző időpontokban elemezzük az érintett izmok atrófiájának mértékét a



denervációs modell esetében fent leírt módon.

A szakember felismeri, hogy a humán használatra szánt vegyületek szűrése során, mivel a humán CRF₂R és a más állatfajból származó CRF₂R egymástól különböző, hamis pozitív vagy negatív eredmények születhetnek, amennyiben a szűrés nem-humán CRF₂R alkalmazásával történik. Tehát előnyös a kezdeti in vitro szűrést humán CRF₂R alkalmazásával végezni. Bizonyos körülmények között az azonosított vegyület-jelöltek csak a humán receptor irányában mutatnak aktivitást, nem-humán receptor irányában pedig nem. Ilyen körülmények között kívánatos lehet a vegyület-jelöltek vázizom-tömeg vagy -funkció szabályozó képességét egy második szintű szűréssel meghatározni. Mivel e vegyület-jelöltek nem aktiválják a nem-humán CRF₂R-t, nem-humán állattal végzett standard in vivo szűrés nem ajánlatos. Ebben az esetben a vegyület-jelöltek második szintű szűrése végrehajtható humán CRFR-eket expresszáló transzgénikus állatok alkalmazásával.

Bármely állatfaj, különösen emlős, többek között nem korlátozó módon megemlítve egér, patkány, nyúl, tengerimalac, sertés, kecske, kutya és nem-humán főemlős alkalmazható CRFR transzgénikus állatok létrehozása céljából. Előnyösen egeret és patkányt alkalmazunk, legelőnyösebben egeret. A szakirodalomban számos technika ismert és alkalmazható humán CRFR transzgének állatokba történő bevitelére, transzgénikus állatok alapító vonalának létrehozására. Ilyen módszer többek között nem korlátozó módon a pronukleáris mikroinjekció, retrovírus-mediált géntranszfer csíravonalakba, gén targeting embrionális őssejtekbe, embrió elektroporáció és spermium-mediált géntranszfer.



Vázizom atrófia kezelésére szolgáló génterápiás eljárások

A CRF₂R általános aktivitása fokozható egy CRF₂R gén overexpressziójával (a CRF₂R expresszió növelésére) vagy egy konstitutívan aktív CRF₂R segítségével a megfelelő szövetben. A CRF szint in vivo hasonlóképpen egy CRF gén overexpressziójával növelhető. E gének overexpressziója megnöveli a teljes sejt CRF₂R aktivitását, és így szabályozza a vázizom atrófiát. A kívánt gént vagy géneket az alanyban történő expresszióra megfelelő vektorba inszertáljuk. Ilyen vektorok közül nem korlátozó módon megemlíthetjük az adenovírus, az adeno-asszociált vírus, a retrovírus és a herpesz vírus vektorokat, valamint a DNS-t sejtekbe bevivő más részecskéket (például liposzóma, arany részecskék stb.) vagy a kívánt gént tartalmazó DNS expressziós vektor humán szövetbe történő közvetlen injekciója révén.

Gyógyászati készítmények és alkalmazási módjuk

A leírásban szereplő szűrési módszerekkel azonosított vegyület-jelöltek vagy terápiás vegyület-jelöltek beadhatóak egyéneknek vázizom atrófia kezelésére vagy vázizom hipertrófia létrehozására. E célból, a találmány tárgyát képezik eljárások és készítmények vázizom atrófia szabályozására, ahol nem korlátozó módon megemlíthető a sebészeti beavatkozást követő igénybevételi hiány, ágynyugalom, csonttörés, denerváció/gerincvelő sérülés okozta idegkárosodás, autoimmun betegség, fertőző betegség, glukokortikoid alkalmazás nem összefüggő betegség okán, fertőzés vagy más okok miatt előforduló vérmérgezés, betegség vagy éhezés okozta tápanyaghiány, rák cachexia, idült gyulladás, AIDS cachexia, COPD, szívbénulás, sarcopenia és genetikai rendelle-



nességek, például izom disztrófiák és neurodegeneratív betegségek következtében kialakult vázizom atrófia. CRF₂R agonisták alkalmazhatóak vázizom atrófia megakadályozására. Nem szükséges, hogy egyébként hatékony vegyületek abszolút CRFR specificitást mutassanak. Megfontolható, hogy más érintett receptorok specifikus antagonistái beadhatók egyidejűleg egy hatékony, de nem specifikus agonistával. Alternatív módon, a specificitás hiánya kezelhető egyedül a dózis vagy az adagolási mód szabályozásával.

A találmány szerinti szűrési módszerekkel azonosított vegyület-jelöltek vagy terápiás vegyület-jelöltek beadhatóak együttesen egy CRF₂R vagy egy CRF₂R szignál transzdukciós reakcióút aktiválását fenntartó vagy fokozó vegyületekkel. Ezek lehetnek ismert vegyületek, például teofillin, vagy azonosíthatóak CRF₂R vagy CRF₂R szignál transzdukciós reakcióút aktiválást fenntartó vagy fokozó vegyületek szűrésére szolgáló, találmány szerinti módszerekkel.

Dózis meghatározás

CRFR agonista vegyületek biztonsága és terápiás hatékonysága meghatározható standard eljárásokkal, in vitro vagy in vivo módszerekkel. Előnyösek a magas terápiás indexű vegyületek, bár alkalmazhatóak alacsonyabb terápiás indexű vegyületek, amennyiben a mellékhatások szintje elfogadható. Az in vitro és in vivo toxikológiai és gyógyászati eljárások során nyert adatok alapján kialakítható az alkalmazható humán dózis tartomány. Az előnyös dózis abban a tartományban helyezkedik el, ahol a vegyület keringési koncentrációja terápiásan maximális és elfogadhatóan biztonságos. A vegyület keringési koncentrációja változhat az

adagolás módjától, a beadás után eltelt időtől, a beadás módjától stb. függően. E tartományon kívül eső dózisok hasonlóképpen alkalmazhatóak, feltéve, hogy a mellékhatások elfogadhatóak. A páciens életkora, testtömege stb. alkalmazható e kérdések meghatározására a hagyományos módon. Farmakogenetikai megközelítés alkalmazható a vegyület szelekció, a dózis és az adagolási mód optimalizálása során klinikai populációk számára.

Formulázás és alkalmazás

Vázizom atrófia szabályozására szolgáló találmány szerinti gyógyászati készítmények formulázhatóak hagyományos módszerekkel, gyógyászatilag elfogadható hordozók és kötőanyagok alkalmazásával. A találmány szerinti készítmények előnyösen dózis egység formájúak. Az "dózis egység forma" kifejezés jelentése egy találmány szerinti készítmény, amely egy CRF₂R agonista egy állat, előnyösen egy emlős, még előnyösebben egy humán alany számára egyszeri adagban történő beadásra a helyes orvosi gyakorlat szerint megfelelő mennyiségét tartalmazza. A gyógyászati készítmények formulázhatóak például intranazális, transzdermális, inhalációs, parenterális, kután, orális vagy rektális beadás céljára. Az orális beadás esetén a gyógyászati készítmény lehet tabletta vagy kapszula alakjában, amely tartalmaz egy gyógyászatilag aktív vegyületet és adalékanyagokat, amelyek közül nem korlátozó módon megemlíthetőek a kötőanyagok, töltőanyagok, kenőanyagok, dezintegránsok vagy nedvesítőszeresek. A tabletták rendelkezhetnek bevonattal. Az orális beadásra szolgáló folyékony készítmények közül nem korlátozó módon megemlíthetőek a szirupok, szuszpenziók vagy a beadás előtt folyékony vivőanyaggal

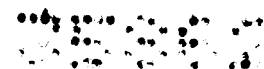
helyreállítandó száraz termékek, amelyek tartalmaznak egy gyógyászati lag aktív vegyületet és adalékanyagokat, amelyek közül nem korlátozó módon megemlíthetők a szuszpendáló ágensek, emulgeáló ágensek, nem-vizes vivőanyagok, tartósítószerék, pufferek, ízesítő, színezék, édesítőanyag stb. Az orális beadásra szolgáló gyógyászati készítmények formulázhatóak a gyógyászati lag aktív vegyületek szabályozott felszabadulására akár a szájban, a gyomorban vagy a bélrendszerben.

Belégzéses beadás céljára a találmány szerinti használatra szolgáló vegyületeket bejuttathatjuk a következő formákban: folyadék, por, gél, túlnyomásos vagy nem túlnyomásos hajtóanyagot alkalmazó aeroszol permet formájában, akár előre kimért vagy nem kimért dózisokban. A gyógyászati lag aktív vegyület formulázható megfelelő töltőanyagokkal, vivőanyagokkal, tartósítószerékekkel, pufferekkel stb. együtt. Parenterális beadás céljára a gyógyászati lag aktív vegyület formulázható elfogadható fiziológiai hordozókkal, tartósítószerékekkel stb. együtt, és előállítható szuszpenzió, oldat, emulzió, por stb. alakjában akár bolus injekció vagy infúzió számára. A vegyületek dózisa számos technológiával beadhatóak, többek között injekciós tűvel, nagynyomású készülékekkel stb. Rektális beadás céljára a gyógyászati lag aktív vegyület formulázható elfogadható fiziológiai hordozókkal, tartósítószerékekkel stb. együtt, végbélkúp, beöntés stb. alakjában. Kután beadás céljára a gyógyászati lag aktív vegyület formulázható elfogadható fiziológiai hordozókkal, többek között lágyítószerekkel stb. vagy beletehető egy tapasz típusú eszközbe. Hosszú távú beadás céljára a gyógyászati lag aktív vegyület és

megfelelő adalékanyagok, mint például nem korlátozó módon megemlítve polimerek, hidrofób anyagok, gyanták stb. formulázhatóak depó készítményként injekció vagy több ponton történő beültetés céljára, többek között nem korlátozó módon intramuszkuláris és szubkután lokációkra. Ezen túl, a gyógyászatilag aktív vegyület beadható egy diszpenziós eszköz segítségével.

A hatások megfigyelése klinikai vizsgálatok során

Vegyületek (például hatóanyagok) CRF₂R expresszióra vagy aktivitásra gyakorolt hatásának megfigyelése nemcsak alapvető hatóanyag szűrővizsgálatokban történhet, hanem klinikai vizsgálatok során is. Például egy szűrővizsgálattal meghatározott, CRF₂R receptor aktivitást vagy CRF₂R expressziót fokozó vegyület hatékonyságát megállapíthatjuk vázizom atrófiás vagy vázizom atrófia veszélyének kitett páciensek klinikai vizsgálata során. A teszt vegyület vagy placebo beadását követően különböző időpontokban meghatározzuk a vegyület páciensre gyakorolt hatását, megfigyelve például a vázizom-tömeg, vázizom-funkció, izom lebomlás biokémiai markerei vagy az életminőség értékmérőinek változásait. A szakirodalomban ismertek a humán vázizom-tömeg mérés módszerei, amelyek közé tartozik nem korlátozó módon egy végtag körméretének mérése, izomvastagság mérése például komputer tomográfiával, MRI-vel vagy ultrahanggal, vagy izom biopszia morfológiai és biokémiai paraméterek vizsgálatára (például rost keresztmetszeti terület, rost átmérő, enzim aktivitások). Továbbá, mivel a vázizom-tömeg arányos a vázizom-funkcióval, az izomfunkció alkalmazható a tömeg egy pótlólagos markereként, és az izomtömeg változások megállapíthatóak funkcionális mérésekkel, például izo-



erősség, szinergista izmok egy csoportjának ereje vagy elektromiográfiás felvételeken található összehúzóási jellegzetességek. Ezen túlmenően, az izom atrófia következtében kialakuló izomfehérje veszteség mérhető az alany vizeletében vagy vérében az aminosav vagy aminosav származékok, például 3-metilhisztidin szintjének meghatározásával. E módszerekről összefoglalót írt például Appell [Sports Med. 10, 42-58 (1990)]. Az életminőség értékmérője közé tartozik nem korlátozó módon egy székből történő felállás készsége, lépések száma elfáradásig vagy a lépcsőn közlekedés képessége.

Az ábrák leírása

1. ábra: A CRF_1R/CRF_2R agonista sauvagine (naponta kétszeri szubkután beadás) középső lábikra-izomra gyakorolt anti-atrófiás hatása az egér ülőideg denervációs sorvadás modell során.

2. ábra: A sauvagine (ozmotikus minipumpával végzett folyamatos beadás) elülső sípcsonti izomra gyakorolt anti-atrófiás hatása az egér ülőideg denervációs sorvadás modell során.

3A. és 3B. ábra: A sauvagine (ozmotikus minipumpával végzett folyamatos beadás) anti-atrófiás hatása az elülső sípcsonti izom (3A. ábra) és a középső lábikra-izom (3B. ábra) glukokortikoid-indukált sorvadására.

4A. ábra: A sauvagine (naponta kétszeri szubkután beadás) anti-atrófiás hatása az elülső sípcsonti izom gipszelés-indukált sorvadására, valamint hipertrófia-indukáló hatása a nem-gipszelt (normál) elülső sípcsonti izomra.

4B. ábra: A sauvagine (naponta kétszeri szubkután beadás) anti-atrófiás hatása a középső lábikra-izom gipszelés-indukált



sorvadására, valamint hipertrófia-indukáló hatása a nem-gipszelt (normál) középső lábikra-izomra.

5. ábra: A sauvagine és az urokortin (ozmotikus minipumpával végzett folyamatos beadás) elülső sípcsonti izomra gyakorolt anti-atrófiás és hipertrófia indukáló hatása az egér ülőideg denervációs sorvadás modell során.

6A. és 6B. ábra: Az urokortin (naponta kétszeri szubkután beadás) anti-atrófiás hatása az elülső sípcsonti izom (3A. ábra) és a középső lábikra-izom (3B. ábra) igénybevétel hiánya miatt bekövetkezett sorvadására.

7. ábra: A sauvagine (naponta kétszeri szubkután beadás) anti-atrófiás hatása a mellékvese-eltávolított patkány ülőideg denerváció-indukált sorvadás modell során, az elülső sípcsonti izom (7A. ábra), a hosszú ujjfesztő izom (extensor digitorum longus = EDL) (7B. ábra), a talpemelő izom (7C. ábra), a középső lábikra-izom (7D. ábra) és a talpizom denerváció-indukált sorvadására. Ezen túlmenően a sauvagine hipertrófiát idézett elő a nem-denervált EDL izomban (7B. ábra).

8. ábra: A sauvagine (ozmotikus minipumpával végzett folyamatos beadás) az egér ülőideg denervációs sorvadás modell során anti-atrófiás hatást gyakorolt vad típusú egerek elülső sípcsonti izmára, azonban ez CRF₂R knockout egerek esetében nem volt megfigyelhető.

9A. és 9B. ábra: Az egér láb-begipszelés okozta igénybevételi hiány atrófiás modell során a sauvagine anti-atrófiás hatással volt az EDL és a talp izmokra, izomtömeg (9A. ábra) vagy izomfunkció (9B. ábra) méréssel kimutatva.



PÉLDÁK

1. példa

Vektorok szerkesztése humán CRF₂R receptor expresszió számára

A humán CRF₂R (hCRF₂R) DNS szekvenciát (azonosító szám: E12752) lekérdezzük, és két oligonukleotidot szintetizálunk: az egyik magába foglalja a gén 5' végét az iniciációs kodontól kezdődően (5' oligonukleotid), a másik magába foglalja a gén 3' végét a stop kodonnal együtt (5' oligonukleotid). Ezen oligonukleotidokba a szerkesztés során olyan restriktációs endonukleáz helyek kerülnek, amelyek a hCRF₂R génben nem fordulnak elő: egy unikális hely az 5' oligonukleotidba, és egy ettől különböző unikális restriktációs endonukleáz hely a 3' oligonukleotidba. Ezen túl, a 3' oligonukleotid magába foglal egy poliadenilációs szignál szekvenciát. A humán vázizomból származó kettős szálú DNS beszerzési forrása a Universal QUICK-Clone cDNS collection (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA). A fenti 5' és 3' oligonukleotidok segítségével a humán vázizom cDNS-ből PCR segítségével amplifikáljuk a hCRF₂R cDNS-t az AdvanTaq PCR készlet (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA) alkalmazásával. A hCRF₂R gén PCR termékét agaróz gélelektroforézissel tisztítjuk meg a PCR műtermékektől, és a hCRF₂R gén DNS szakaszt az agaróz géltől megtisztítjuk egy tisztító készlet, mint például a NucleoTrap (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA) segítségével.

A hCRF₂R PCR termékét a pIRESneo vektorba (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA) klónozzuk oly módon, hogy először a hCRF₂R PCR terméket és a pIRESneo vektort a megfelelő restriktációs endonukleázzal hasítjuk oly módon, hogy az 5' és 3' restriktációs



endonukleáz helyek ligálásra alkalmasak legyenek. A pIRESneo vektor DNS-t a hCRF₂R PCR termék DNS-hez ligáljuk az AdvantAgeTM PCR Cloning Kit (Clonotech Inc., Palo Alto, CA, USA) DNS ligázának alkalmazásával, a gyártó előírásai szerint. A ligált vektor és inszert szerkezettel (pIRESneo/hCRF₂R) TOP10F' kompetens *E. coli* sejteket (Clonotech Inc., Palo Alto, CA, USA) transzformálunk. A transzformált sejteket LB/X-gal/IPTG plusz ampicillin tartalmú agarra szélesztjük. A fehér telepeket (pozitív klónok) kiválasztjuk és LB közegen tenyésztjük külön-külön. A plazmid DNS-t NucleoBond DNA Purification System (Clonotech Inc., Palo Alto, CA, USA) alkalmazásával izoláljuk. Legalább egy klón inszertjét megszekvenáljuk, hogy meggyőződjünk a hCRF₂R szekvencia helyességéről. Stabilan integrált Mercury CRE-LUC plazmidot tartalmazó HEK293 sejteket (Clonotech Inc., Palo Alto, CA, USA) transzfektálunk helyes szekvencia inszerttel rendelkező tisztított pIRESneo/hCRF₂R DNS-sel, a CalPhosTM Mammalian Transfection Kit (Clonotech Inc., Palo Alto, CA, USA) alkalmazásával. A pIRESneo/hCRF₂R DNS-sel stabilan transzfektált sejteket 10% borjú magzat szérumot (Clonotech Inc., Palo Alto, CA, USA), penicillin/streptomycin oldatot (Life Technologies, Rockville, MD), L-glutamint (Life Technologies, Rockville, MD) és nem-esszenciális aminosavakat (Life Technologies, Rockville, MD) tartalmazó DMEM közegben (Life Technologies, Rockville, MD) tenyésztjük 37°C-on, 5% széndioxid/95% levegő atmoszférában. A 2. és 3. példában leírtak szerint elvégzett CRF kezelést követően meghatározzuk a klónok CRF kötését és CRE-LUC aktiválódását. A hCRF₂R receptort megfelelő szinten expresszáló és a CRE-LUC ri-



porter rendszerhez megfelelően csatolt sejteket további elemzések céljára használtuk.

2. példa

Receptor kötési vizsgálatok

A vegyületek receptor kötésének elemzését egész sejteken végezzük, amelynek során az 1. példában kapott HEK293/CRE-LUC/pIRESneo/hCRF₂R sejteket 96-lyukú polilizin-bevonatos lemezre helyezzük. A sejteket 10% borjú magzat szérumot, penicillin/streptomycin oldatot, L-glutamint és nem-esszenciális aminosavakat tartalmazó DMEM közegben tenyésztjük 37°C-on, 5% széndioxid/95%levegő atmoszférában, és egy éjszakán át inkubáljuk. A tápközeget eltávolítjuk, majd megfelelő mennyiségű, európiummal kovalensen megjelölt CRF-et (Eu-CRF) adunk hozzá, 10% Seablockkal (Clonetech Inc., Palo Alto, CA, USA) kiegészített MEM közegben (Life Technologies, Rockville, MD). A sejteket 90 percen át szobahőmérsékleten inkubáljuk az Eu-CRF-fel, majd négyszer mossuk magnézium- és kalciummentes PBS oldattal (Life Technologies, Rockville, MD). Az utolsó mosást követően hozzáadjuk a jelerősítő oldatot (Wallac Inc., Gaithersburg, MD), és a lemezt Wallac leolvasón (Wallac Inc., Gaithersburg, MD) leolvassuk a BioWorks Európium program segítségével. A telítési kötés elemzéséhez 10^{-12} - 10^{-3} M Eu-CRF logaritmikus mennyiségét adjuk a sejtekhez, és vizsgáljuk a kötődést telítési koncentrációjú jelöletlen CRF hiányában és jelenlétében, a nem-specifikus kötés kiértékelése céljából. A kompetitív kötés vizsgálat során a kötés szempontjából félig maximális koncentrációjú Eu-CRF-t adunk a sejtekhez,



valamint a kívánt vegyület különböző koncentrációit.

3. példa

Receptor aktivációs vizsgálat

A receptor aktivációs vizsgálat során az 1. példában kapott HEK293/CRE-LUC/pIRESneo/hCRF₂R sejteket Packard View Plate-96 (Packard Inc., CA) tenyésztőedénybe oltjuk. A sejteket 10% borjú magzat szérumot, penicillin/streptomycin oldatot, L-glutamint és nem-esszenciális aminosavakat tartalmazó DMEM közegben tenyésztjük 37°-on, 5% széndioxid/95%levegő atmoszférában, és egy éjszakan át inkubáljuk. A tápközeget ekkor eltávolítjuk, és a kívánt vegyületet tartalmazó 0,01 % marha albumin V frakció (SIGMA, St. Louis, MO) tartalmú DMEM közeggel (Life Technologies, Rockville, MD) helyettesítjük. A sejteket ekkor 4 órán át inkubáljuk 37°-on, 5% széndioxid/95%levegő atmoszférában, amelynek elteltével a tápközeget eltávolítjuk és a sejteket kétszer mossuk Hanks Balanced Salt Solution (Life Technologies, Rockville, MD) oldattal. A sejtekhez ekkor lízis reagenst (Lysis Reagent, Promega Inc., Madison, WI) adunk, és 20 percen át inkubáljuk 37°-on, 5% széndioxid/95%levegő atmoszférában. A sejteket ekkor -80°C-ra helyezzük 20 percre, majd 20 percen át inkubáljuk 37°-on, 5% széndioxid/95%levegő atmoszférában. Az inkubációt követően Luciferase Assay Buffer-t és Luciferase Assay Substrate-ot (Promega Inc., Madison, WI) adunk a sejtlizátumokhoz, és elvégezzük a luciferáz aktivitás mennyiségi meghatározását luminométer segítségével. Egy vegyület relatív aktivitásának kiértékelése során a vegyülettel történő expozíciót követő növeke-



dést összehasonlítjuk a CRE-LUC szerkezetet a hCRF₂R nélkül tartalmazó HEK sejtek luciferáz szintjének növekedésével a vegyülettel történő expozíciót követően. A válasz specificitását is ellenőrizzük a hCRF₂R/CRE-LUC HEK sejtek teszt vegyületre adott luciferáz válaszána kiértékelésével, 10-szeres mennyiségű hCRF₂R antagonistá jelenlétében és hiányában.

4. példa

Szűrővizsgálat a CRF₂R vagy egy CRF₂R szignál transzdukciós reakcióút agonista-indukált aktiválását fenntartó vagy felerősítő vegyületek azonosítására

A CRF₂R vagy egy CRF₂R szignál transzdukciós reakcióút agonista-indukált aktiválását fenntartó vagy felerősítő vegyületek azonosítása magába foglalja a 3. példában leírt receptor aktivációs vizsgálat egy változatát. Részletesebben, a vizsgálat során a HEK293/CRE-LUC/pIRESneo/hCRF₂R receptor sejteket Packard View Plate-96 lemezekre (Packard Inc., CA) oltjuk. A sejteket 10% borjú magzat szérumot, penicillin/streptomycin oldatot, L-glutamint, nem-esszenciális aminosavakat és telítési mennyiségű CRF-t tartalmazó DMEM közegben tenyésztjük 37°-on, 5% széndioxid/95%levegő atmoszférában, és 48 órán át inkubáljuk. A tápközeget ekkor eltávolítjuk, és a kívánt vegyületet, CRF-t és 0,01 % marha albumin V frakciót (SIGMA, St. Louis, MO) tartalmazó DMEM közeggel (Life Technologies, Rockville, MD) helyettesítjük. A sejteket ekkor 4 órán át inkubáljuk 37°-on, 5% széndioxid/95%levegő atmoszférában, amelynek elteltével a tápközeget eltávolítjuk és a sejteket kétszer mossuk Hanks Balanced Salt



Solution (Life Technologies, Rockville, MD) oldattal. A sejtekhez ekkor lízis reagenst (Lysis Reagent, Promega Inc., Madison, WI) adunk, és 20 percen át inkubáljuk 37°-on, 5% széndioxid/95%levegő atmoszférában. A sejteket ekkor -80°C-ra helyezzük 20 percre, majd 20 percen át inkubáljuk 37°-on, 5% széndioxid/95%levegő atmoszférában. Az inkubációt követően Luciferase Assay Buffer-t és Luciferase Assay Substrate-t (Promega Inc., Madison, WI) adunk a sejtlizátumokhoz, és elvégezzük a luciferáz aktivitás mennyiségi meghatározását luminométer segítségével. A fluoreszcenciát a kezeletlen kontroll sejtek szintje fölött szignifikánsan stimuláló (a sejtsűrűség változékonyságának korrekcióját követően) teszt vegyületeket vázizom-tömeget vagy -funkciót szabályozó vegyület-jelöltként értékeljük. A legelőnyösebb vegyületek azok, amelyek viszonylagosan magasabb szintű fluoreszcenciát indukálnak.

5. példa

Szűrővizsgálat CRF₂R specifikus vegyület-jelöltek azonosítására

A CRF₂R-t aktiváló vegyületeket a 3. példában leírtak szerint azonosítjuk. A szűrővizsgálatot elvégezzük CRF₁R esetében is, hogy kiválaszthassuk azokat a vegyületeket, amelyek szelektívek a CRF₂R-re a CRF₁R-rel szemben. HEK293/CRE-LUC/pIRESneo/hCRF₁R sejteket hozunk létre lényegében az 1. példában leírtak szerint, azzal a kivétellel, hogy a kezdeti PCR amplifikációhoz humán CRF₁R (hCRF₁R) DNS szekvenciát (azonosító szám: X72304) alkalmazunk. A vegyületek CRF₁R-rel szembeni aktivitásának meghatározá-



sához lényegében a 3. példában leírt aktivációs vizsgálatot végezzük el, azzal a módosítással, hogy a lemezeket HEK293/CRE-LUC/pIRESneo/hCRF₁R sejtekkel oltjuk. A vegyület által a CRF₂R expresszázó sejtekben kiváltott fluoreszcencia mennyiségét összehasonlítjuk a CRF₁R expresszázó sejtekben kiváltott fluoreszcencia mennyiségével. A CRF₂R expresszázó sejtekben a CRF₁R expresszázó sejtekhez képest 10-szer nagyobb választ (moláris alapon) kiváltó vegyületeket specificitását tovább vizsgáljuk, hogy kiküszöböljük a klónok közötti variációból származó különbségeket. HEK293/CRE-LUC/pIRESneo/hCRF₂R sejteken vizsgáljuk a vegyületet 10-szeres mennyiségű CRF₂R antagonistá, antisauvagine-30 jelenlétében vagy hiányában. Vegyület-jelöltnek tekintjük azokat a vegyületeket, amelyek a CRF₂R-re 10-szeresnél nagyobb szelektivitást mutatnak és aktivitásukat gátolja az antisauvagine-30.

6. példa

Szűrővizsgálat hCRF₂R expressziót fokozó vegyület-jelöltek azonosítására

A humán genom adatbázisból lekérdezzük a hCRF₂R gén promóter régióját tartalmazó szekvenciát, a transzkripció iniciációs helytől elegendően upstream kezdődően ahhoz, hogy tartalmazza a hCRF₂R gén adott szövetben történő fiziológiai expressziójához szükséges összes szabályozó elemet. Két oligonukleotidot szintetizálunk, az egyik a promóter régió 5' végét tartalmazza (5' oligonukleotid), a másik a promóter régió 3' végét a transzkripció kezdő hellyel együtt (3' oligonukleotid). Ezek az oligonukleotidok magukba foglalnak olyan restriktációs endonukleáz



helyeket, amelyek nem találhatók meg a hCRF₂R gén szabályozó régiójában; egy unikális hely található az 5' oligonukleotidban, és egy ettől különböző unikális restrikciós endonukleáz hely a 3' oligonukleotidban. Az 5' és 3' oligonukleotidok segítségével humán DNS-ből (Clonotech Inc., Palo Alto, CA, USA) PCR segítségével amplifikáljuk a hCRF₂R gént szabályozó régiót az Advantage® Genomic PCR készlet (Clonotech Inc., Palo Alto, CA, USA) alkalmazásával. A hCRF₂R gén szabályozó régió PCR termékét agaróz gélelektroforézissel tisztítjuk meg a PCR műtermékektől, és a hCRF₂R gént szabályozó régió DNS szakaszt az agaróz géltől megtisztítjuk egy tisztító készlet, mint például a NucleoTrap (Clonotech Inc., Palo Alto, CA, USA) segítségével. A hCRF₂R gén szabályozó régió PCR termékét a pECFP-1 vektorba (Clonotech Inc., Palo Alto, CA, USA) klónozzuk oly módon, hogy először a hCRF₂R gént szabályozó régió PCR terméket és a pECFP-1 vektort a megfelelő restrikciós endonukleázzal hasítjuk úgy, hogy az 5' és 3' restrikciós endonukleáz helyek ligálásra alkalmasak legyenek. A pECFP-1 vektor DNS-t a hCRF₂R gént szabályozó régió PCR termék DNS-hez ligáljuk az Advantage™ PCR Cloning Kit (Clonotech Inc., Palo Alto, CA, USA) DNS ligázának alkalmazásával, a gyártó előírásai szerint. A ligált vektor és inszert szerkezettel TOP10F' kompetens E. coli sejteket (Clonotech Inc., Palo Alto, CA, USA) transzformálunk. A sejteket LB plusz kanamycin tartalmú agarra szélesztjük és a kanamycin rezisztens telepeket kiválasztjuk további vizsgálat céljára. A kanamycin rezisztens klónokat LB tartalmú kanamycin közegen tenyésztjük és a plazmid DNS-t NucleoBond DNA Purification System (Clonotech Inc., Palo Alto,



CA, USA) alkalmazásával izoláljuk, majd a hCRF₂R gént szabályozó régiót tartalmazó szerkezetet DNS szekvenálással ellenőrizzük, hogy meggyőződünk a szerkezet helyességéről és sértetlenségéről. A hCRF₂R gént szabályozó régiót tartalmazó tisztított plazmid DNS szerkezettel HEK293 sejteket transzfektálunk kalcium-foszfát-mediált transzfekcióval, a CalPhosTM Mammalian Transfection Kit (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA) alkalmazásával. A transzfektált sejt klónokat G418 segítségével szelektáljuk, izoláljuk, majd 10% borjú magzat szérumot (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA), penicillin/streptomycin oldatot (Life Technologies, Rockville, MD), L-glutamint (Life Technologies, Rockville, MD), nem-esszenciális aminosavakat (Life Technologies, Rockville, MD) és G418-at (Life Technologies, Rockville, MD) tartalmazó DMEM közegben (Life Technologies, Rockville, MD) tenyésztjük 37°C-on, 5% széndioxid/95%levegő atmoszférában. A G418 rezisztens klónokat Southern blotting segítségével ellenőrizzük, hogy tartalmazzák-e a hCRF₂R gén promóter szekvenciát; ezen túl a hCRF₂R gén szabályozó régió aktivációját vizsgáljuk egy megfelelő stimuláns alkalmazásával. A hCRF₂R gén szabályozó régió-ECFP-t megfelelő szinten expresszáló sejteket ekkor a hCRF₂R gén szabályozó régió aktivitását módosító vegyületek kiértékelésére szolgáló, az alábbiakban leírt vizsgálatokban alkalmazzuk. A szabályozó régió aktivációs vizsgálat során a hCRF₂R gén szabályozó régió-ECFP-t tartalmazó HEK293 sejteket megfelelő sűrűségben fekete falú és átlátszó aljú 96 lyukú mikrotitráló lemezre helyezzük és egy éjszakán át tenyésztjük. A következő nap eltávolítjuk a tápközeget, majd friss tápközegben



hozzáadjuk a teszt vegyületet. A sejteket 16 órán át inkubáljuk 37°C-on, 5% széndioxid/95%levegő atmoszférában, majd fluoreszcencia mérés következik [gerjesztés 433 (453) nm-en, az emisszió detektálása 475 (501) nm-en] fluoriméter alkalmazásával (Biolumin TM 960, Molecular Dynamics/Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). A fluoreszcenciát a kezeletlen kontroll sejtek szintje fölött szignifikánsan stimuláló (a sejtsűrűség változékonyságának korrekcióját követően) teszt vegyületeket vegyületjelöltként értékeljük a vázizom-tömeg vagy funkció szabályozás tekintetében. A legelőnyösebb vegyületek azok, amelyek viszonylagosan nagyobb szintű fluoreszcenciát indukálnak.

7. példa

Szűrővizsgálat humán CRF expressziót fokozó vegyületek azonosítására

A humán CRF (hCRF) expressziót fokozó vegyületek azonosítására szolgáló eljárások lényegében megegyeznek a hCRF₂R expressziót fokozó vegyületek azonosítására szolgáló eljárásokkal, azzal a módosítással, hogy a hCRF gén szabályozó régióját alkalmazzuk. A humán genom adatbázisból lekérdezzük a hCRF gén szabályozó régióját tartalmazó szekvenciát, a transzkripció iniciációs helytől elegendően upstream kezdődően ahhoz, hogy tartalmazza a hCRF gén adott szövetben történő fiziológiai expressziójához szükséges összes szabályozó elemet. Két oligonukleotidot szintetizálunk, az egyik a szabályozó régió 5' végét tartalmazza (5' oligonukleotid), a másik a szabályozó régió 3' végét a transzkripció kezdő hellyel együtt (3' oligonukleotid). Ezek az oligonuk-



leotidok magukba foglalnak olyan restriktációs endonukleáz helyeket, amelyek nem találhatók meg a hCRF gén szabályozó régiójában; egy unikális hely található az 5' oligonukleotidban, és egy ettől különböző unikális restriktációs endonukleáz hely a 3' oligonukleotidban. Az 5' és 3' oligonukleotidok segítségével humán DNS-ből (Clonotech Inc., Palo Alto, CA, USA) PCR segítségével amplifikáljuk a hCRF gén szabályozó régiót az Advantage® Genomic PCR készlet (Clonotech Inc., Palo Alto, CA, USA) alkalmazásával. A hCRF gén szabályozó régió PCR terméket agaróz gélelektroforézissel tisztítjuk meg a PCR műtermékektől, és a hCRF gén szabályozó régió DNS szakaszt az agaróz géltől megtisztítjuk egy tisztító készlet, mint például a NucleoTrap (Clonotech Inc., Palo Alto, CA, USA) segítségével. A hCRF gén szabályozó régió PCR termékét a pECFP-1 vektorba (Clonotech Inc., Palo Alto, CA, USA) klónozzuk oly módon, hogy először a hCRF gén szabályozó régió PCR terméket és a pECFP-1 vektort a megfelelő restriktációs endonukleázzal hasítjuk úgy, hogy az 5' és 3' restriktációs endonukleáz helyek ligálásra alkalmasak legyenek. A pECFP-1 vektor DNS-t a hCRF gén szabályozó régió PCR termék DNS-hez ligáljuk az Advantage™ PCR Cloning Kit (Clonotech Inc., Palo Alto, CA, USA) DNS ligázának alkalmazásával, a gyártó előírásai szerint. A ligált vektor és inszert szerkezettel TOP10F' kompetens E. coli sejteket (Clonotech Inc., Palo Alto, CA, USA) transzformálunk. A sejteket LB plusz kanamycin tartalmú agarra szélesztjük és a kanamycin rezisztens telepeket kiválasztjuk további vizsgálat céljára. A kanamycin rezisztens klónokat LB tartalmú kanamycin közegen tenyésztjük és a plazmid DNS-t



NucleoBond DNA Purification System (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA) alkalmazásával izoláljuk, majd a hCRF₂R gén szabályozó régiót tartalmazó szerkezetet DNS szekvenálással ellenőrizzük, hogy meggyőződjünk a szerkezet helyességéről és sértetlenségéről. A hCRF gén szabályozó régiót tartalmazó tisztított plazmid DNS szerkezettel HEK293 sejteket transzfektálunk kalcium-foszfát-mediált transzfekcióval, a CalPhos™ Mammalian Transfection Kit (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA) alkalmazásával. A transzfektált sejt klónokat G418 segítségével szelektáljuk, izoláljuk, majd 10% borjú magzat szérumot (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA), penicillin/streptomycin oldatot (Life Technologies, Rockville, MD), L-glutamint (Life Technologies, Rockville, MD), nem-esszenciális aminosavakat (Life Technologies, Rockville, MD) és G418-at (Life Technologies, Rockville, MD) tartalmazó DMEM közegben (Life Technologies, Rockville, MD) tenyésztjük 37°C-on, 5% széndioxid/95%levegő atmoszférában. A G418 rezisztens klónokat Southern blotting segítségével ellenőrizzük, hogy tartalmazzák-e a hCRF gén promóter szekvenciát; ezen túl a hCRF gén szabályozó régió aktivációját vizsgáljuk egy megfelelő stimuláns alkalmazásával. A hCRF gén szabályozó régió-ECFP-t megfelelő szinten expresszáló sejteket ekkor a hCRF gén szabályozó régió aktivitását módosító vegyületek kiértékelésére szolgáló, az alábbiakban leírt vizsgálatokban alkalmazzuk. A szabályozó régió aktivitás vizsgálatot az 5. példában leírtak szerint végezzük, azzal a különbséggel, hogy a hCRF gén szabályozó régió szerkezetet magukba foglaló klónokat alkalmazzunk.



8. példa

Eljárás a hCRF₂R-t aktiváló humán antitestek előállítására

A hCRF₂R-t aktiváló teljesen humán monoklonális antitestek előállítása során először rekombináns hCRF₂R fehérjét hozunk létre az alábbiak szerint. Az 1. példában leírt eljárást követve létrehozuk a hCRF₂R PCR terméket. Ezt a hCRF₂R PCR terméket pHAT20 vektorba (Clonotech Inc., Palo Alto, CA, USA) klónozzuk. Először a hCRF₂R gén PCR terméket és a pHAT20 vektort a megfelelő restrikciós endonukleázzal hasítjuk úgy, hogy az 5' és 3' restrikciós endonukleáz helyek ligálásra alkalmasak legyenek. A pHAT20 vektor DNS-t a hCRF₂R gén PCR termék DNS-hez ligáljuk az AdvantAge™PCR Cloning Kit (Clonotech Inc., Palo Alto, CA, USA) DNS ligázának alkalmazásával, a gyártó előírásai szerint. A ligált vektor/inszert szerkezettel TOP10F' kompetens E. coli sejteket (Clonotech Inc., Palo Alto, CA, USA) transzformálunk. A sejteket LB plusz ampicillin tartalmú agarra szélesztjük és az ampicillin rezisztens telepeket kiválasztjuk további vizsgálat céljára. A pozitív klónokat ampicillin tartalmú LB közegen tenyésztjük és a plazmid DNS-t NucleoBond DNA Purification System (Clonotech Inc., Palo Alto, CA, USA) alkalmazásával izoláljuk, majd a hCRF₂R gént tartalmazó szerkezetet DNS szekvenálással ellenőrizzük, hogy meggyőződjünk a szerkezet helyességéről és sértetlenségéről. A pCRF₂R-pHAT20 vektor DNS-t további PCR klónozásra használjuk a HAT szekvencia elejét és egy, a hCRF₂R-pHAT20 szerkezetben nem előforduló unikális restrikciós endonukleáz helyet tartalmazó 5' oligonukleotid és az előbbieken használt 3' oligonukleotid alkalmazásával. Az oligonukleotid



primerek segítségével PCR amplifikáljuk a HAT-hCRF₂R fúziós gént a hCRF₂R-pHAT20 szerkezetből, és a PCR terméket a fentiekben leírt módon tisztítjuk. A HAT-hCRF₂R fúziós gén PCR terméket pBacPAK8 vektorba klónozzuk a BacPAK Baculovirus Expression System (clonetechn Inc., Palo Alto, CA, USA) alkalmazásával. A HAT-hCRF₂R fúziós gén pBacPAK8 vektorba történő klónozása lényegében a fentiekben leírt módon történik. A HAT-hCRF₂R/pBacPAK8 szerkezetet TOP10'F kompetens E. coli sejtekbe transzfektáljuk, szelektáljuk az ampicillin rezisztens sejteket, izoláljuk a plazmid DNS-t és a fentiekben leírt módon ellenőrizzük a szerkezet integritását. Ezt a szerkezetet linearizált BacPAK6 DNS-sel együtt ko-transzfektáljuk Sf21 rovar gazdasejtekbe, a CalPhosTM Mammalian Transfection Kit (Clonetechn Inc., Palo Alto, CA, USA) alkalmazásával. A rovarsejteket 2-3 napig inkubáljuk, majd learatjuk a vírust a különálló világos tarfoltokról. A vírust ekkor Sf21 sejtekben amplifikáljuk, a learatott vírust titráljuk, majd a titrált vírust nagy mennyiségben Sf21 sejtek fertőzésére használjuk BacPAK Insect Cell Media (Clonetechn Inc., Palo Alto, CA, USA) alkalmazásával, a gyártó előírásait követve. A rekombináns HAT-hCRF₂R fúziós fehérjét TALON® CellThru Purification Kit (Clonetechn Inc., Palo Alto, CA, USA) segítségével tisztítjuk a gyártó által javasolt körülmények között. Röviden, a fertőzött Sf21 sejteket a fertőzés után 48 órával learatjuk és extrakciós/töltő pufferben ultrahanggal kezeljük. A sejt-lizátumot keresztülengedjük TALON® CellThru oszlopon. Az oszlopot kétszer mossuk extrakciós/töltő pufferrel és a kötött HAT-hCRF₂R fehérjét elúciós pufferrel eluáljuk. Az eluált fehérje



integritását SDS-PAGE segítségével elemezzük és a fehérje koncentrációt Bio-Rad SDS-PAGE rendszerrel és fehérje kvantifikációs rendszerekkel határozzuk meg a gyártó előírásai szerint (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). A tisztított HAT-hCRF₂R fúziós fehérjével XenoMouse állatokat (Abgenix Inc., Fremont, CA) immunizálunk humán monoklonális antitest termelésére a következő módon: 25 µg monofoszforil-lipid adjuvánssal (Sigma, St. Louis, MO) kombinált 10 µg tisztított rekombináns HAT-hCRF₂R fúziós fehérjével beoltunk 10 XenoMouse állatot egy 8 hetes időszak során több alkalommal. A szérumot kinyerjük a vakcinált állatokból és HAT-hCRF₂R fúziós fehérje alkalmazásával antigén befogó ELISA módszerrel detektáljuk a HAT-hCRF₂R fehérje elleni antitesteket: polisztirol ELISA lemezeket (Corning Glass Works, Corning, NY) HAT-hCRF₂R fúziós fehérjével fedünk be, PBS-1% BSA oldattal blokkoljuk, mossuk és 1 órán át inkubáljuk 37°C-on a szérum minták 1:50 hígításaival. A lemezeket 5-ször mossuk PBS-sel, majd 1 órán át inkubáljuk 37°C-on humán immunglobulin G ellen termelt, alkalikus-foszfátáz konjugált kecske antitesttel. A lemezeket ekkor 5-ször mossuk PBS-sel, majd az antitesteket p-nitrofenil foszfát szubsztráttal (Sigma, St. Louis, MO) detektáljuk. Egy lemezleolvasó segítségével leolvassuk az optikai denzitást 405 nm-en és a jelet kvantifikáljuk. A magas antitest produkciót mutató egereket hibridóma képzésre használjuk. A hibridómák létrehozásához XenoMouse állatok lépsejtjeit NSA-bcl 2 nem-szekretáló mielóma sejtvonallal fuzionáljuk 4:1 lépsejt : NSA-bcl 2 sejt arányban 30% PEG1450 polietilén-glikol jelenlétében. A fuzionált sejteket individuálisan klónozzuk 96 lyukú le-



mezekre történő határ higítással és 10% borjú magzat szérumot, nem-esszenciális aminosavakat, nátrium-piruvátot, L-glutamint, 100 u/ml penicillin/streptomycin oldatot és hipoxantin-aminopterin-timidint tartalmazó RPMI-1640 közegben (minden összetevő forrása a Life Technologies, Rockville, MD) tenyésztjük. A hipoxantin-aminopterin-timidin szelektált hibridómák felülúszójának humán antitest termelését ELISA módszerrel vizsgáljuk a korábbiakban leírtak szerint. A HAT-hCRF₂R fúziós fehérje ellen humán antitestet termelő hibridómákat nagymennyiségű antitest termelésére szelektáljuk. A monoklonális antitesteket G-fehérje - szefaróz kromatográfiával tisztítjuk. Röviden, a tenyésztett hibridóma klónok felülúszóját töltőpufferben G-fehérje - szefaróz oszlopra (Sigma, St. Louis, MO) töltjük, háromszor mosuk és az IgG-t elúciós pufferrel eluáljuk. Az antitesteket ekkor hCRF₂R aktivációs potenciál (agonizmus) szűrésére alkalmazzuk. Ezt a 3. példában leírt módszerrel végezzük. A hCRF₂R irányában agonista aktivitást mutató humán monoklonális antitesteket vegyület-jelölteknek határozzuk meg.

9. példa

Egy izom abszolút erejének mérése

A begipszelt egér lábról eltávolítjuk a hosszú ujjfesztítő izmot (EDL) és a talpemelő izmokat az inakkal együtt. Az izolált izmok mindegyik inához selyem varratot erősítünk, majd az izmokat Ringer oldattal (137 mM nátrium-klorid, 24 mM nátrium-bikarbonát, 11 mM glükóz, 5 mM kálium-klorid, 1 mM magnézium-szulfát, 1 mM nátrium-foszfát, 0,025 mM tubokurarin, pH = 7,4)



megtöltött plexiüveg kamrákba helyezzük, amelyeken folyamatosan átbuborékoltatunk 25°C-os 95% oxigén/5% széndioxid elegyet. Az izmokat vízszintesen elrendezzük egy szervomotor emelőkar (Model 305B-LR, Cambridge Technology Inc., Watertown MA, USA) és egy erő transzduktor (Model BG-50, Kulite Semiconductor Products Inc., Leonia NJ, USA) rozsdamentes acél kampója között, és az izom mindkét oldalára hosszanti irányban helyezett két platina elektróda között át bocsátott impulzusokkal stimuláljuk. A Labview vezérlővel (Model PCI-MIO 16E-4) (Labview Inc., Austin, TX, USA) felszerelt személyi számítógép által generált szögletes impulzusokat (0,2 ms időtartam) amplifikáljuk (Acurus power amplifier model A25, Dobbs Ferry, NY, USA) a tetanuszos összehúzódnak növelésére. A stimulációs feszültséget és az izomhosszt (Lo) maximális izometriás rángási erő elérése céljából állítjuk be. A maximális tetanuszos erőhatás (Po) a frekvencia-erő függvény plató értékéből határozható meg.

10. példa

Vázizom atrófia terápiás kezelése hCRF₂R receptor agonista humán antitesttel

Hosszan tartó ágynyugalom következtében kialakult, jelentős mértékű kar- és lábizom atrófiával rendelkező, 50 kg tömegű férfi alany vázizom atrófiáját kezeljük. Három hónapon keresztül hetente egyszer a CRF₂R receptor egy aktiváló antitestjét tartalmazó vizes oldatból (pH = 6) 15 ml-t adunk be az alanynak intravénás injekció útján.

Az oldat összetétele a következő:



Összetevő	Koncentráció (mg/ml)
CRF ₂ R receptor agonista antitest	20
L-hisztidin HCl	0,47
L-hisztidin	0,3
α,α -trehalóz dihidrát	20
Polysorbate 20	0,1
bakteriosztatikus steril víz	1 ml végtérfogatig

A kezelési időszak végén mérhető növekedés figyelhető meg az alany karjainak és lábainak izomtömegében, erejében és mozgékonyágában.

11. példa

Vázizom atrófia megelőzésére irányuló kezelés hCRF₂R receptor agonista humán antitesttel

55 kg tömegű nő alany egy hónappal csípőízület átültetés műtét előtt áll. Az alanyt a műtét előtt és után kezeljük vázizomtömeg növelése céljából, hogy csökkentsük a vázizom atrófia szintjét, amely a műtétet követő lábadozás idején az izmok igénybevétele hiánya miatt következik be. A műtét előtt egy hónapon keresztül és a műtét után két hónapon át heti egyszer a CRF₂R receptor egy aktiváló antitestjét tartalmazó vizes oldatból (pH = 6) 18 ml-t adunk be az alanynak intravénás injekció útján.

Az oldat összetétele a következő:

Összetevő	Koncentráció (mg/ml)
CRF ₂ R aktiváló antitest	20
L-hisztidin HCl	0,47
L-hisztidin	0,3



α,α -trehalóz dihidrát	20
Polysorbate 20	0,1
bakteriosztatikus steril víz	1 ml végtérfogatig

A kezelési időszak végén mérhető növekedés figyelhető meg az alany karjainak és lábainak izomtömegében, erejében és mozgékonyágában, összehasonlítva az alany antitest kezelés nélkül várt állapotával.

12. példa

Vázizom atrófia megelőzésére irányuló kezelés hCRF₂R receptor agonista humán antitesttel

45 kg tömegű nő alany karját begipszelik esés miatt bekövetkezett egyszerű felkarcsont törés kezelése során. Az érintett kar és váll vázizmaiban a gyógyulás alatti igénybevétel hiánya és csökkenése miatt bekövetkező atrófia megelőzése érdekében az alany kezelést kap. A gipszelés napjával kezdődően heti egyszer anti-CRF₂R receptort tartalmazó vizes oldatból (pH = 6) 13 ml-t adunk be az alanynak intravénás injekció útján. Az oldat összetétele a következő:

Összetevő	Koncentráció (mg/ml)
CRF ₂ R aktiváló antitest	20
L-hisztidin HCl	0,47
L-hisztidin	0,3
α,α -trehalóz dihidrát	20
Polysorbate 20	0,1
bakteriosztatikus steril víz	1 ml végtérfogatig

A kezelési időszak végén az alany érintett karja és válla mér-



hetően megőrzi izomtömegét, erejét és mozgékonyágát, és csökken a fizikoterápiás kezelés időtartama, összehasonlítva az alany várt állapotával és utókezelésével antitest terápia hiányában.

13. példa

Vázizom atrófia megelőzésére irányuló kezelés urokortin-II alkalmazásával

60 kg tömegű nő alanyt kómás állapotban szállítanak kórházba. A kómás állapot miatti igénybétel hiánya következtében az egész test vázizom-atrófiájának megelőzésére az alanyt a bemutatott módszerrel kezeljük. A kóma időtartama alatt az alany naponta körülbelül 500 ml-t kap lassú intravénás infúzióval egy vizes oldatból, amelynek elkészítéséhez 500 ml steril sóoldathoz 5 ml-t adunk a következő törzsoldatból:

Összetevő	Koncentráció (mg/ml)
urokortin-II	12
nátrium-foszfát puffer pH = 7,4	140

A kezelés eredményeképpen az alany mérhetően megőrzi vázizom-tömegét és -funkcióját, csökken fizikoterápiás igénye a kóma alatt és öntudatának visszanyerését követően, összehasonlítva az alany terápia nélküli állapotával.

14. példa

Duchenne-féle izomdisztrófiás beteg terápiás kezelése CRF alkalmazásával

Duchenne-féle izomdisztrófiával diagnosztizált 40 kg tömegű férfi alanyt kezelünk egy vegyülettel, amely CRF₁R és CRF₂R



agonizmust mutat ugyanazon dózistartományban. Az alanyt a vegyület egy késleltetett felszabadulású depó készítményével kezeljük abból a célból, hogy az izomerő és -funkció javuljon vagy megmaradjon a betegség előrehaladtával. Részletesebben, az alany havonta egy intramuszkuláris injekcióval 3 ml-t kap a következő összetételű vizes oldatból (pH = 6,0):

Összetevő	Koncentráció (mg/ml)
CRH (adrenokortikotrop hormon felszabadító hormon)	4
D,L tejsav és glikolsav kopolimer	5

A kezelés eredményeképpen az alany az izomerő vagy -funkció javulását vagy csökkenésének lassulását tapasztalja a kiértékelések során, összehasonlítva a betegség természetes progressziója során tapasztaltakkal.

A találmány oltalmi körét nem korlátozzák a leírt specifikus megvalósítási módok, amelyek kizárólag a találmány egyéni nézőpontjainak példájául szolgálnak, továbbá a találmány oltalmi körébe tartoznak a funkcionálisan egyenértékű módszerek és komponensek. Ezek közé tartozik nem korlátozó módon a teszt állat faja, a CRFR agonisták természete és fajtája, az állat neme, az atrofias modell, a CRFR aktiválás módja, beleértve a genetikai módszereket stb. A leírás és az azt kísérő ábrák olvasását követően a szakember számára a találmány számos módosítása nyilvánvaló lesz a leírtakon túlmenően. Az ilyen módosítások a csatolt igénypontok oltalmi körébe tartozónak tekintendők.



Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás vázizom-tömeg vagy -funkció szabályozására szolgáló vegyület-jelöltek azonosítására, azzal jellemezve, hogy:

- a) egy teszt vegyületet érintkeztetünk egy CRF₂R-rel;
- b) meghatározzuk, hogy a teszt vegyület köti-e a CRF₂R-t; és
- c) a CRF₂R-t kötő teszt vegyületeket vázizom-tömeg vagy -funkció szabályozására szolgáló vegyület-jelöltekként azonosítjuk.

2. Eljárás vázizom-tömeg vagy -funkció szabályozására szolgáló vegyület-jelöltek azonosítására, azzal jellemezve, hogy:

- a) egy teszt vegyületet érintkeztetünk egy működőképes CRF₂R-t expresszáló sejttel;
- b) meghatározzuk, hogy a teszt vegyület aktiválja-e a CRF₂R-t; és
- c) a CRF₂R-t aktiváló teszt vegyületeket vázizom-tömeg vagy -funkció szabályozására szolgáló vegyület-jelöltekként azonosítjuk.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás vegyület-jelöltek azonosítására, azzal jellemezve, hogy az eljárás magába foglalja továbbá vegyület-jelöltek listájának létrehozását.

4. A 2. igénypont szerinti eljárás vegyület-jelöltek azonosítására, azzal jellemezve, hogy a CRF₂R expresszió egy eukarióta sejtben történik.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás vegyület-jelöltek azonosítására, azzal jellemezve, hogy a CRF₂R aminosav-szekven-



nosítására, azzal jellemezve, hogy a CRF₂R aminosav-szekvenciája több, mint 80%-ban megegyezik a 10. számú szekvenciával.

6. A 4. igénypont szerinti eljárás vegyület-jelöltek azonosítására, azzal jellemezve, hogy a CRF₂R aminosav-szekvenciája több, mint 90%-ban megegyezik a 10. számú szekvenciával.

7. A 4. igénypont szerinti eljárás vegyület-jelöltek azonosítására, azzal jellemezve, hogy a CRF₂R aminosav-szekvenciája megfelel a 10. számú szekvencia, a 12. számú szekvencia, a 14. számú szekvencia, a 18. számú szekvencia, a 20. számú szekvencia, a 24. számú szekvencia, a 26. számú szekvencia, a 32. számú szekvencia vagy a 38. számú szekvencia aminosav-szekvenciájának igénypont szerinti eljárás vegyület-jelöltek azonosítására, azzal jellemezve, hogy a CRF₂R az embert, egeret és patkányt magába foglaló csoportból választott fajból származik. A 8. igénypont szerinti eljárás vegyület-jelöltek azonosítására, azzal jellemezve, hogy a CRF₂R humán eredetű.

10. A 4. igénypont szerinti eljárás vegyület-jelöltek azonosítására, azzal jellemezve, hogy a vizsgált vegyület CRF₂R aktiválási képességének meghatározása során megmérjük egy cAMP szinttel rendelkező sejt cAMP szintjét.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás vegyület-jelöltek azonosítására, azzal jellemezve, hogy a sejt magába foglal továbbá egy cAMP érzékeny elemmel összekapcsolt riporter gént és a sejt cAMP szint meghatározása magába foglalja a riporter gén expressziójának mérését.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás vegyület-jelöltek azonosítására, azzal jellemezve, hogy a riporter gén alkalikus



foszfatáz, kloramfenikol-acetil-ranszferáz, luciferáz, glukuro-id-szintetáz, növekedési hormon, placenta alkalikus foszfatáz vagy zöld fluoreszcens fehérje.

13. Eljárás vázizom-tömeg vagy -funkció szabályozására szolgáló vegyület-jelöltek azonosítására, azzal jellemezve, hogy bármely sorrendben:

a) érintkeztetünk egy teszt vegyületet egy működőképes CRF_2R -t expresszáló sejttel, és meghatározzuk a teszt vegyület által létrehozott CRF_2R aktivációs szintet;

b) egy teszt vegyületet érintkeztetünk egy működőképes CRF_1R -t expresszáló sejttel, és meghatározzuk a teszt vegyület által létrehozott CRF_1R aktivációs szintet; majd

c) összehasonlítjuk a CRF_2R aktiváció és a CRF_1R aktiváció szintjét; és

d) vázizom-tömeg vagy -funkció szabályozására szolgáló vegyület-jelöltekként azonosítjuk azokat a teszt vegyületeket, amelyek azonos aktivitást mutatnak a CRF_2R és CRF_1R felé vagy CRF_2R szelektivitást mutatnak.

14. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a vegyület-jelölt 100-szoros vagy még nagyobb CRF_2R -szelektivitást mutat.

15. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a vegyület-jelölt 1000-szeres vagy még nagyobb CRF_2R -szelektivitást mutat.

16. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a vegyület-jelölt 1-100-szoros CRF_2R -szelektivitást mutat.

17. Eljárás terápiás vegyület-jelöltek azonosítására egy

vagy több olyan vegyület-jelöltből álló csoportból, amelyeknek korábban már megállapították CRF₂R-kötő vagy -aktiváló képességét, azzal jellemezve, hogy:

- a) a vegyület-jelöltet beadjuk egy nem-humán állatnak; és
- b) meghatározzuk, hogy a vegyület-jelölt szabályozza-e a vázizom-tömeget vagy funkciót a kezelt állatban.

18. Eljárás olyan vegyület-jelöltek azonosítására, amelyek fenntartják vagy felerősítik egy CRF₂R vagy egy CRF₂R szignál transzdukciós reakcióút agonista-indukált aktiválását, azzal jellemezve, hogy bármely sorrendben vagy egyidejűleg:

a) érintkezésbe hozunk egy teszt vegyületet egy működőképes CRF₂R-t expresszáló sejttel;

b) a sejtet egy CRF₂R agonistával kezeljük olyan időtartamig és olyan koncentrációban, amely kontroll sejtekben a CRF₂R deszenzitizálását okozza; majd

c) meghatározzuk a CRF₂R aktiválás szintjét; és

d) vázizom-tömeg vagy -funkció szabályozására szolgáló vegyület-jelöltként azonosítjuk azokat a teszt vegyületeket, amelyek fenntartják vagy felerősítik egy CRF₂R vagy egy CRF₂R szignál transzdukciós reakcióút agonista-indukált aktiválását.

19. Eljárás terápiás vegyület-jelöltek azonosítására egy vagy több vegyület-jelöltből álló csoportból, amelyekről a korábbiakban megállapításra került, hogy fenntartják vagy felerősítik egy CRF₂R vagy egy CRF₂R szignál transzdukciós reakcióút agonista-indukált aktiválását, azzal jellemezve, hogy:

a) a vegyület-jelöltet egy CRF₂R agonistával együtt beadjuk egy nem-humán állatnak; és

b) meghatározzuk, hogy a vegyület-jelölt szabályozza-e a vázizom-tömeget vagy funkciót a kezelt állatban.

20. Eljárás CRF₂R vagy CFR expresszió fokozására szolgáló vegyület-jelöltek azonosítására, azzal jellemezve, hogy:

a) egy vizsgált vegyületet érintkeztetünk egy CRF₂R szabályozó elemmel vagy egy CRF szabályozó elemmel működőképesen összekapcsolt riporter gént tartalmazó sejttel vagy sejtlizátummal;

b) detektáljuk a riporter gén expresszióját; és

c) vázizom-tömeg vagy -funkció szabályozására szolgáló vegyület-jelöltként azonosítjuk azokat a teszt vegyületeket, amelyek fokozzák a riporter gén expresszióját.

21. CRF₂R agonista alkalmazása vázizom-tömeg vagy -funkció növelésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására.

22. CRF₂R agonisták, működőképes CRF₂R-t kódoló expressziós vektorok, konstitutívan aktív CRF₂R-t kódoló expressziós vektorok, CRF-t kódoló expressziós vektorok és CRF₂R vagy CRF expressziót növelő vegyületek alkalmazása vázizom atrófia kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására.

23. A 22. igénypont szerinti alkalmazás, amelyben a vegyület egy CRF₂R agonista.

24. A 23. igénypont szerinti alkalmazás, amelyben a CRF₂R agonista egy vázizom-tömeg vagy -funkció szabályozására szolgáló vegyület-jelöltek azonosítására szolgáló eljárással azonosított vegyület.

25. A 23. igénypont szerinti alkalmazás, amelyben a CRF₂R agonista egy kiméra vagy humán antitest.

26. A 25. igénypont szerinti alkalmazás, amelyben a CRF₂R



agonista a CRF₁R-hez képest szelektív CRF₂R-re.

27. A 26. igénypont szerinti alkalmazás, amelyben a CRF₂R agonista CRF₂R szelektivitása 100-szoros vagy még nagyobb.

28. A 23. igénypont szerinti alkalmazás, amelyben a CRF₂R agonista 1-100-szoros szelektivitást mutat a CRF₂R-re.

29. A 23. igénypont szerinti alkalmazás, amelyben ezen túl egy CRF₂R vagy egy CRF₂R szignál transzdukciós reakcióút agonista-indukált aktiválását fenntartó vagy felerősítő vegyület is alkalmazunk.

30. CRF₂R-re specifikus tisztított antitest, azzal jellemezve, hogy az antitest egy kiméra vagy humán antitest.

31. A 30. igénypont szerinti antitest, azzal jellemezve, hogy az antitest egy CRF₂R agonistája.

32. A 31. igénypont szerinti antitest, azzal jellemezve, hogy az antitest egy humán antitest.

33. Gyógyszer készítmény, amely
a) egy CRF₂R agonista biztonságos és hatékony mennyiségét; és
b) egy gyógyászatilag elfogadható hordozót
tartalmaz.

34. A 33. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, amely CRF₂R agonistaként egy CRF₂R-re specifikus kiméra vagy humán antitestet tartalmaz.

35. A 33. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, amely CRF₂R agonistaként az urokortin II-t tartalmaz.

A meghatalmazott:

S. B. G. & K.

Szabadalmi Ügyvivői Iroda
H-1062 Budapest, Andrásy út 113.
Telefon: 461-1000, Fax: 461-1099

Eredeti szabadalmi igénypontok

1. Eljárás vázizom-tömeg vagy -funkció szabályozására szolgáló vegyület-jelöltek azonosítására, azzal jellemezve, hogy:

- a) egy teszt vegyületet érintkeztetünk egy CRF₂R-rel;
- b) meghatározzuk, hogy a teszt vegyület köti-e a CRF₂R-t; és
- c) a CRF₂R-t kötő teszt vegyületeket vázizom-tömeg vagy -funkció szabályozására szolgáló vegyület-jelöltekként azonosítjuk.

2. Eljárás vázizom-tömeg vagy -funkció szabályozására szolgáló vegyület-jelöltek azonosítására, azzal jellemezve, hogy:

- a) egy teszt vegyületet érintkeztetünk egy működőképes CRF₂R-t expresszázó sejttel;
- b) meghatározzuk, hogy a teszt vegyület aktiválja-e a CRF₂R-t; és
- c) a CRF₂R-t aktiváló teszt vegyületeket vázizom-tömeg vagy -funkció szabályozására szolgáló vegyület-jelöltekként azonosítjuk.

3. A 2. igénypont szerinti eljárás vegyület-jelöltek azonosítására, azzal jellemezve, hogy az eljárás magába foglalja továbbá vegyület-jelöltek listájának létrehozását.

4. A 2. igénypont szerinti eljárás vegyület-jelöltek azonosítására, azzal jellemezve, hogy a CRF₂R expresszió egy eukarióta sejtben történik.

5. A 4. igénypont szerinti eljárás vegyület-jelöltek azonosítására, azzal jellemezve, hogy a CRF₂R aminosav szekvenciája több, mint 80%-ban megegyezik a 10. számú szekvenciával.

6. A 4. igénypont szerinti eljárás vegyület-jelöltek azonosítására, azzal jellemezve, hogy a CRF₂R aminosav szekvenciája több, mint 90%-ban megegyezik a 10. számú szekvenciával.

7. A 4. igénypont szerinti eljárás vegyület-jelöltek azonosítására, azzal jellemezve, hogy a CRF₂R aminosav szekvenciája megfelel a 10. számú szekvencia, a 12. számú szekvencia, a 14. számú szekvencia, a 18. számú szekvencia, a 20. számú szekvencia, a 24. számú szekvencia, a 26. számú szekvencia, a 32. számú szekvencia vagy a 38. számú szekvencia aminosav szekvenciájának.

8. A 4. igénypont szerinti eljárás vegyület-jelöltek azonosítására, azzal jellemezve, hogy a CRF₂R az embert, egeret és patkányt magába foglaló csoportból választott fajból származik.

9. A 8. igénypont szerinti eljárás vegyület-jelöltek azonosítására, azzal jellemezve, hogy a CRF₂R humán eredetű.

10. A 4. igénypont szerinti eljárás vegyület-jelöltek azonosítására, azzal jellemezve, hogy a vizsgált vegyület CRF₂R aktiválási képességének meghatározása során megmérjük egy cAMP szinttel rendelkező sejt cAMP szintjét.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás vegyület-jelöltek azonosítására, azzal jellemezve, hogy a sejt magába foglal továbbá egy cAMP érzékeny elemmel összekapcsolt riporter gént és a sejt cAMP szint meghatározása magába foglalja a riporter gén expressziójának mérését.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás vegyület-jelöltek azonosítására, azzal jellemezve, hogy a riporter gén alkalikus-foszfataáz, kloramfenikol-acetiltranszferáz, luciferáz, glukuronid-szintetáz, növekedési hormon, placenta alkalikus-

foszfatáz vagy zöld fluoreszcens fehérje.

13. Eljárás vázizom-tömeg vagy -funkció szabályozására szolgáló vegyület-jelöltek azonosítására, azzal jellemezve, hogy bármely sorrendben:

a) érintkeztetünk egy teszt vegyületet egy működőképes CRF_2R -t expresszálo sejttel, és meghatározzuk a teszt vegyület által létrehozott CRF_2R aktivációs szintet;

b) egy teszt vegyületet érintkeztetünk egy működőképes CRF_1R -t expresszálo sejttel, és meghatározzuk a teszt vegyület által létrehozott CRF_1R aktivációs szintet; majd

c) összehasonlítjuk a CRF_2R aktiváció és a CRF_1R aktiváció szintjét; és

d) vázizom-tömeg vagy -funkció szabályozására szolgáló vegyület-jelöltekként azonosítjuk azokat a teszt vegyületeket, amelyek azonos aktivitást mutatnak a CRF_2R és CRF_1R felé vagy CRF_2R szelektivitást mutatnak.

14. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a vegyület-jelölt 100-szoros vagy még nagyobb CRF_2R -szelektivitást mutat.

15. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a vegyület-jelölt 1000-szeres vagy még nagyobb CRF_2R -szelektivitást mutat.

16. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a vegyület-jelölt 1-100-szoros CRF_2R -szelektivitást mutat.

17. Eljárás terápiás vegyület-jelöltek azonosítására egy vagy több olyan vegyület-jelöltekből álló csoportból, amelyeknek korábban már megállapították CRF_2R -kötő vagy -aktiváló képességét, az-

zal jellemezve, hogy:

- a) a vegyület-jelöltet beadjuk egy nem-humán állatnak; és
- b) meghatározzuk, hogy a vegyület-jelölt szabályozza-e a váz-izom-tömeget vagy funkciót a kezelt állatban.

18. Eljárás olyan vegyület-jelöltek azonosítására, amelyek fenntartják vagy felerősítik egy CRF₂R vagy egy CRF₂R szignál transzdukciós reakcióút agonista-indukált aktiválását, azzal jellemezve, hogy bármely sorrendben vagy egyidejűleg:

- a) érintkezésbe hozunk egy teszt vegyületet egy működőképes CRF₂R-t expresszáló sejttel;

- b) a sejtet egy CRF₂R agonistával kezeljük olyan időtartamig és olyan koncentrációban, amely kontroll sejtekben a CRF₂R deszenzitizálását okozza; majd

- c) meghatározzuk a CRF₂R aktiválás szintjét; és

- d) vázizom-tömeg vagy -funkció szabályozására szolgáló vegyület-jelöltként azonosítjuk azokat a teszt vegyületeket, amelyek fenntartják vagy felerősítik egy CRF₂R vagy egy CRF₂R szignál transzdukciós reakcióút agonista-indukált aktiválását.

19. Eljárás terápiás vegyület-jelöltek azonosítására egy vagy több vegyület-jelöltből álló csoportból, amelyekről a korábbiakban megállapításra került, hogy fenntartják vagy felerősítik egy CRF₂R vagy egy CRF₂R szignál transzdukciós reakcióút agonista-indukált aktiválását, azzal jellemezve, hogy:

- a) a vegyület-jelöltet egy CRF₂R agonistával együtt beadjuk egy nem-humán állatnak; és

- b) meghatározzuk, hogy a vegyület-jelölt szabályozza-e a váz-izom-tömeget vagy funkciót a kezelt állatban.



20. Eljárás CRF₂R vagy CRF expresszió fokozására szolgáló vegyület-jelöltek azonosítására, azzal jellemezve, hogy:

a) egy vizsgált vegyületet érintkeztetünk egy CRF₂R szabályozó elemmel vagy egy CRF szabályozó elemmel működőképesen összekapcsolt riporter gént tartalmazó sejttel vagy sejt lizátummal;

b) detektáljuk a riporter gén expresszióját; és

c) vázizom-tömeg vagy -funkció szabályozására szolgáló vegyület-jelöltként azonosítjuk azokat a teszt vegyületeket, amelyek fokozzák a riporter gén expresszióját.

21. Eljárás vázizom-tömeg vagy -funkció növelésére egy azt igénylő alanyban, azzal jellemezve, hogy:

a) azonosítunk egy alanyt, amely számára vázizom-tömeg vagy -funkció növelése kívánatos; és

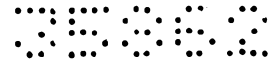
b) beadjuk az alanynak egy CRF₂R agonista biztonságos és hatékony mennyiségét.

22. Eljárás vázizom atrófia kezelésére egy arra rászoruló alanynál, azzal jellemezve, hogy:

a) azonosítunk egy vázizom atrófia következtében kezelésre szoruló alanyt; és

b) egy CRF₂R agonistát, egy működőképes CRF₂R-t kódoló expressziós vektort, egy konstitutívan aktív CRF₂R-t kódoló expressziós vektort, egy CRF-t kódoló expressziós vektort és egy CRF₂R vagy CRF expressziót növelő vegyületet tartalmazó csoportból választott vegyület biztonságos és hatékony mennyiségét beadjuk az alanyba.

23. A 22. igénypont szerinti eljárás vázizom atrófia kezelésére, azzal jellemezve, hogy a vegyület egy CRF₂R agonista.



24. A 23. igénypont szerinti eljárás vázizom atrófia kezelésére, azzal jellemezve, hogy a CRF₂R agonistát egy vázizom-tömeg vagy -funkció szabályozására szolgáló vegyület-jelöltek azonosítására szolgáló eljárással azonosítjuk, amely során:

- a) egy teszt vegyületet érintkeztetünk egy CRF₂R-rel;
- b) meghatározzuk, hogy a vizsgált vegyület aktiválja-e a CRF₂R-t; és
- c) a CRF₂R-t aktiváló teszt vegyületeket vázizom-tömeg vagy -funkció szabályozására szolgáló vegyület-jelöltként azonosítjuk.

25. A 23. igénypont szerinti eljárás vázizom atrófia kezelésére, azzal jellemezve, hogy a CRF₂R agonista egy kiméra vagy humán antitest.

26. A 25. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a CRF₂R agonista szelektív CRF₂R-re a CRF₁R-hez képest.

27. A 26. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a CRF₂R agonista CRF₂R szelektivitása 100-szoros vagy még nagyobb.

28. A 23. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az alany izomdisztrófiában szenved, és a CRF₂R agonista 1-100-szoros szelektivitást mutat a CRF₂R-re.

29. A 23. igénypont szerinti eljárás vázizom atrófia kezelésére, azzal jellemezve, hogy magába foglalja ezen túl egy CRF₂R vagy egy CRF₂R szignál transzdukciós reakcióút agonista-indukált aktiválását fenntartó vagy felerősítő vegyület biztonságos és hatékony mennyiségének beadását az alanyba.

30. Egy CRF₂R-re specifikus tisztított antitest, azzal jellemezve, hogy az antitest egy kiméra vagy humán antitest.



31. A 30. igénypont szerinti antitest, azzal jellemezve, hogy az antitest egy CRF₂R agonistája.

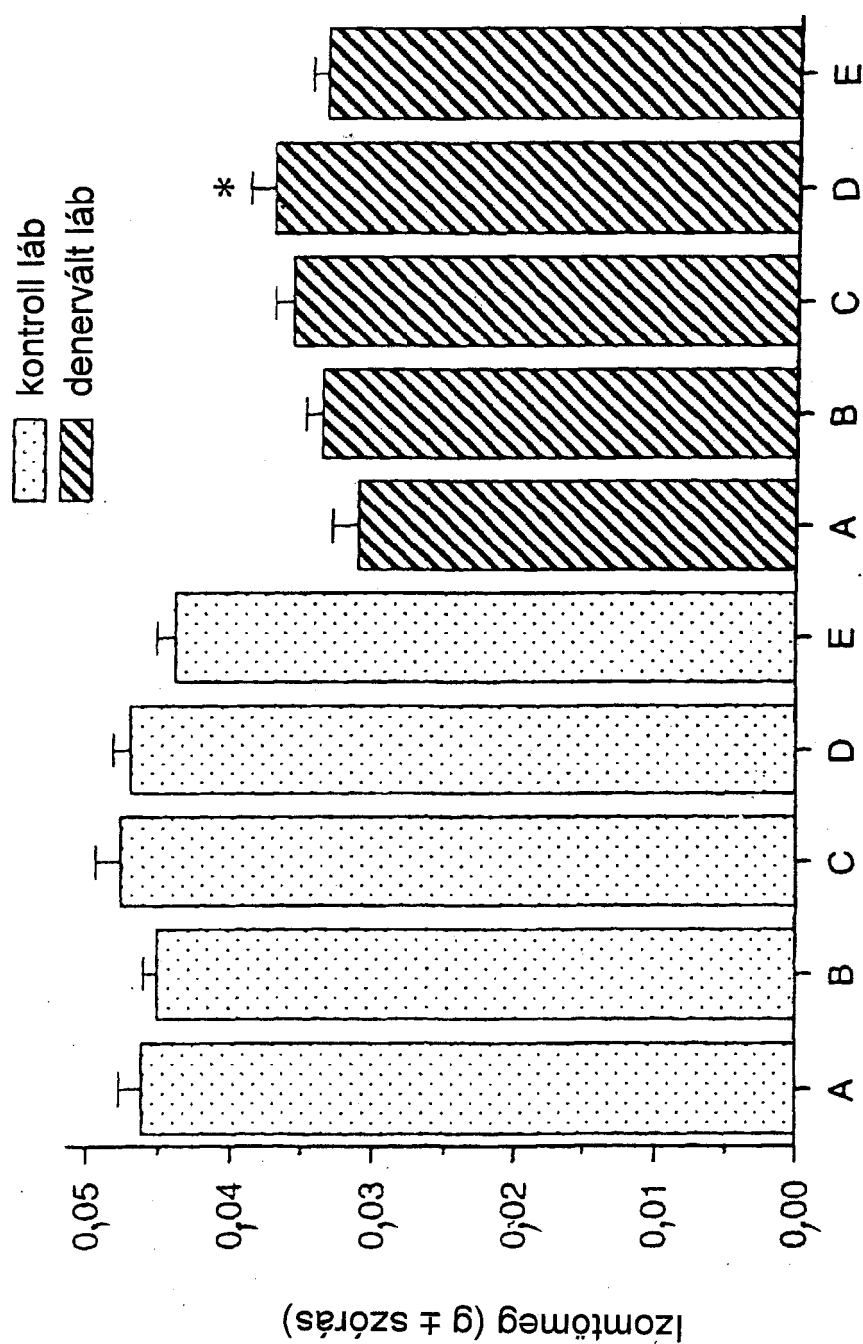
32. A 31. igénypont szerinti antitest, azzal jellemezve, hogy az antitest egy humán antitest.

33. Egy gyógyászati készítmény, amely magába foglalja:

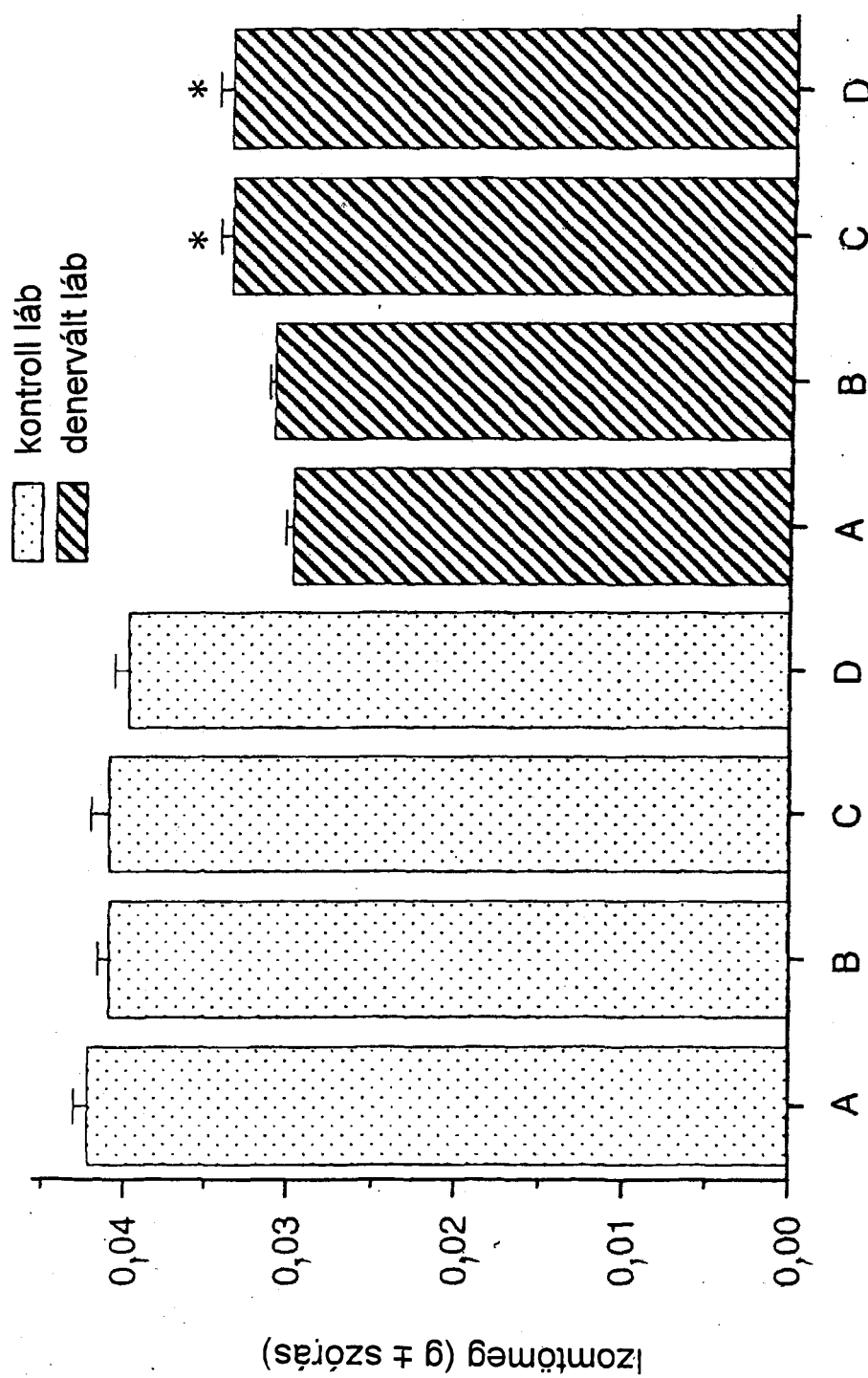
- a) egy CRF₂R agonista biztonságos és hatékony mennyiségét; és
- b) egy gyógyászatilag elfogadható hordozót.

34. A 33. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, azzal jellemezve, hogy a CRF₂R agonista egy CRF₂R-re specifikus kiméra vagy humán antitest.

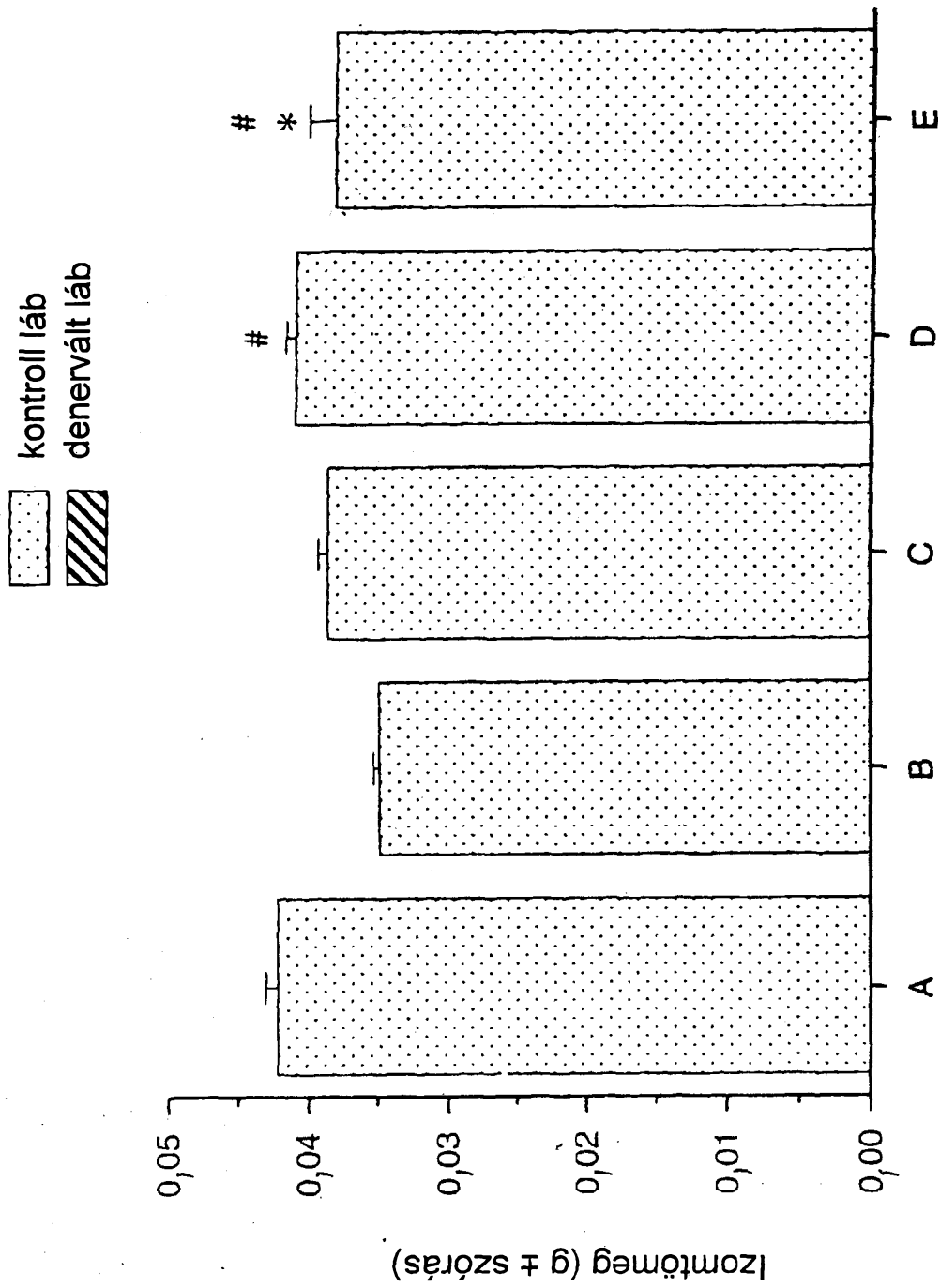
35. A 33. igénypont szerinti gyógyászati készítmény, azzal jellemezve, hogy a CRF₂R agonista az urokortin II.



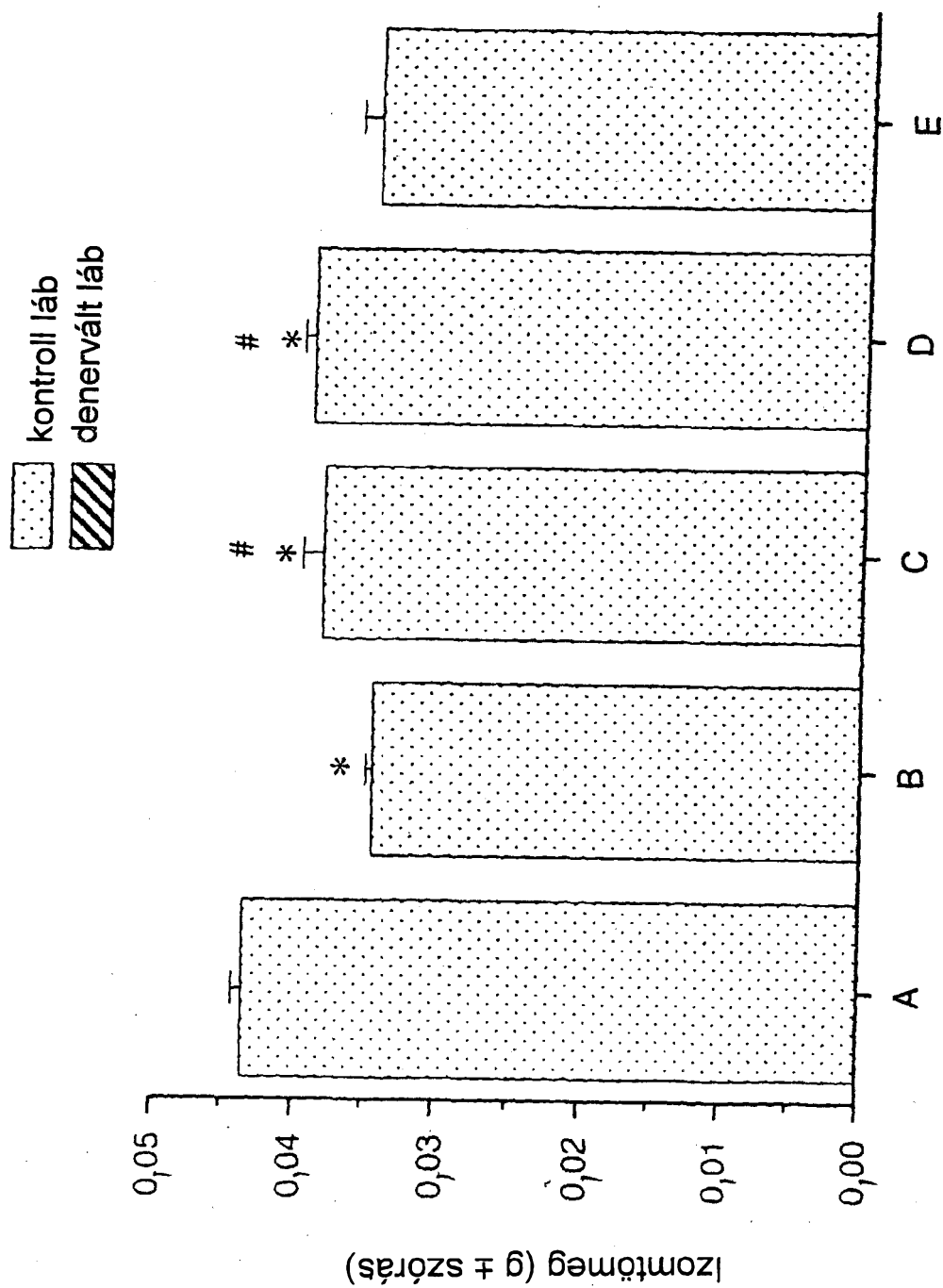
1. ábra



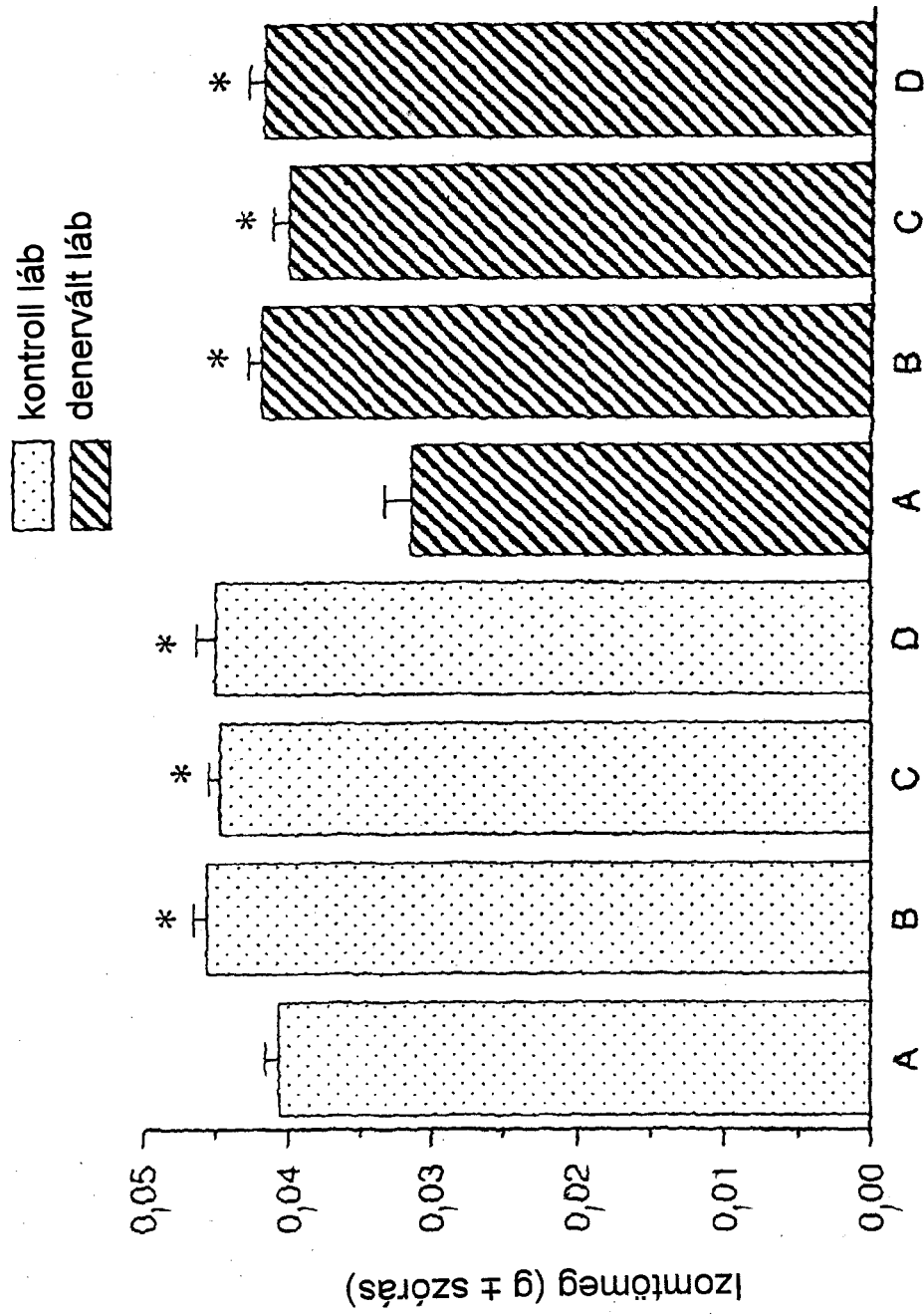
2. ábra



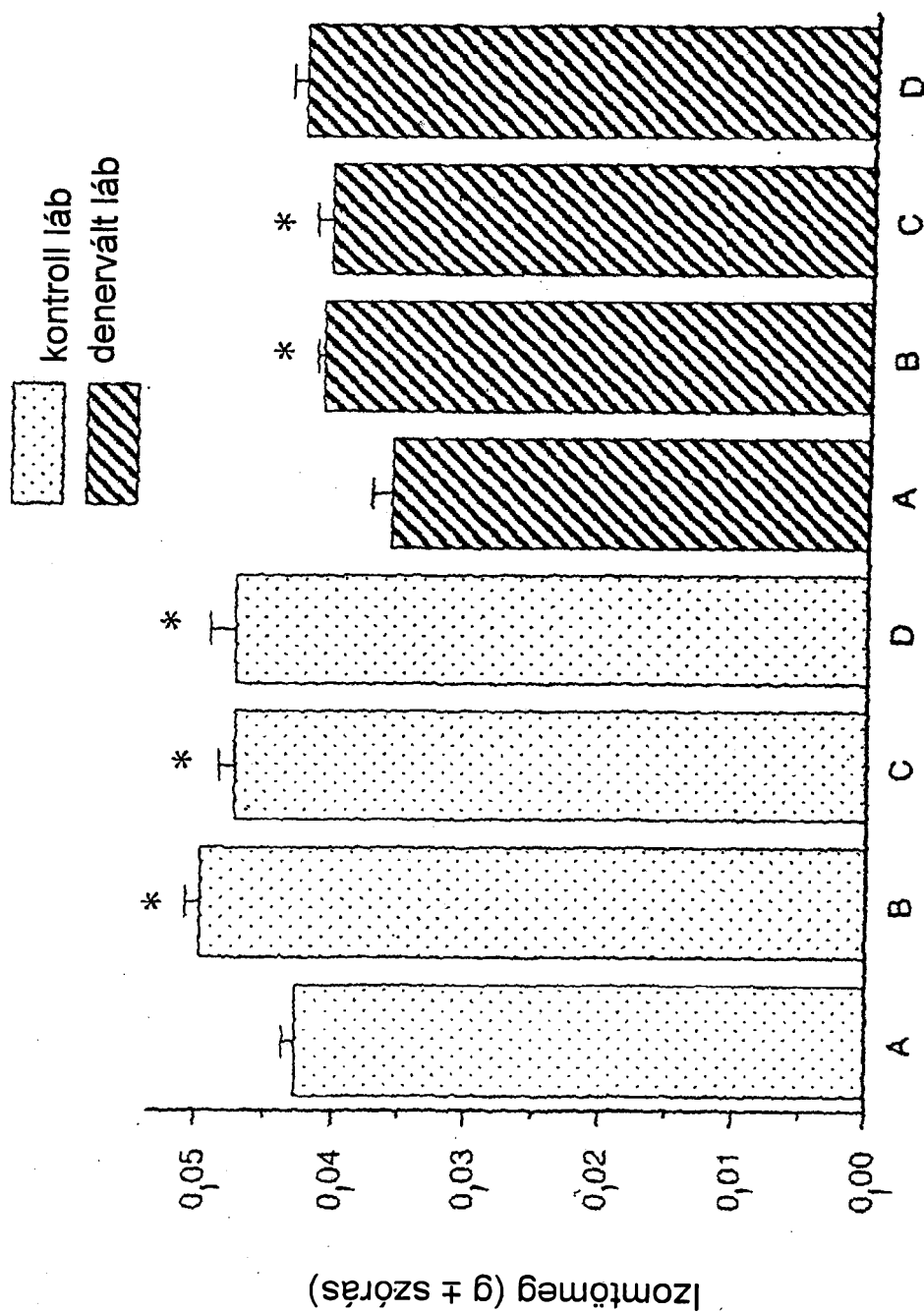
3A. ábra



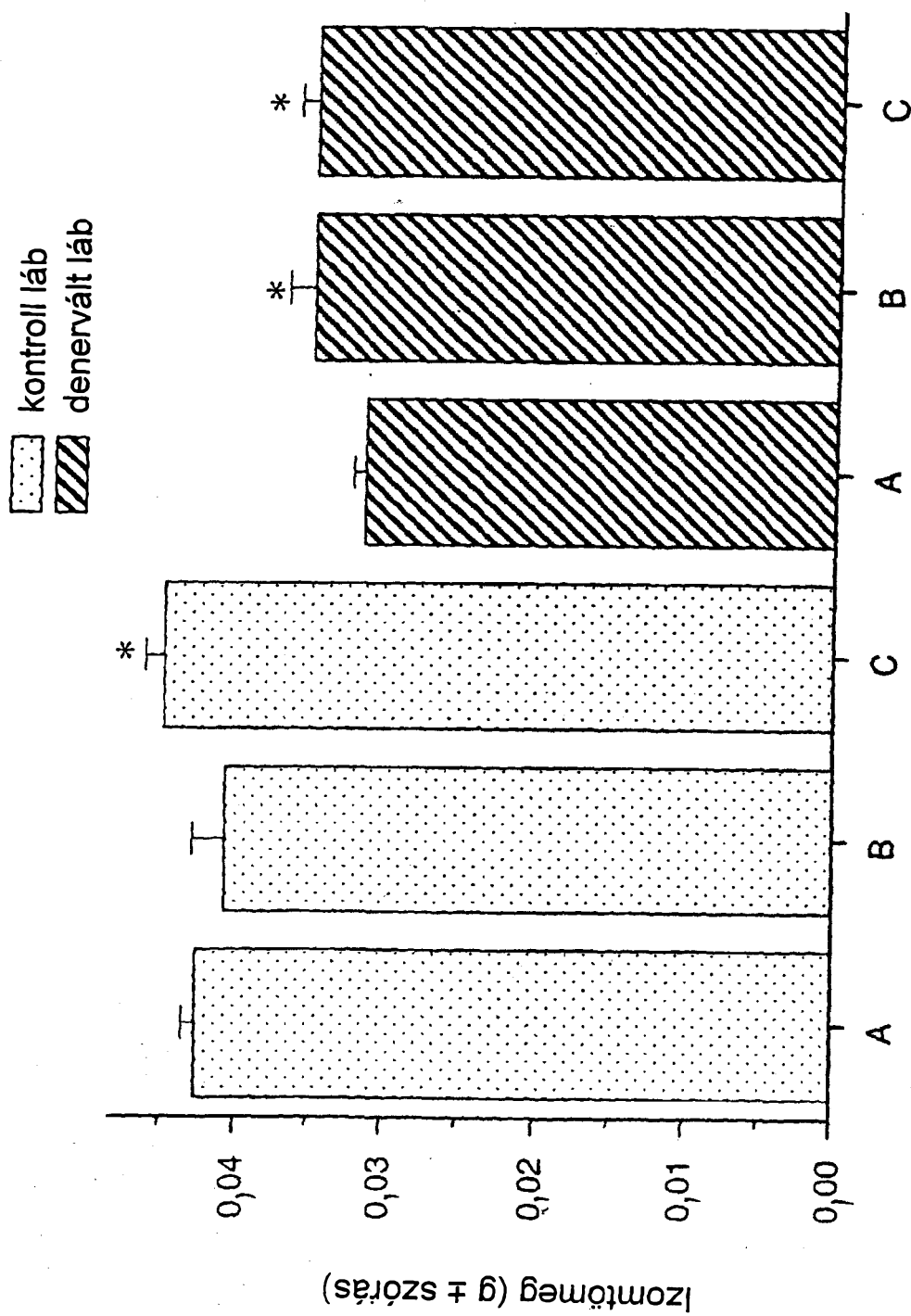
3B. ábra



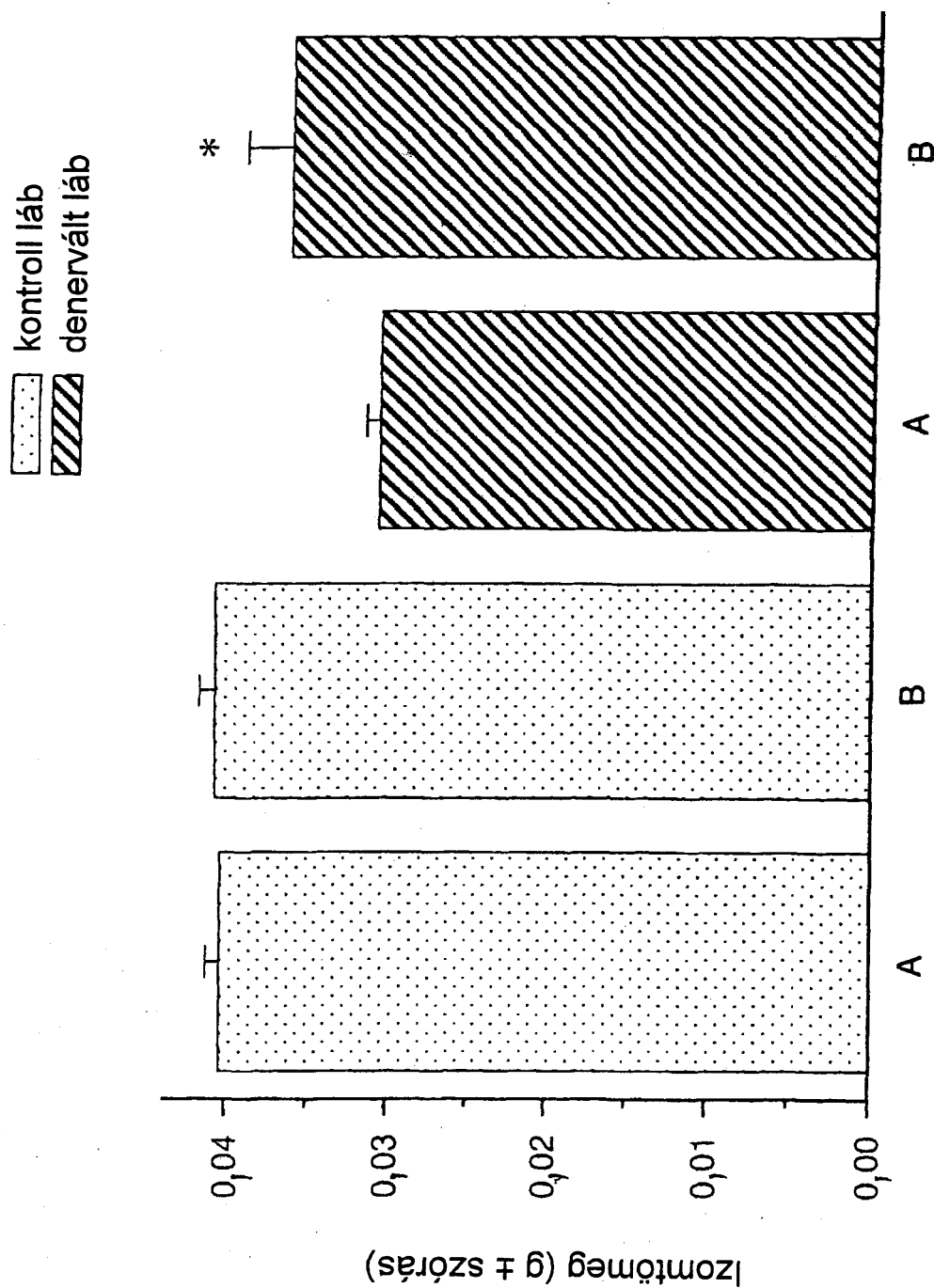
4A. ábra



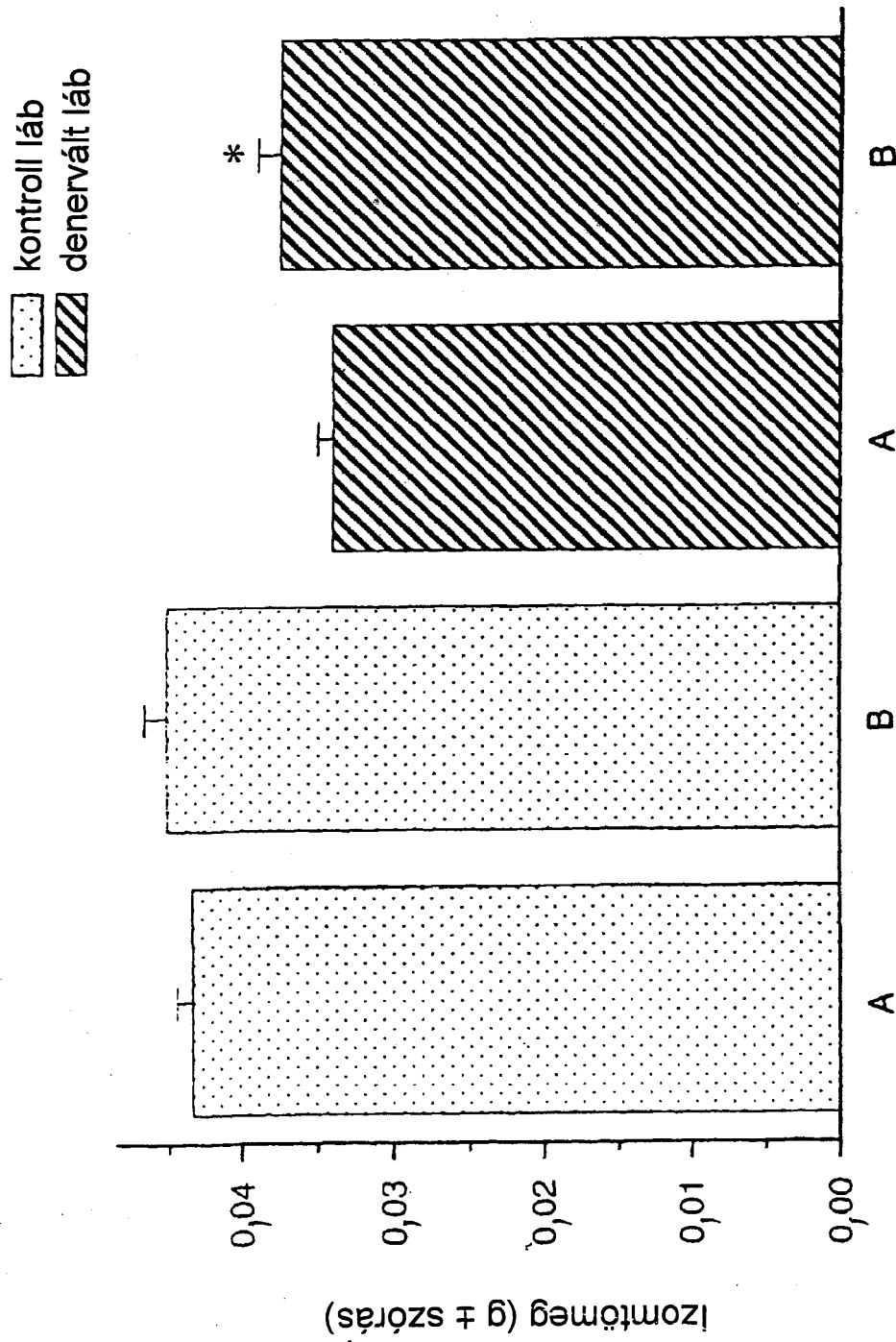
4B. ábra



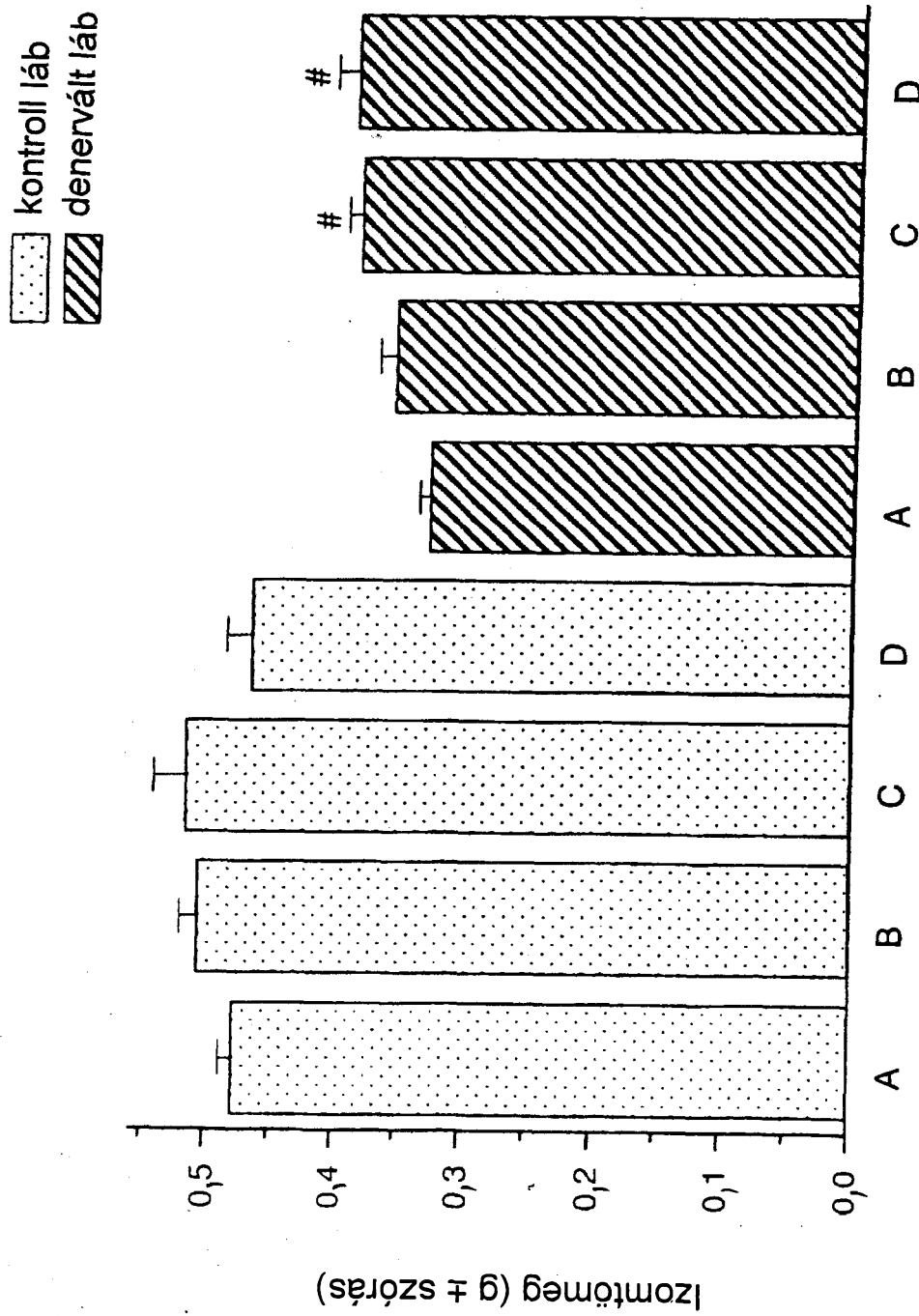
5. ábra



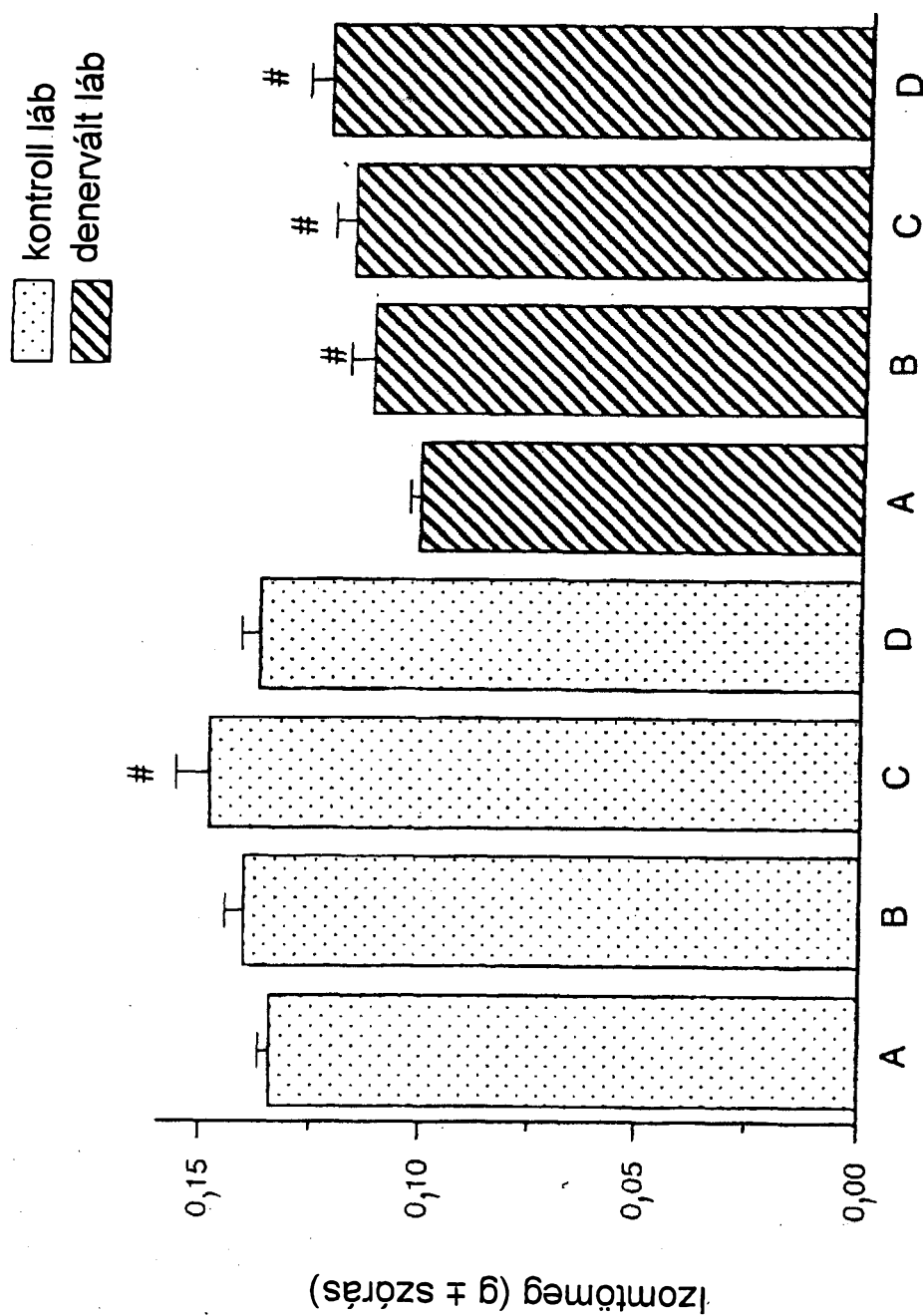
6A. ábra



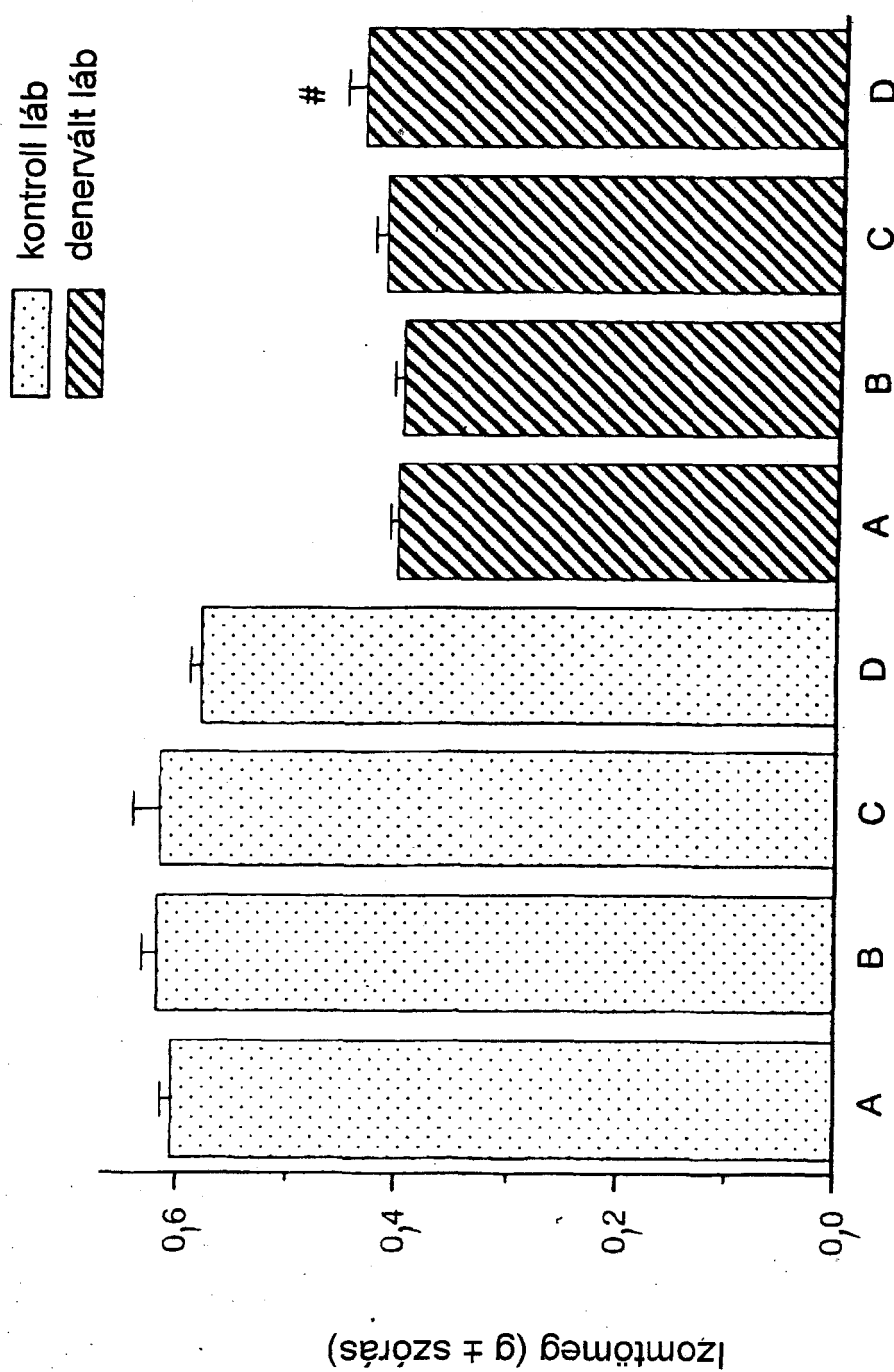
6B. ábra



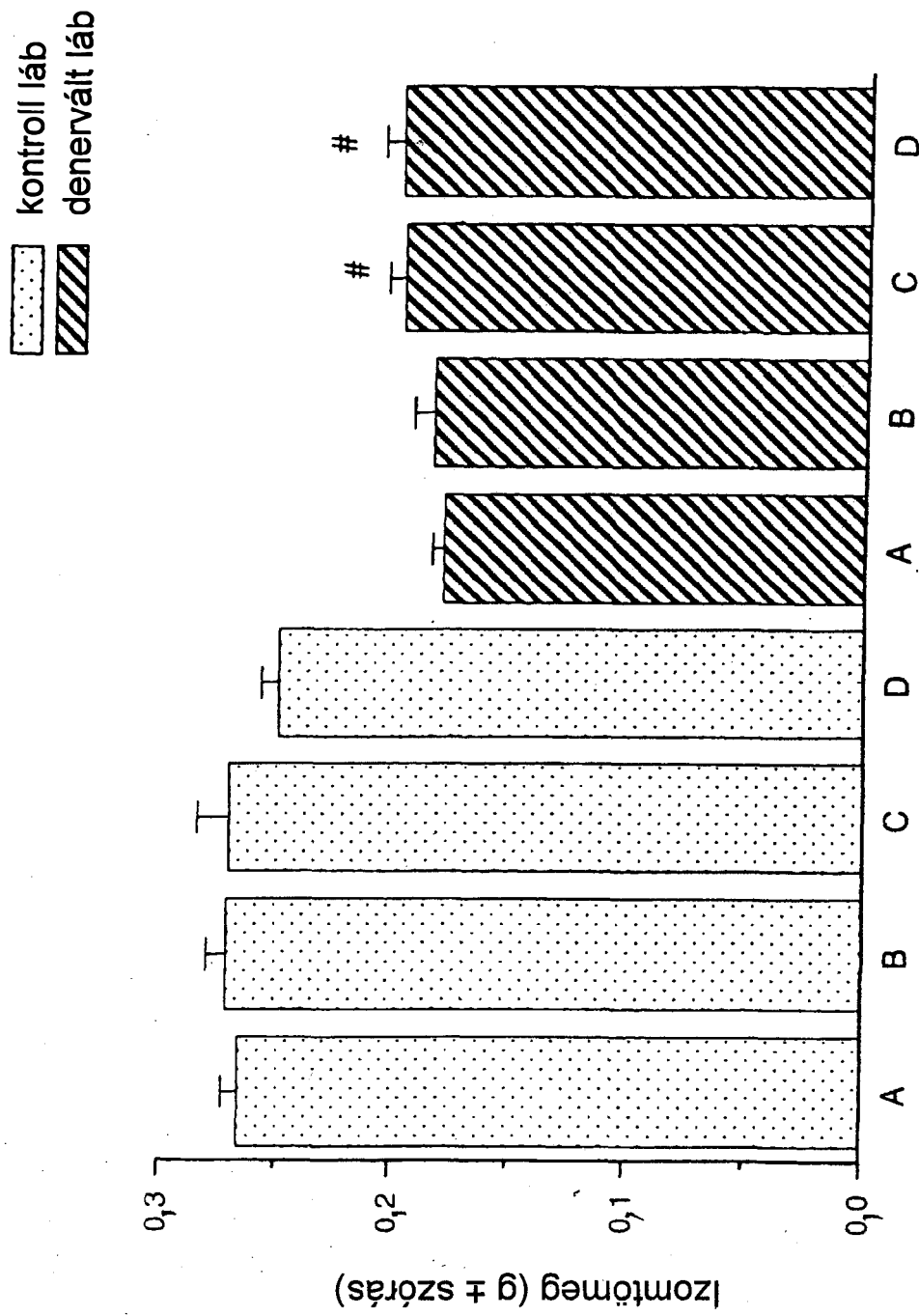
7A. ábra



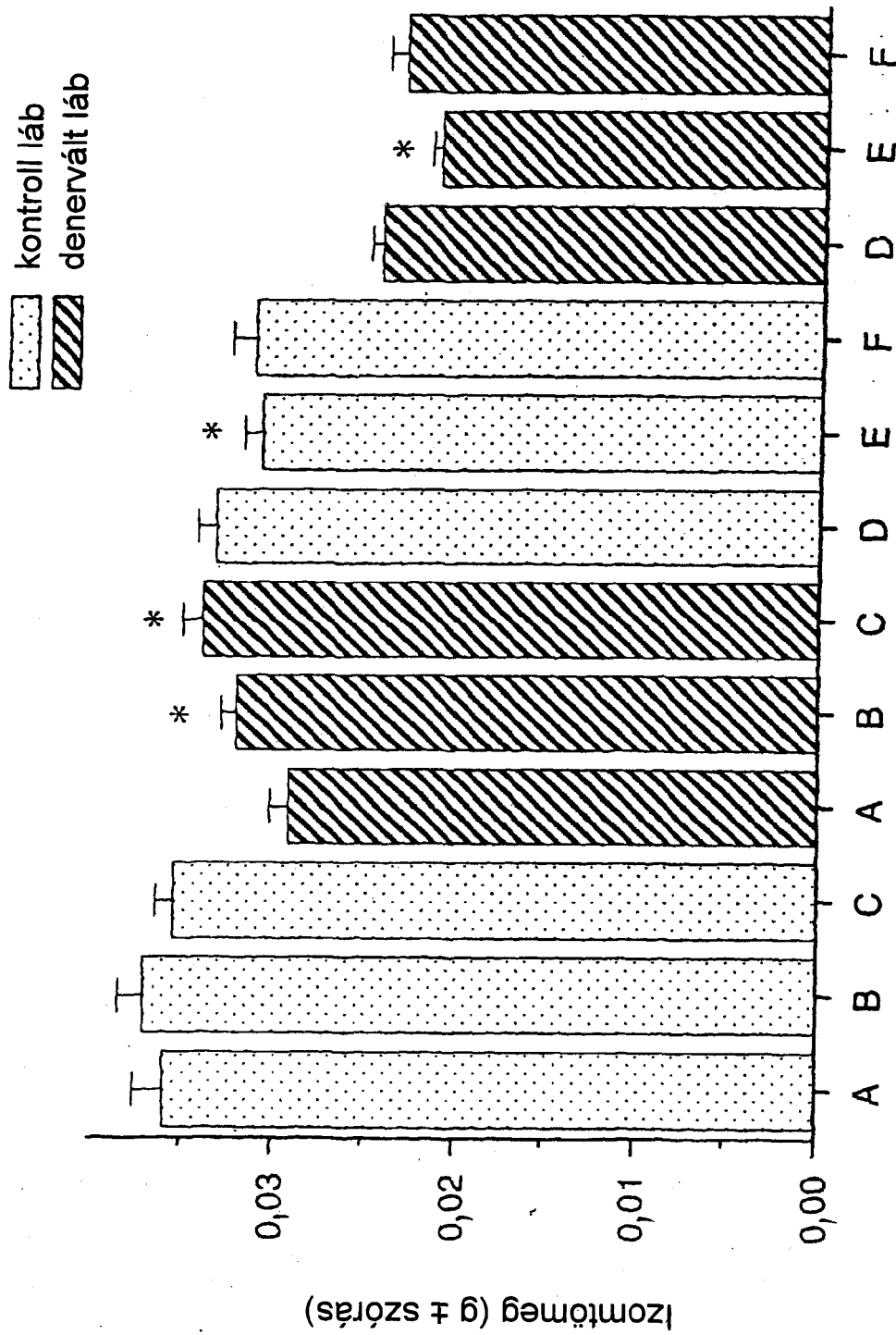
7B. ábra



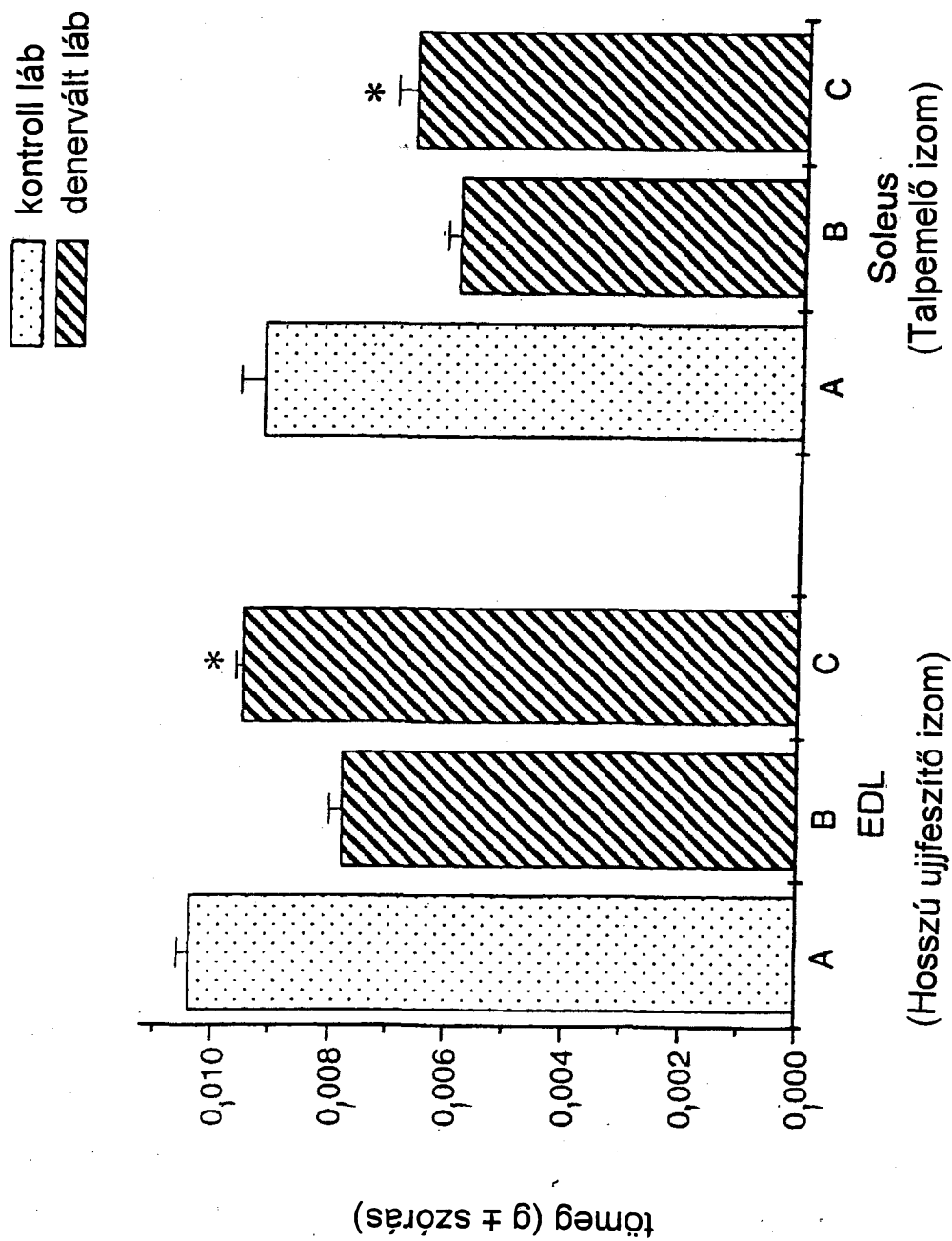
7C. ábra



7D. ábra



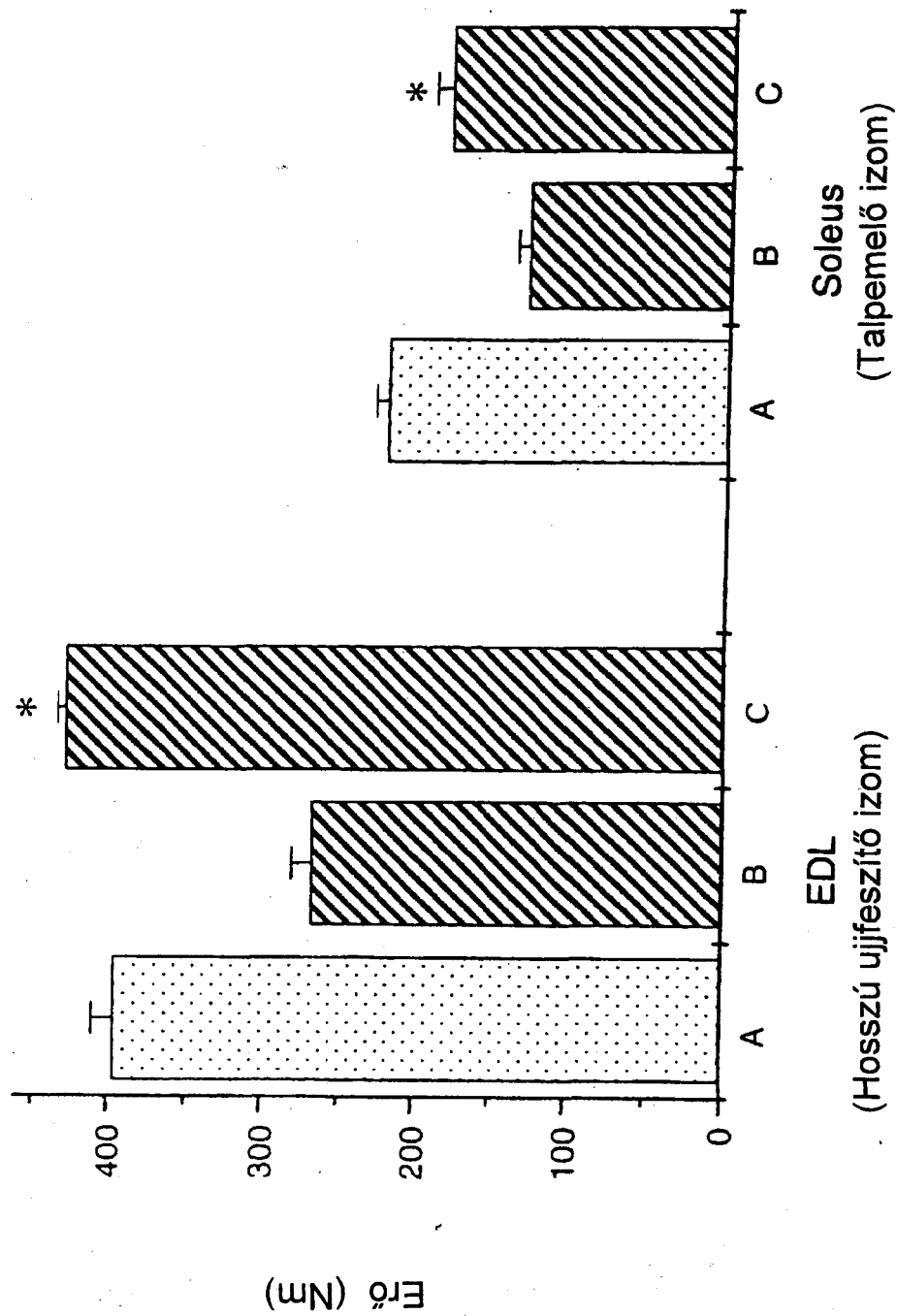
8. ábra



9A. ábra



kontroll láb
gipszelt láb



9B. ábra

(SZEKVENCIÁK JEGYZÉKE)
SEQUENCE LISTING



Sheldon, Russell

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

<130> 8448

<160> 44

<170> PatentIn version 3.0

 $\langle 210 \rangle$ 1

<211> 2536

<212> DNA

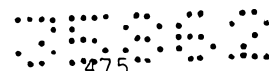
<213> homo sapiens

 $\langle 220 \rangle$

<221> CDS

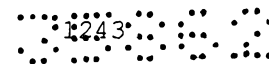
<222> (227) .. (1474)

[illegible]



tgc cct gcc ttt ttc tat ggt gtc cgc tac aat acc aca aac aat ggc Cys Pro Ala Phe Phe Tyr Gly Val Arg Tyr Asn Thr Thr Asn Asn Gly 70 75 80	475
tac cgg gag tgc ctg gcc aat ggc agc tgg gcc gcc cgc gtg aat tac Tyr Arg Glu Cys Leu Ala Asn Gly Ser Trp Ala Ala Arg Val Asn Tyr 85 90 95	523
tcc gag tgc cag gag atc ctc aat gag gag aaa aaa agc aag gtg cac Ser Glu Cys Gln Glu Ile Leu Asn Glu Glu Lys Lys Ser Lys Val His 100 105 110 115	571
tac cat gtc gca gtc atc atc aac tac ctg ggc cac tgt atc tcc ctg Tyr His Val Ala Val Ile Ile Asn Tyr Leu Gly His Cys Ile Ser Leu 120 125 130	619
gtg gcc ctc ctg gtg gcc ttt gtc ctc ttt ctg cgg ctc agg agc atc Val Ala Leu Leu Val Ala Phe Val Leu Phe Leu Arg Leu Arg Ser Ile 135 140 145	667
cgg tgc ctg cga aac atc atc cac tgg aac ctc atc tcc gcc ttc atc Arg Cys Leu Arg Asn Ile Ile His Trp Asn Leu Ile Ser Ala Phe Ile 150 155 160	715
ctg cgc aac gcc acc tgg ttc gtg gtc cag cta acc atg agc ccc gag Leu Arg Asn Ala Thr Trp Phe Val Val Gln Leu Thr Met Ser Pro Glu 165 170 175	763
gtc cac cag agc aac gtg ggc tgg tgc agg ttg gtg aca gcc gcc tac Val His Gln Ser Asn Val Gly Trp Cys Arg Leu Val Thr Ala Ala Tyr 180 185 190 195	811
aac tac ttc cat gtg acc aac ttc ttc tgg atg ttc ggc gag ggc tgc Asn Tyr Phe His Val Thr Asn Phe Phe Trp Met Phe Gly Glu Gly Cys 200 205 210	859
tac ctg cac aca gcc atc gtg ctc acc tac tcc act gac cgg ctg cgc Tyr Leu His Thr Ala Ile Val Leu Thr Tyr Ser Thr Asp Arg Leu Arg 215 220 225	907
aaa tgg atg ttc atc tgc att ggc tgg ggt gtg ccc ttc ccc atc att Lys Trp Met Phe Ile Cys Ile Gly Trp Gly Val Pro Phe Pro Ile Ile 230 235 240	955
gtg gcc tgg gcc att ggg aag ctg tac tac gac aat gag aag tgc tgg Val Ala Trp Ala Ile Gly Lys Leu Tyr Tyr Asp Asn Glu Lys Cys Trp 245 250 255	1003
ttt ggc aaa agg cct ggg gtg tac acc gac tac atc tac cag ggc ccc Phe Gly Lys Arg Pro Gly Val Tyr Thr Asp Tyr Ile Tyr Gln Gly Pro 260 265 270 275	1051
atg atc ctg gtc ctg ctg atc aat ttc atc ttc ctt ttc aac atc gtc Met Ile Leu Val Leu Leu Ile Asn Phe Ile Phe Leu Phe Asn Ile Val 280 285 290	1099
cgc atc ctc atg acc aag ctc cgg gca tcc acc acg tct gag acc att Arg Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser Glu Thr Ile 295 300 305	1147
cag tac agg aag gct gtg aaa gcc act ctg gtg ctg ctg ccc ctc ctg Gln Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu Pro Leu Leu 310 315 320	1195

ggc atc acc tac atg ctg ttc ttc gtc aat ccc ggg gag gat gag gtc
 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 ggggccgctc tccccctgca gccgtgcagg actctagctc atgagtggaa 1664

agtcacctac aggactgggc cggggccagg gcctctggct tcctgcca atcctccctg 1724

gagaagggac atgggaatga attgaaatgg ggcgtggac acctacagca gcacgcatgt 1784

ccctccaagg ctgtcttctc ccagagcaca agaaggccag cccactgggc cctggggctg 1844

ccctcgga cgtggggag gccatttgct gccctggggc atcatgggca actcgtgaca 1904

gcctctgact caccacgatg acgcctctgg acctcggtga tgccctccga caccactggg 1964

aaccaagggc cctcactcag gaacctgga gacagaagtc aggtgtcatc atcagacttg 2024

cggccacagc actagagtca cccccccagg cctccagaac ctactggca ctgtggcact 2084

gccaccagca atgccctgcc ttgctgcctt caccctgaac atttagtacc ctgcaggcca 2144

ggccagcttc ccctcactta accaccccat accagtcacc tcctgctcct ttccctcttt 2204

tgtgagaaga tgggggctgg agggggcaga gtggcctgtg agcaagagcc aggggtgtcc 2264

cagtccagc ctctggggca gagcttgtag cctggatgg cctctggggc aggaccacta 2324

gctaagcaag ccaggagaag acccctgccc aagtggctct tgggacaacg tgctgcttac 2384

actccaggtg tggaccggcc gcagccccc ctgacctgcc catgtccaga gggactggac 2444

agccagggca gggctttggg gggcactaga agatgagggg gtcggctgtg aggcgggtgg 2504

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

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)

<400> 3
cccgggcatt caggacggta gccgagcgcgag cccgagg atg gga ggg cac ccg cag 55
Met Gly Gly His Pro Gln
1 5

ctc cgt ctc gtc aag gcc ctt ctc ctt ctg ggg ctg aac ccc gtc tct 103
Leu Arg Leu Val Lys Ala Leu Leu Leu Gly Leu Asn Pro Val Ser
10 15 20

gcc tcc ctc cag gac cag cac tgc gag agc ctg tcc ctg gcc agc aac 151
Ala Ser Leu Gln Asp Gln His Cys Glu Ser Leu Ser Leu Ala Ser Asn
25 30 35

atc tca gga ctg cag tgc aac gca tcc gtg gac ctc att ggc acc tgc 199
Ile Ser Gly Leu Gln Cys Asn Ala Ser Val Asp Leu Ile Gly Thr Cys
40 45 50

tgg ccc cgc agc cct gcg ggg cag cta gtg gtt cgg ccc tgc cct gcc 247
Trp Pro Arg Ser Pro Ala Gly Gln Leu Val Val Arg Pro Cys Pro Ala
55 60 65 70

ttt ttc tat ggt gtc cgc tac aat acc aca aac aat ggc tac cgg gag 295
Phe Phe Tyr Gly Val Arg Tyr Asn Thr Thr Asn Asn Gly Tyr Arg Glu
75 80 85

tgc ctg gcc aat ggc agc tgg gcc gcc cgc gtg aat tac tcc gag tgc 343
Cys Leu Ala Asn Gly Ser Trp Ala Ala Arg Val Asn Tyr Ser Glu Cys
90 95 100



cag gag atc ctc aat gag gag aaa aaa agc aag gtg cac tac cat gtc Gln Glu Ile Leu Asn Glu Glu Lys Lys Ser Lys Val His Tyr His Val 105 110 115	391
gca gtc atc atc aac tac ctg ggc cac tgt atc tcc ctg gtg gcc ctc Ala Val Ile Ile Asn Tyr Leu Gly His Cys Ile Ser Leu Val Ala Leu 120 125 130	439
ctg gtg gcc ttt gtc ctc ttt ctg cgg ctc agg agc atc cgg tgc ctg Leu Val Ala Phe Val Leu Phe Leu Arg Leu Arg Ser Ile Arg Cys Leu 135 140 145 150	487
cga aac atc atc cac tgg aac ctc atc tcc gcc ttc atc ctg cgc aac Arg Asn Ile Ile His Trp Asn Leu Ile Ser Ala Phe Ile Leu Arg Asn 155 160 165	535
gcc acc tgg ttc gtg gtc cag cta acc atg agc ccc gag gtc cac cag Ala Thr Trp Phe Val Val Gln Leu Thr Met Ser Pro Glu Val His Gln 170 175 180	583
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

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
180 185 190

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

3835

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> 5

<211> 1146

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (19)..(1146)

<400> 5

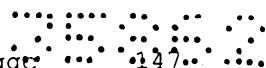
agccgagcga gcccgagg atg gga ggg cac ccg cag ctc cgt ctc gtc aag
Met Gly Gly His Pro Gln Leu Arg Leu Val Lys
1 5 10

51

gcc ott ctc ott ctg ggg ctg aac ccc gtc tct gcc tcc ctc cag gac
Ala Leu Leu Leu Leu Gly Leu Asn Pro Val Ser Ala Ser Leu Gln Asp
15 20 25

99

cag cac tgc gag agc ctg tcc ctg gcc agc aac atc tca gac aat ggc
 Gln His Cys Glu Ser Leu Ser Leu Ala Ser Asn Ile Ser Asp Asn Gly
 30 35 40



tac cgg gag tgc ctg gcc aat ggc agc tgg gcc gcc cgc gtg aat tac
 Tyr Arg Glu Cys Leu Ala Asn Gly Ser Trp Ala Ala Arg Val Asn Tyr
 45 50 55 195

tcc gag tgc cag gag atc ctc aat gag gag aaa aaa agc aag gtg cac
 Ser Glu Cys Gln Glu Ile Leu Asn Glu Glu Lys Lys Ser Lys Val His
 60 65 70 75 243

tac cat gtc gca gtc atc atc aac tac ctg ggc cac tgt atc tcc ctg
 Tyr His Val Ala Val Ile Ile Asn Tyr Leu Gly His Cys Ile Ser Leu
 80 85 90 291

gtg gcc ctc ctg gtg gcc ttt gtc ctc ttt ctg cgg ctc agg agc atc
 Val Ala Leu Leu Val Ala Phe Val Leu Phe Leu Arg Leu Arg Ser Ile
 95 100 105 339

cgg tgc ctg cga aac atc atc cac tgg aac ctc atc tcc gcc ttc atc
 Arg Cys Leu Arg Asn Ile Ile His Trp Asn Leu Ile Ser Ala Phe Ile
 110 115 120 387

ctg cgc aac gcc acc tgg ttc gtg gtc cag cta acc atg agc ccc gag
 Leu Arg Asn Ala Thr Trp Phe Val Val Gln Leu Thr Met Ser Pro Glu
 125 130 135 435

gtc cac cag agc aac gtg ggc tgg tgc agg ttg gtg aca gcc gcc tac
 Val His Gln Ser Asn Val Gly Trp Cys Arg Leu Val Thr Ala Ala Tyr
 140 145 150 155 483

aac tac ttc cat gtg acc aac ttc ttc tgg atg ttc ggc gag ggc tgc
 Asn Tyr Phe His Val Thr Asn Phe Phe Trp Met Phe Gly Glu Gly Cys
 160 165 170 531

tac ctg cac aca gcc atc gtg ctc acc tac tcc act gac cgg ctg cgc
 Tyr Leu His Thr Ala Ile Val Leu Thr Tyr Ser Thr Asp Arg Leu Arg
 175 180 185 579

aaa tgg atg ttc atc tgc att ggc tgg ggt gtg ccc ttc ccc atc att
 Lys Trp Met Phe Ile Cys Ile Gly Trp Gly Val Pro Phe Pro Ile Ile
 190 195 200 627

gtg gcc tgg gcc att ggg aag ctg tac tac gac aat gag aag tgc tgg
 Val Ala Trp Ala Ile Gly Lys Leu Tyr Tyr Asp Asn Glu Lys Cys Trp
 205 210 215 675

ttt ggc aaa agg cct ggg gtg tac acc gac tac atc tac cag ggc ccc
 Phe Gly Lys Arg Pro Gly Val Tyr Thr Asp Tyr Ile Tyr Gln Gly Pro
 220 225 230 235 723

atg atc ctg gtc ctg ctg atc aat ttc atc ttc ctt ttc aac atc gtc
 Met Ile Leu Val Leu Leu Ile Asn Phe Ile Phe Leu Phe Asn Ile Val
 240 245 250 771

cgc atc ctc atg acc aag ctc cgg gca tcc acc acg tct gag acc att
 Arg Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser Glu Thr Ile
 255 260 265 819

cag tac agg aag gct gtg aaa gcc act ctg gtg ctg ctg ccc ctc ctg
 Gln Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu Pro Leu Leu
 270 275 280 867

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

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

ctg tcc ctg gcc agc aac atc tca gga ctg cag tgc aac gca tcc gtg
 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
 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 ggt gtc cgc tac aat acc aca
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 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 ggt gtg ccc ttc
 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
 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 acc gac tac atc tac
 Lys Cys Trp Phe Gly Lys Arg Pro Gly Val Tyr Thr Asp Tyr Ile Tyr
 260 265 270



144

192

240

288

336

384

432

480

528

576

624

672

720

768

816

cag ggc ccc atg atc ctg gtc ctg ctg atc aat ttc atc ttc ctt ttc 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

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
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			

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	cgg	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	ggc	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
 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 ott 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

gccacactgc acagctcccc tgtcctcctc caccttcttc ctctgggttc tctgtgctgg 1306

gcaggctctc gtggggcagg agatgggagg ggagagacca gctctccagc ctggcaggaa 1366

agaggggggtg cggcagccaa gggggactgc aaggacaggg gatgagtggg ggccaccagg 1426

ctcagcgcaa gaggaagcag agggaattca caggaccccc tgagaagagc cagtccagatg 1486

tctgcaggca tttgcccatc ccagcctctc tggccagggc cttactgggc ccagagcaga 1546

gaaggacctg tccaacacac acagctatct atagtagcag acacagggct cccctgcctt 1606

actcatggag ccagcagcca ggcaatgggtg tggccctgca ctggcccttg gactccacac 1666

tcagtgggtgc cctgcagttg ggtgggttaa cgccaagcaa aggatcagtt tggctgctt 1726
atcccagggc tgtcacctag agaggctcac ttgtacccca ccctgttctt gtgtccctc 1786
cccagccatc ctccccgctt tgggggctcc atgaaggatg caggcttcca ggcctggctt 1846
cctctcttgg gagaccctt ctctgcctag tccacagatt aggcaatcaa ggaagacgcc 1906
atcaggggaag ccacatcctt agtcaaccag ttgcatcgtg cggggcaaaa tgaggagcag 1966
aggcatggag gagggaggcg tgggatggga atagcagaac caccatgtct tcagtgattg 2026
aaactcatac ccattgccc ttgcccctcc agtctcccct 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	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
 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

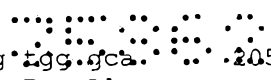
<222> (71)..(1387)

<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	
atc gcc ctt gtc gtc aac tac ctg ggc cac tgc gta tct gtg gca gcc	541
Ile Ala Leu Val Val Asn Tyr Leu Gly His Cys Val Ser Val Ala Ala	
145 150 155	
ctg gtg gcc gcc ttc ctg ctt ttc ctg gcc ctg cgg agc att cgc tgt	589
Leu Val Ala Ala Phe Leu Leu Phe Leu Ala Leu Arg Ser Ile Arg Cys	
160 165 170	
ctg cgg aat gtg att cac tgg aac ctc atc acc acc ttt atc ctg cga	637
Leu Arg Asn Val Ile His Trp Asn Leu Ile Thr Thr Phe Ile Leu Arg	
175 180 185	
aat gtc atg tgg ttc ctg ctg cag ctc gtt gac cat gaa gtg cac gag	685
Asn Val Met Trp Phe Leu Leu Gln Leu Val Asp His Glu Val His Glu	
190 195 200 205	
agc aat gag gtc tgg tgc cgc tgc atc acc acc atc ttc aac tac ttc	733
Ser Asn Glu Val Trp Cys Arg Cys Ile Thr Thr Ile Phe Asn Tyr Phe	
210 215 220	
gtg gtg acc aac ttc ttc tgg atg ttt gtg gaa ggc tgc tac ctg cac	781
Val Val Thr Asn Phe Phe Trp Met Phe Val Glu Gly Cys Tyr Leu His	
225 230 235	
acg gcc att gtc atg acc tac tcc act gag cgc ctg cgc aag tgc ctc	829
Thr Ala Ile Val Met Thr Tyr Ser Thr Glu Arg Leu Arg Lys Cys Leu	
240 245 250	
ttc ctc ttc atc gga tgg tgc atc ccc ttc ccc atc atc gtc gcc tgg	877
Phe Leu Phe Ile Gly Trp Cys Ile Pro Phe Pro Ile Ile Val Ala Trp	
255 260 265	
gcc atc gcc aag ctc tac tat gag aat gaa cag tgc tgg ttt ggc aag	925
Ala Ile Gly Lys Leu Tyr Tyr Glu Asn Glu Gln Cys Trp Phe Gly Lys	
270 275 280 285	

gag cct ggc gac ctg gtg gac tac atc tac caa ggc ccc atc att ctc 973
 Glu Pro Gly Asp Leu Val Asp Tyr Ile Tyr Gln Gly Pro Ile Ile Leu ...
 290 295 300

gtg ctc ctg atc aat ttc gta ttt ctg ttc aac atc gtc agg atc cta 1021
 Val Leu Leu Ile Asn Phe Val Phe Leu Phe Asn Ile Val Arg Ile Leu
 305 310 315

atg aca aag tta cgc gcg tcc acc aca tcc gag aca atc cag tac agg 1069
 Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser Glu Thr Ile Gln Tyr Arg
 320 325 330

aag gca gtg aag gcc acc ctg gtg ctc ctg ccc ctc ctg ggc atc acc 1117
 Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu Pro Leu Leu Gly Ile Thr
 335 340 345

tac atg ctc ttc ttc gtc aat ccc ggg gag gac gac ctg tca cag atc 1165
 Tyr Met Leu Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu Asp Asp Leu Ser Gln Ile
 350 355 360 365

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 cccctcggtc gccacactgc 1407
 His Ser Ile Lys Gln Thr Ala Ala Val
 430 435

acagctcccc tgtcctcctc caccttcttc ctctgggttc totgtgetgg gcaggctctc 1467
 gtggggcagg agatgggagg ggagagacca gctctccagc ctggcaggaa agaggggggtg 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
 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

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 taccttggct tccccagtg ctgagattat ggggtgtgagc	60
cactgcacct ggccaagaat ccgaatggat tcaaagatac cttgaaataa ttcttcaatg	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
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	

556

gcc ttc ctg ctt ttc ctg gcc ctg cgg agc att cgc tgt ctg	agg 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		
	250 255 260	
atc aat ttc gta ttt ctg ttc aac atc gtc agg atc cta atg aca aag		988
Ile Asn Phe Val Phe Leu Phe Asn Ile Val Arg Ile Leu Met Thr Lys		
	265 270 275	
tta cgc gcg tcc acc aca tcc gag aca atc cag tac agg aag gca gtg		1036
Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser Glu Thr Ile Gln Tyr Arg Lys Ala Val		
	280 285 290 295	
aag gcc acc ctg gtg ctc ctg ccc ctc ctg ggc atc acc tac atg ctc		1084
Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu Pro Leu Leu Gly Ile Thr Tyr Met Leu		
	300 305 310	
ttc ttc gtc aat ccc ggg gag gac gac ctg tca cag atc atg ttc atc		1132
Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu Asp Asp Leu Ser Gln Ile Met Phe Ile		
	315 320 325	
tat ttc aac tcc ttc ctg cag tgc ttc cag ggt ttc ttc gtg tct gtc		1180
Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Gln Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ser Val		
	330 335 340	
ttc tac tgc ttc ttc aat gga gag gtg cgc tca gcc gtg agg aag agg		1228
Phe Tyr Cys Phe Phe Asn Gly Glu Val Arg Ser Ala Val Arg Lys Arg		
	345 350 355	
tgg cac cgc tgg cag gac cat cac tcc ctt cga gtc ccc atg gcc cgg		1276
Trp His Arg Trp Gln Asp His His Ser Leu Arg Val Pro Met Ala Arg		
	360 365 370 375	

gcc atg tcc atc cct aca tca ccc aca cgg atc agc ttc cac agc atc 1324
 Ala Met Ser Ile Pro Thr Ser Pro Thr Arg Ile Ser Phe His Ser Ile 1324
 380 385 390

aag cag acg gcc gct gtg tga cccctcggtc gccacactgc acagctcccc 1375
 Lys Gln Thr Ala Ala Val 1375
 395

tgtcctcctc caccttcttc ctctgggttc tctgtgctgg gcaggctctc gtggggcagg 1435

agatgggagg ggagagacca gctctccagc ctggcaggaa agaggggggtg cggcagccaa 1495

gggggactgc aagggaacagg 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

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
 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

agaccgcgacg cgccccgcct ccgctctggg atgtcgggagc gatccaggca tccaggacgc 60

tgacggagcg agccccgagg 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
 Ala Leu Leu Leu Leu Gly Leu Asn Pro Val Ser Thr Ser Leu Gln Asp
 15 20 25

208

cag cgc tgt gag aac ctg tcc ctg acc agc aat gtt tct ggc atg 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 ggt 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 ggt 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 ggt 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 ggt 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	
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 cgc 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
300 305 310 315

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
380 385 390 395

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
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

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

gcgggccctc atctccgtga gccccgaggc ttctcttggc caaggtccta ggagtgatcc 60

gattgagagc ggcgcccaaa agctgccggg ctggccgggg tgggcgggga ggcacctgga 120

cgctgcactc tctggtggct ccgcgtcgcg ccaggtccct cgcagccacg cggggcgcgcg 180

actcccactc ccaacgcgcg cggctccgga gcgca 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

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 tgc 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 cagcactcca 1481
 Gln Thr Ala Ala Val
 410

ccaccgagggc ggcttctctca ttcttcacag ccttccttgg gtctctcttg ctacactgac 1541
ccttgggtgc aggagaaggg ggggtggatg aactctcttg 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	
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
 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

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
 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 tgc 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 tcccctgtca 1349
 Ser Phe His Ser Ile Lys Gln Thr Ala Ala Val
 425 430

cccatctgcc cagcactcca ccaccgaggc ggcttctca ttcttcacag ccttccttg 1409
 gtcctccttg ctacactgac ccttgggtgc aggagaaggg ggggtggatg aactctcctg 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

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
 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)

<400> 21

tatccaggac gctgacagag cgagcccgag g atg gga cag cgc ccg cag ctc 52
Met Gly Gln Arg Pro Gln Leu
1 5

cgg ctc gtg aag gcc ctt ctc ctt ctg ggg ctg aac ccc gtc tcc acc 100
Arg Leu Val Lys Ala Leu Leu Leu Leu Gly Leu Asn Pro Val Ser Thr
10 15 20

tcc ctc cag gat cag cag tgt gag agc ctg tcc ctg gcc agc aat gtc 148
Ser Leu Gln Asp Gln Gln Cys Glu Ser Leu Ser Leu Ala Ser Asn Val
25 30 35

tct ggc ctg cag tgc aat gcc tcc gtg gac ctc att ggc acc tgc tgg 196
Ser Gly Leu Gln Cys Asn Ala Ser Val Asp Leu Ile Gly Thr Cys Trp
40 45 50 55

ccc agg agc cct gca ggg cag ttg gtg gtt cgg ccc tgc cct gcc ttt 244
Pro Arg Ser Pro Ala Gly Gln Leu Val Val Arg Pro Cys Pro Ala Phe
60 65 70

ttc tac ggt gtc cgc tac aac acc aca aac aat ggc tac cgg gaa tgc 292
Phe Tyr Gly Val Arg Tyr Asn Thr Thr Asn Asn Gly Tyr Arg Glu Cys
75 80 85

ctg gcc aac ggc agc tgg gca gcc cgt gtg aat tat tct gag tgc cag 340
Leu Ala Asn Gly Ser Trp Ala Ala Arg Val Asn Tyr Ser Glu Cys Gln
90 95 100

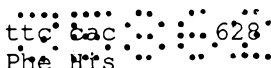
gag att ctc aac gaa gag aag aag agc aaa gtg cac tac cac att gcc 388
Glu Ile Leu Asn Glu Glu Lys Lys Ser Lys Val His Tyr His Ile Ala
105 110 115

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  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
 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 aagcctgcc agccgtggac 1419

aaagcccata gcactggggg gggcccttgg catctagctc cctgctgcc attctccctg 1479

ggaagttgaa atgggcattg ggggctggaa accctgcagc agtttgatgg gcctgtgagc 1539
gctgtcttct cccagagcag cttactgaag atctgtcgtc 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 ccaaatactc ccacctctgg gtatcttcta 1959
acctgtgaga agatgggggt cggaagggtg acttgagttg ccaggaacca gagggggcc 2019
agtctatgag gaaggagtgg cccctgggta ccaggccac tggcttcagt ggctggcctc 2079
ttgaacacag tcacaagctg ggggaaggat ctattcaagt gccctgacca ggcacagggtg 2139
gctcctggga caactaacta actaagccct tgctcccagg cttggaatgg ccagtcctc 2199
agtgggtagg agagctgagg agccgcagca ggactgaggt gggggtgata taaataatat 2259
ttatcttttc aact 2273

<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
 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

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS



<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

ctg ctg caa ctc atc gac cac gaa gtg cac gag ggc aat gag gtc tgg 687
 Leu Leu Gln Leu Ile Asp His Glu Val His Glu Gly Asn Glu Val Trp
 190 195 200

tgc cgc tgc atc acc acc atc ttc aac tat ttt gtg gtc acc aac ttc 735
 Cys Arg Cys Ile Thr Thr Ile Phe Asn Tyr Phe Val Val Thr Asn Phe
 205 210 215

ttc tgg atg ttt gtg gag ggc tgc tac ctg cac acg gcc att gtc atg 783
 Phe Trp Met Phe Val Glu Gly Cys Tyr Leu His Thr Ala Ile Val Met
 220 225 230 235

99a Gly 831

879

927

975

1023

1071

1119

1167

1215

1263

1311

1359

1374

<213> Mus musculus

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
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

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 ccccatccct 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
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 ggc 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 ggc 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 ggc 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 ggc 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 ggc 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 ggc 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	
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 1322
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 ccctctgtca ccgtctgccc ggcagtcac cactgaggca gcttctccat 1474
Val
430

cctttacagc ctccccctgg gtccctccttg ctaccctgac ccacagggta caaggtacag 1534

gagaagggag gagaacgaac actccgcct ggaaggaaag gaaagctatg acatgggggg 1594

gctctgaagg accagggccc agtgcagcca gccacacatc tccaagcacg aaggagcagg 1654

aggacatcac aggacctca gaagggatgc atctcacacc atcaagcctc tgtgcaccca 1714

gcctcttttg tggggtcctc actgcagcac catttacatc tgaagaaact gaggtcaga 1774

gcaggcaggg acctggccaa gtcacatagc tacttgcccc acccacagca cccacagttg 1834

gctctgctcc ttgctttcca tctccacagc tgaggggcgc ctctaaaggt gagggagaca 1894

agaatgacct tatctggctt catcccagaa gctgtcgagc agagatgacc agccctttac 1954

caaggtagcc ttctttcttc ccagtctgtt tcccatgtgt ctccaggaga atgctggctt 2014

tcagtcggcc atccctcctg ggagtcacca attcagtcgt ggctcagtc ggggacctag 2074

accacgggaa gtgagttaga tggaaagtca cactctccac agtgccagac agaagggaga 2134

acagaagcgc ctggggaaga agggtgagga tcccccaaat cagagtatgc ctgggagtga 2194

ttgaaacaag ggccccagga tctcagtgc atcagccagg catctgtgga gttggccaca 2254

attcaagcaa cgagatgttg gagagatatt gtgagccagt aataaaggca gaatgtctgc 2314

aggacatata catgcccctc ttcttactgg ctaggcccaa gcaggccttc ctgtggagtc 2374

tttaggttca aaggggccga atcattcctg tcacccccaa ggggtggcatc tgcaccaccc 2434

ccagcgtaga cccacctgt gccagggact aatattctgg aattgggagg gagaggaggc 2494

aaggcccttc aggtccgaa agcaagaaga cacagtttga tttcaggctt ctcttcatt 2554

cctctgtccc tggagcagaa gaggggtgtt ggggcaagcc aacagacttg aaaaggcccc 2614

cgg 2617

<210> 26
<211> 430
<212> PRT
<213> Mus musculus

```

<400> 26

000000

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	Arg	Lys	Tyr	
	115						120					125				
Asp	Leu	His	Tyr	Arg	Ile	Ala	Leu	Ile	Val	Asn	Tyr	Leu	Gly	His	Cys	
	130					135					140					
Val	Ser	Val	Val	Ala	Leu	Val	Ala	Ala	Phe	Leu	Leu	Phe	Leu	Val	Leu	
145					150					155					160	
Arg	Ser	Ile	Arg	Cys	Leu	Arg	Asn	Val	Ile	His	Trp	Asn	Leu	Ile	Thr	
			165						170					175		
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
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

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

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
 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	

192

gat atg atc ggc act tgc tgg ccc agt act gca gct gga cag atg gtc	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	
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 ctt 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

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
 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
 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 gac aac
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

aac att cat gaa agc aac gag gtc tgg tgt cgg tgt atc aca act att 576
Asn Ile His Glu Ser Asn Glu Val Trp Cys Arg Cys Ile Thr Thr Ile
180 185 190

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

tgt tac cta cac aca gct ata gtg atg aca tac tca acg gac aaa ctt 672
Cys Tyr Leu His Thr Ala Ile Val Met Thr Tyr Ser Thr Asp Lys Leu
210 215 220

agg aaa tgg gtg ttc ctc ttc ata gga tgg tgt att cca tct ccg atc 720
Arg Lys Trp Val Phe Leu Phe Ile Gly Trp Cys Ile Pro Ser Pro Ile
225 230 235 240

att gtc acc tgg gcc atc tgc aag ctt ttc tat gaa aat gaa cag tgt 768
Ile Val Thr Trp Ala Ile Cys Lys Leu Phe Tyr Glu Asn Glu Gln Cys
245 250 255

Arg	Pro	Cys	Pro	Asp	Ser	Phe	Asn	Gly	Ile	Arg	Tyr	Asn	Thr	Thr	Arg	80
65					70					75						
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			
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							

<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	tcg	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	ggg	aca	agc	tca	agt	aat	gcc	aca	ggg	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	ggg	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	ggg	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	
			180					185							190	

atc ctg cgc aat gct aca tgg ttc gta gtg cag ctg acc atg aac cca 624
 Ile Leu Arg Asn Ala Thr Trp Phe Val Val Gln Leu Thr Met Asn Pro
 195 200 205

gag gtg cat gag agc aat gtg atc tgg tgc agg ctg gtt aca gca gcg 672
 Glu Val His Glu Ser Asn Val Ile Trp Cys Arg Leu Val Thr Ala Ala
 210 215 220

tat aat tac ttt cat gtg acc aac ttc ttc tgg atg ttt ggt gag ggc 720
 Tyr Asn Tyr Phe His Val Thr Asn Phe Phe Trp Met Phe Gly Glu Gly
 225 230 235 240

tgc tat ctg cac acg gcc atc gtg ctg act tac tcc act gat aag ctc 768
 Cys Tyr Leu His Thr Ala Ile Val Leu Thr Tyr Ser Thr Asp Lys Leu
 245 250 255

agg aag tgg ctg ttc atc tgt atc ggc tgg tgt att ccc ttt cct atc 816
 Arg Lys Trp Leu Phe Ile Cys Ile Gly Trp Cys Ile Pro Phe Pro Ile
 260 265 270

atc gtt gca tgg gcc att ggt aag ctg tat tac gac aat gaa aag tgc 864
 Ile Val Ala Trp Ala Ile Gly Lys Leu Tyr Tyr Asp Asn Glu Lys Cys
 275 280 285

tgg ttt gga aaa cga gct ggt gtt tat act gac tac atc tat cag ggc 912
 Trp Phe Gly Lys Arg Ala Gly Val Tyr Thr Asp Tyr Ile Tyr Gln Gly
 290 295 300

ccc atg atc ctt gtt ctt ctg atc aac ttt att ttc ctt ttc aac atc 960
 Pro Met Ile Leu Val Leu Leu Ile Asn Phe Ile Phe Leu Phe Asn Ile
 305 310 315 320

gtg agg atc ctg atg aca aag cta aga gcc tcc acc aca tca gag acg 1008
 Val Arg Ile Leu Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser Glu Thr
 325 330 335

att cag tac agg aaa gct gtg aag gcc act ctg gtc ctg ctg cct ctc 1056
 Ile Gln Tyr Arg Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu Pro Leu
 340 345 350

ctc ggg atc acc tac atg ctt ttc ttt gtt aac cct gga gag gac gag 1104
 Leu Gly Ile Thr Tyr Met Leu Phe Phe Val Asn Pro Gly Glu Asp Glu
 355 360 365

atc tcc caa atc gtc ttc atc tat ttc aat tct ttc ctc gag tcc ttt 1152
 Ile Ser Gln Ile Val Phe Ile Tyr Phe Asn Ser Phe Leu Glu Ser Phe
 370 375 380

caa ggt ttc ttc gtg tct gtg ttt tat tgc ttc ctg aac agt gaa gtc 1200
 Gln Gly Phe Phe Val Ser Val Phe Tyr Cys Phe Leu Asn Ser Glu Val
 385 390 395 400

cgt tcg gct gtt cgg aag cgc tgg cac cgc cgg cag gac aag cac tca 1248
 Arg Ser Ala Val Arg Lys Arg Trp His Arg Arg Gln Asp Lys His Ser
 405 410 415

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

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
 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 cag
 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 tgc 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
 105 110 115

att ctc aat gta cag agg aag agc aag ctg cat tat cga atc gct gtc 500
 Ile Leu Asn Val Gln Arg Lys Ser Lys Leu His Tyr Arg Ile Ala Val
 120 125 130

atc att aac tac ctg ggt cac tgc ttg tca ctg ttc act ctt ctt atc 548
 Ile Ile Asn Tyr Leu Gly His Cys Leu Ser Leu Phe Thr Leu Leu Ile
 135 140 145

gcc ttc ata atc ttc tta cga ctc agg agt att cgc tgt tta agg aac 596
 Ala Phe Ile Ile Phe Leu Arg Leu Arg Ser Ile Arg Cys Leu Arg Asn
 150 155 160 165

atc atc cac tgg aat cta acc tct gcc ttc atc ctg aga aat gcg acg 644
 Ile Ile His Trp Asn Leu Thr Ser Ala Phe Ile Leu Arg Asn Ala Thr
 170 175 180

tgg ttc atc gtt cag ctc acc atg aac cct gat gta cac gag agc aac 692
 Trp Phe Ile Val Gln Leu Thr Met Asn Pro Asp Val His Glu Ser Asn
 185 190 195

gtg cca tgg tgc cgt tta gtg acg acg gca tat aac tac ttc cac atg 740
 Val Pro Trp Cys Arg Leu Val Thr Thr Ala Tyr Asn Tyr Phe His Met
 200 205 210

gcc aat ttt ttc tgg atg ttc ggc gaa ggc tgt tat ctt cac aca gcc 788
 Ala Asn Phe Phe Trp Met Phe Gly Glu Gly Cys Tyr Leu His Thr Ala
 215 220 225

atc gtg ctc acc tac tcc act gac aaa ctc aag aaa tgg atg ttc atc 836
 Ile Val Leu Thr Tyr Ser Thr Asp Lys Leu Lys Lys Trp Met Phe Ile
 230 235 240 245

tgc atc gga tgg tgt att cct tgc cct att atc gtc gcc tgg gcc atc 884
 Cys Ile Gly Trp Cys Ile Pro Ser Pro Ile Ile Val Ala Trp Ala Ile
 250 255 260

gga aag ctg tac tac gac aac gag aag tgt tgg ttt ggg aag aga gca 932
 Gly Lys Leu Tyr Tyr Asp Asn Glu Lys Cys Trp Phe Gly Lys Arg Ala
 265 270 275

ggc ata tac aca gac tac atc tac cag ggc ccc atg atc ctg gta ctt 980
 Gly Ile Tyr Thr Asp Tyr Ile Tyr Gln Gly Pro Met Ile Leu Val Leu
 280 285 290

atg atc aat ttc gtg ttc ctc ttc aac ata gta agg atc ctc atg acc 1028
 Met Ile Asn Phe Val Phe Leu Phe Asn Ile Val Arg Ile Leu Met Thr
 295 300 305



aaa	ctc	cgg	gcc	tcc	acc	aca	tcc	gaa	acc	atc	cag	tac	agg	aag	gcg	1076
Lys	Leu	Arg	Ala	Ser	Thr	Thr	Ser	Glu	Thr	Ile	Gln	Tyr	Arg	Lys	Ala	1076
310					315					320					325	
gtg	aag	gcc	acg	ctc	gtg	tta	ctg	cct	ctg	ctc	ggg	atc	acg	tac	atg	1124
Val	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Gly	Ile	Thr	Tyr	Met	1124
				330					335					340		
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	1172
			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	1220
		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	1268
	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	1316
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	1364
				410					415					420		
atc	aaa	cag	tcc	acc	tct	gtc	tga	tac	agg	gac	cata	acatt	g	aaaa	agaa	1418
Ile	Lys	Gln	Ser	Thr	Ser	Val										1418
			425													
agg	cagg	cac	tct	atc	agt	g	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						

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
 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	
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	612
Met	Thr	Tyr	Ser	Thr	Asp	Lys	Leu	Arg	Lys	Trp	Val	Phe	Leu	Phe	Leu	
	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	ggg	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					

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	
305					310					315					320	

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	
			325						330					335		

ttc	aat	tcc	ttc	ctg	cag	tcc	ttt	cag	ggg	ttc	ttc	gtc	tca	gtg	ttt	1056
Phe	Asn	Ser	Phe	Leu	Gln	Ser	Phe	Gln	Gly	Phe	Phe	Val	Ser	Val	Phe	
			340					345					350			

tac	tgc	ttc	ctc	aac	ggg	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	
		355					360					365				

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	
		370				375					380					

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	
385					390					395					400	

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
1				5					10					15	

Leu Ala Asp Ala Phe Gly Asp Pro Ala Tyr Gly Asn Ala Ser Asp Ala
 20 25 30
 Leu Tyr Cys Asn Ala Thr Ala Asp Glu Ile Gly Thr Cys Trp Pro Arg
 35 40 45
 Ser Gly Ala Gly Arg Val Val Ala Arg Pro Cys Pro Asp Phe Ile Asn
 50 55 60
 Gly Val Lys Tyr Asn Ser Thr Arg Ser Ala Tyr Arg Glu Cys Leu Glu
 65 70 75 80
 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
 305 310 315 320
 Phe Val Asn Pro Gly Asp Asp Asp Ile Ser Gln Ile Val Phe Ile Tyr
 325 330 335
 Phe Asn Ser Phe Leu Gln Ser Phe Gln Gly Phe Phe Val Ser Val Phe
 340 345 350
 Tyr Cys Phe Leu Asn Gly Glu Val Arg Ser Ala Val Arg Lys Arg Trp
 355 360 365



His Arg Trp Gln Asp Asn His Ala Leu Arg Val Arg Val Ala Arg Ala
 370 375 380
 Met Ser Ile Pro Thr Ser Pro Thr Arg Ile Ser Phe His Ser Ile Lys
 385 390 395 400
 His Thr Thr Ala Val
 405



<210> 39
 <211> 1248
 <212> DNA
 <213> Bos taurus

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1248)

<400> 39
 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 tct 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 gtg gcc agc aac gtc tct gga ctg cag tgc aat gct tcc gtg 144
 Leu Ser Val Ala Ser Asn Val Ser Gly Leu Gln Cys Asn Ala Ser Val
 35 40 45
 gac ctt att ggt acc tgc tgg ccc cag agt cct gca ggg cag ttg gtg 192
 Asp Leu Ile 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
 aac aac ggc tac cgg gag tgc ctg gcc aat ggc acg tgg gcc gcc cgc 288
 Asn Asn Gly Tyr Arg Glu Cys Leu Ala Asn Gly Thr Trp Ala Ala Arg
 85 90 95
 gtg aac tac tcc gag tgc caa gag atc ctc agc gag gag aag aag agc 336
 Val Asn Tyr Ser Glu Cys Gln Glu Ile Leu Ser Glu Glu Lys Lys Ser
 100 105 110
 aag gtg cac tac cac atc gct gtc atc atc aac tac cta ggc cac tgc 384
 Lys Val 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



480

agg agc atc cgg tgc ctg aga aac atc atc cac tgg aac ctc atc tca	145	150	155	160
Arg Ser Ile Arg Cys Leu Arg Asn Ile Ile His Trp Asn Leu Ile Ser				
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 ggt	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 gcc atc gtg ctc acg tac tcc aca gac	672			
Glu Gly Cys Tyr Leu His Thr Ala Ile Val Leu Thr Tyr Ser Thr Asp		210	215	220
cgg ctg cga aag tgg atg ttt atc tgc atc ggc tgg ggt gtg cct ttc	720			
Arg Leu Arg Lys Trp Met Phe Ile Cys Ile Gly Trp Gly Val Pro Phe		225	230	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
aag tgc tgg ttt ggc aaa agg cct ggg gtg tac act 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 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 gtc 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
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	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		
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
 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 gagccccgac ggcagcggga gcggagccgg ccatgccccg ggtcgttggg 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
 Trp Pro Arg Ser Ala Val Gly Gln Leu Val Ala Arg Pro Cys Pro Glu
 60 65 70 75

tat ttc tac ggc gtg cgg tac aac acc aca aac aat ggc tac agg gaa
 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
 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
 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 tcg ctg ggg acc ctc
 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
 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
 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
 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
 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
 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
 Thr Ala Ile Val Leu Thr Tyr Ser Thr Asp Lys Leu Arg Lys Trp Met
 220 225 230 235

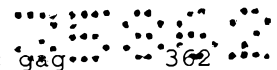
ttc atc tgc att ggc tgg tgt atc ccc ttt ccc atc att gtc gcc tgg
 Phe Ile Cys Ile Gly Trp Cys Ile Pro Phe Pro Ile Ile Val Ala Trp
 240 245 250

gcc atc ggg aag ctg tac tac gac aac gag aag tgc tgg ttt ggg aag
 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
 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
 Val Leu Leu Ile Asn Phe Ile Phe Leu Phe Asn Ile Val Arg Ile Leu
 285 290 295

atg acc aag ctc cga gca tca acc acg tca gag aca atc cag tac aga
 Met Thr Lys Leu Arg Ala Ser Thr Thr Ser Glu Thr Ile Gln Tyr Arg
 300 305 310 315



410

458

506

554

602

650

698

746

794

842

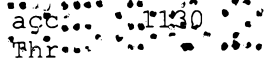
890

938

986

1034

1082

aaa gca gtc aag gct acg ctg gtg ctg ctg tcc ttg ctg gga atc  1130
 Lys Ala Val Lys Ala Thr Leu Val Leu Leu Ser Leu Leu Gly Ile Thr
 320 325 330

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
 335 340 345

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
 350 355 360

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
 365 370 375

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
 380 385 390 395

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
 400 405 410

cac agc atc aag cag tcc tca gca gtg tga ggcaggagga ggcagctgcc ga 1422
 His Ser Ile Lys Gln Ser Ser Ala Val
 415 420

<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
 1 5 10 15

Gln Ala Phe Leu Leu Trp Asp Ser Pro Val Ala Ala Ser Ile Gln Glu
 20 25 30

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

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

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
 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

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