



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 832**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**C07K 14/575** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03758054 .5**  
96 Fecha de presentación : **23.10.2003**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1558760**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.08.2005**

54 Título: **Genes sensibles a CRH en el CNS.**

30 Prioridad: **31.10.2002 PCT/EP02/12274**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**03.05.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**03.05.2011**

73 Titular/es: **JANSSEN PHARMACEUTICA N.V.**  
**Turnhoutseweg 30**  
**2340 Beerse, NL**

72 Inventor/es: **Peeters, Pieter Johan;**  
**Göhlmann, Hinrich W.H.;**  
**Swagemakers, Sigrid, Maria, Alice;**  
**Kass, Stefan Ulrich;**  
**Steckler, Thomas H.W y**  
**Fierens, Frederik, L.P**

74 Agente: **Justo Bailey, Mario de**

**Aviso:** En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere en general a la terapia y diagnóstico de la depresión. En particular, esta invención se refiere a los polipéptidos así como a los polinucleótidos que codifican estos polipéptidos, en donde se ha demostrado que dichos polipéptidos juegan un papel fundamental en la mediación de la respuesta celular a la hormona liberadora de corticotropina. Estos polipéptidos y polinucleótidos son útiles en la diagnosis, el tratamiento y/o la prevención de la depresión.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Análisis socioeconómicos recientes han encontrado que la depresión es una causa principal de discapacidad y un factor de riesgo importante para el desarrollo de otras enfermedades. Además, a escala mundial la depresión está infradiagnosticada e infratratada. Los fármacos antidepresivos actuales han demostrado ser eficaces, pero están gravados con un comienzo de acción lento y efectos secundarios. Por encima de esto, no está todavía claro por qué modo farmacológico de acción ejercen los mismos sus efectos clínicos. La investigación impulsada por hipótesis, basada en la hipótesis de los receptores de corticosteroides de la depresión ha conducido al concepto nuevo que está enfocado en los receptores de neuropéptidos cerebrales, específicamente en el receptor de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) como diana del fármaco.

La hormona liberadora de corticotropina (CRH), un polipéptido de 41 aminoácidos, juega un papel fundamental en la regulación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal, mediando las respuestas endocrinas a diversas causas de estrés. Las neuronas hipotalámicas liberan CRH en el sistema portal hipofisario en respuesta al estrés, estimulando la secreción y biosíntesis de adrenocorticotropina pituitaria (ACTH), conduciendo a una producción incrementada de glucocorticoide adrenal (1). Varios estudios clínicos y preclínicos apuntan hacia un papel causal para las alteraciones en el sistema CRH en el desarrollo de la depresión (2). Los primeros estudios con CRH en humanos demostraron que la respuesta de ACTH a CRH está debilitada en los pacientes deprimidos, reflejando una desensibilización de los receptores de CRH a la secreción de CRH hipotalámica incrementada continuamente (3; 4). En respaldo de la respuesta de ACTH debilitada como consecuencia de la liberación incrementada de CRH está el descubrimiento de niveles elevados de CRH en el fluido cerebroespinal de pacientes con depresión. Otros descubrimientos que refuerzan esta noción de la hipersecreción de CRH en el estado deprimido son un número incrementado de neuronas secretoras del CRH y un número reducido de receptores de CRH en las víctimas de suicidios que sufrían depresión (5; 6).

Para CRH se han descrito dos receptores de afinidad alta, CRH-R1 y CRH-R2, los dos cuales existen en varias formas variantes de remodelación. La activación de estos receptores por CRH da como resultado la estimulación mediada por  $G_s$  de adenilciclase que conduce a niveles incrementados de cAMP intracelular. Esto activará por sí mismo la proteína-quinasa A dependiente de cAMP (PKA) y dará finalmente como resultado niveles citosólicos incrementados de cAMP y  $Ca^{2+}$ . Los niveles incrementados de cAMP y  $Ca^{2+}$  conducen a la activación de varias otras quinasas adicionales tales como la quinasa II dependiente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina (CAMK II) y las quinasas activadas por mitógenos p42/p44 (MAPK). Como resultado, la proteína de fijación del elemento de respuesta a  $Ca^{2+}$ /cAMP (CREB) se fosforila y esto regulará a su vez la transcripción de genes que contienen elementos de respuesta a cAMP (CRE) en su región promotora. Ejemplos de tales genes que se demuestra están implicados en la modulación de la señalización por CRH incluyen *c-fos*, el gen del factor inhibidor de la migración de los macrófagos *Mif*, los receptores nucleares huérfanos *Nurr77* y *Nurr1*.

Con objeto de desarrollar un modelo animal para la activación crónica pituitario-adrenal, se han generado ratones que sobreexpresan CRF (CRF-OE) (Stenzel-Poore *et al.*, (1992) *Endocrinology* 130:3378-3386). Estos ratones transgénicos presentan un fenotipo Cushingoide debido a la superproducción de ACTH y corticosterona a lo largo de su vida como resultado de la sobreexpresión global de CRF en estos animales. En armonía con el papel del CRF cerebral en la mediación de las respuestas endocrina, autonómica y conductual al estrés, los ratones CRF-OE exhiben un estado espontáneo de emotividad acrecentada, son hiper-reactivos a los estresantes y la administración central de un antagonista de los receptores de CRF invierte estos comportamientos de tipo ansiogénico (Stenzel-Poore *et al.*, (1994) *J. Neurosci.* 14:2579-2584). Estos ratones CRF-OE permiten la investigación de los efectos a largo plazo de CRF sobre el sistema nervioso central y se han utilizado como modelo genético de comportamiento relacionado con la ansiedad y el estrés. A pesar del hecho de que los caminos aguas abajo para los receptores activados por CRH fueron estudiados extensivamente y condujeron a la identificación de varios genes implicados en la cascada de señalización, queda por explorar un área importante. Por ello, ha sido objeto de la presente invención explorar la respuesta transcripcional a la estimulación de CRH al nivel de amplitud del genoma a fin de identificar genes posteriores implicados en la red génica activada por los receptores de la hormona liberadora de corticotropina. Los polipéptidos así identificados y los polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos proporcionan nuevas probabilidades para el desarrollo de fármacos como dianas de fármaco por técnicas de selección, o son útiles en la diagnosis, prevención y/o tratamiento de la depresión.

### SUMARIO DE LA INVENCION

La presente solicitud describe cierto número de genes que no se habían asociado hasta ahora con señalización de CRH y son útiles por consiguiente en métodos para identificación de compuestos, que modulan la respuesta de señalización de CHR en una célula o en métodos diagnósticos para identificar la depresión inducida por CRH en un individuo.

En una realización, el método para identificar un compuesto capaz de alterar la respuesta de señalización de CRH en una célula, en particular la línea de células de adenoma derivadas del corticotropo de pituitaria de murino AtT-20 comprende poner en contacto dicha célula con CRH en presencia y ausencia de dicho compuesto y determinar el nivel de expresión de un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.15, SEQ ID NO.17, SEQ ID NO.19, SEQ ID NO.21, SEQ ID NO.23, SEQ ID NO.25, SEQ ID NO.26, SEQ ID NO.27, SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29, SEQ ID NO.30, SEQ ID NO.31, SEQ ID NO.32, SEQ ID NO.34, SEQ ID NO.36, SEQ ID NO.38 y SEQ ID NO.40. En este método de selección, los niveles de expresión se evalúan típicamente utilizando una sonda oligonucleotídica que se fija a los polinucleótidos arriba mencionados, utilizando preferiblemente métodos de tecnología de redes. De acuerdo con ello, en una realización particular se describe un método para identificar compuestos que modulan la respuesta de señalización de CRH en una célula, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha célula con CRH en presencia y ausencia de dicho compuesto; y determinar el nivel de expresión de los polinucleótidos que tienen las secuencias de ácido nucleico SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.15, SEQ ID NO.17, SEQ ID NO.19, SEQ ID NO.21, SEQ ID NO.23, SEQ ID NO.25, SEQ ID NO.26, SEQ ID NO.27, SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29, SEQ ID NO.30, SEQ ID NO.31, SEQ ID NO.32, SEQ ID NO.34, SEQ ID NO.36, SEQ ID NO.38 y SEQ ID NO.40, en donde un cambio en el perfil de expresión de estas secuencias es indicativo de un compuesto capaz de alterar la respuesta de señalización de CRH en dicha célula.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Tabla 1: Tabla de genes que demuestran ser mediadores importantes de los cambios inducidos por CRH en el CNS.

Tabla 2: Secuencias de oligonucleótidos utilizadas para RT-PCR

Figura 1: Niveles de expresión de CRH-R1 en diferentes tejidos del ratón. Se aplicó RT-PCR cuantitativa sobre tejidos derivados de 3 animales diferentes para las regiones cerebrales.

Figura 2: Análisis en mapa espectral de datos de microrredes obtenidos en todas las áreas del cerebro investigadas. Los cuadrados representan muestras diferentes, mientras que los círculos representan genes. El diámetro del círculo corresponde a la intensidad media de un gen. Las distancias entre los cuadrados son una medida de la semejanza entre las muestras. Una asociación positiva de un gen con una muestra dada (es decir, una regulación ascendente de dicho gen en dicha muestra particular) da como resultado el posicionamiento del gen y la muestra sobre una línea común a través del centroide (indicado por una cruz). Las diferentes áreas se representan en el orden siguiente (A) cerebelo, (B) corteza frontal, (C) hipocampo, (D) nucleus accumbens, (E) área temporal, (F) pituitaria.

Figura 3: parámetros del eje HPA en los animales utilizados para el análisis de microrredes. Los niveles de CORT en plasma son 6 a 8 veces mayores en los sobreexpresantes de CHR comparados con los animales de tipo salvaje. No se observaron diferencias significativas en los niveles de ACTH.

Figura 4: Datos de microrredes y RT-PCR cuantitativa para los genes implicados en la señalización de glucocorticoides. (A) Los datos de redes que muestran una regulación descendente de  $11\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa tipo 1 (HSD11b1) en el hipocampo se confirmaron utilizando RT-PCR cuantitativa (niveles normalizados contra  $\beta$ -actina). (B) Datos de redes que muestran una regulación ascendente significativa en el hipocampo y la corteza frontal de la proteína 5 fijadora de FK506 (Fkdp5), un modulador de la activación de los receptores de glucocorticoides. (C) Los datos de redes sobre la quinasa regulada por suero/glucocorticoides (Sgk) se confirmaron por RT-PCR cuantitativa en la corteza frontal.

Figura 5: Datos de microrredes y RT-PCR cuantitativa para los receptores 1 y 2 de neurotensina. (A) La regulación descendente del receptor 2 de neurotensina (Ntsr2) en los ratones que sobreexpresaban CHR observada en el hipocampo se estableció utilizando RT-PCR cuantitativa. Los niveles del receptor 1 de neurotensina (Ntsr1) se encontraban por debajo del límite de detección en el análisis de microrredes. (B) sin embargo, la RT-PCR cuantitativa estableció una regulación descendente similar de Ntsr1 en los sobreexpresantes de CRH. Adicionalmente, el ANOVA de dos vías sobre los datos qRT-PCR muestra un efecto importante del tratamiento con vehículo que aparentemente es anulado por tratamiento con R121919.

Figura 6: Fijación de [ $^{125}$ I]NT (0,1 nM, 30min, RT) a todos los sitios NTS determinada por autorradiografía cuantitativa sobre secciones de tejido cerebral montadas en vidrio congelado. Los datos se representan como el valor medio IOD  $\pm$  SEM de 3 animales determinado sobre al menos 3 secciones diferentes del Bregma cada una.

(\*): Diferencia entre los grupos genéticos con  $p < 0,05$ .

AMG, amígdala con inclusión de ACe, MeA, BMA, BLA; CG2, corteza cingulada anterior; HC-SR, hipocampo-*stratum radiatum*; RSG, corteza granular retroesplénica; TC, corteza temporal/parietal; U, sin tratar; Ve, tratada con vehículo; R, tratada con R121919.

Figura 7: Fijación de [ $^{125}$ I]NT a los sitios NTS1&3 en estructuras dentro de las secciones del hipocampo con sitios Nts2 bloqueados por Levocabastina. La fijación de [ $^{125}$ I]NT 0,1 nM (30 min, RT) se determinó por autorradiografía cuantitativa sobre secciones de tejido cerebral montadas en vidrio congelado. Los datos se representan como el valor medio  $\text{IOD} \pm \text{SEM}$  de 3 animales determinado sobre al menos 3 secciones diferentes del Bregma cada una.

(\*\*\*): Diferencia entre los grupos genéticos con  $p < 0,001$ .

SNC, *substantia nigra*, pars compacta; otras abreviaturas, véase la leyenda de Fig. 5.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

Como se utiliza en esta memoria, el término "compuesto" o "agente" significa un compuesto biológico o químico tal como una molécula orgánica simple o compleja, un péptido, una proteína o un oligonucleótido. Un "compuesto de test" como se utiliza en esta memoria, se refiere a un "compuesto" o "agente" utilizado en un método de acuerdo con la invención para evaluar si dicho compuesto modula la actividad de señalización de CRH.

"Señalización de CRH", como se utiliza en esta memoria, se refiere a los cambios celulares en la transcripción génica después de activación del receptor de la hormona liberadora de corticotropina por CRH en dicha célula. La misma induce por tanto un perfil de expresión de genes específico de CRH. Los cambios al nivel de la transcripción pueden evaluarse sea al nivel de proteínas o al nivel génico del RNA.

"Actividad de respuesta de CRH", como se utiliza en esta memoria, se refiere en general al cambio de un parámetro celular detectable como resultado de la exposición de dicha célula a CRH. Parámetros celulares detectables incluyen, entre otros, cambios en el potencial de membrana, cambios en la actividad enzimática de una enzima que modula la señalización de CRH en dicha célula, cambios en los niveles de expresión de una proteína de acuerdo con la invención o cambios en la cantidad de segundos mensajeros tales como cGMP, cAMP,  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{IP}_3$ .

El término "análogo" o "análogo funcional" se refiere a una forma modificada de permeasas púricas de mamífero en la cual se ha hecho al menos una sustitución de aminoácido de tal modo que dicho análogo retiene sustancialmente la misma actividad biológica que la permeasa púrica de mamífero sin modificar *in vivo* y/o *in vitro*.

"Muestra" o "muestra biológica" como se utiliza en esta memoria se refiere a células, extractos de células, fluidos corporales o muestras de tejido tales como por ejemplo de sangre, orina, saliva, o material de biopsia tisular o autopsia.

El término "análogo funcional" tiene por objeto incluir los "fragmentos", "variantes", "variantes degeneradas", "análogos" y "homólogos" o "derivados químicos" de los polipéptidos de acuerdo con la invención. Derivados químicos útiles de polipéptidos son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, modificación covalente de un sitio orgánico reactivo contenido en el polipéptido con un resto químico secundario. Reactivos de reticulación bien conocidos son útiles para reaccionar con residuos amino, carboxilo o aldehído a fin de introducir, por ejemplo, un marcador de afinidad tal como biotina, un tinte fluorescente, o para conjugar el polipéptido con una superficie de fase sólida (por ejemplo para crear una resina de afinidad).

Variante(s) de polinucleótidos o polipéptidos, tal como se utiliza el término en esta memoria, son polinucleótidos o polipéptidos que difieren de un polinucleótido o polipéptido de referencia, respectivamente. Una variante del polinucleótido puede ser una variante existente naturalmente tal como una variante alélica existente naturalmente, o puede ser una variante que no se sabe que exista naturalmente. (1) Un polinucleótido que difiere en secuencia de nucleótidos de otro polinucleótido de referencia. Generalmente, las diferencias son limitadas de tal modo que la secuencias de nucleótidos de la referencia y la variante son estrechamente similares como un todo y, en muchas regiones, idénticas. Como se indica más adelante, los cambios en la secuencia de nucleótidos y la variante pueden ser silenciosos. Es decir, pueden no alterar los aminoácidos codificados por el polinucleótido. En los casos en que las alteraciones se limitan a cambios silenciosos de este tipo, una variante codificará un polipéptido con la misma secuencia de aminoácidos que la referencia. Como se indica también más adelante, los cambios en la secuencia de nucleótidos de la variante pueden alterar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido codificado por el polinucleótido de referencia. Tales cambios de nucleótidos pueden dar como resultado sustituciones, adiciones, delecciones, fusiones y truncaciones de aminoácidos en el polipéptido codificado por la secuencia de referencia, como se ha expuesto anteriormente. (2) Un polipéptido que difiere en secuencia de aminoácidos de otro polipéptido de referencia. Generalmente, las diferencias son limitadas de tal modo que las secuencias de la referencia y la variante son estrechamente similares en su conjunto y, en muchas regiones, idénticas. Una variante y un polipéptido de referencia pueden diferir en secuencia de aminoácidos por una o más sustituciones, adiciones, delecciones, fusiones y truncaciones, que pueden estar presentes en cualquier combinación.

Los términos "complementario" o "complementariedad", como se utilizan en esta memoria, hacen referencia a la capacidad de los nucleótidos púricos y pirimidínicos para asociarse a través de enlaces de hidrógeno con formación de moléculas bicatenarias de ácido nucleico. Los pares de bases siguientes están relacionados por complementariedad: guanina y citosina, adenina y timina, y adenina y uracilo. Como se utiliza en esta memoria, "complementariedad" significa que la relación arriba mencionada se aplica a sustancialmente todos los pares de bases que comprenden dos moléculas monocatenarias de ácido nucleico en toda la longitud de dichas moléculas. "Complementariedad parcial"

hace referencia a la relación arriba mencionada en la cual una de las dos moléculas monocatenarias de ácido nucleico tiene menor longitud que la otra, de tal modo que una porción de una de las moléculas sigue siendo monocatenaria.

El término "sustitución conservadora" o "sustitución de aminoácidos conservadores" hace referencia a un reemplazamiento de uno o más residuos de aminoácido en una proteína parental sin afectar a la actividad biológica de la molécula parental basada en la susceptibilidad de sustitución de ciertos aminoácidos reconocida en la técnica (véase, v.g., M. Dayhoff, en Atlas of Protein Sequence and Structure, Vol. 5, Supl. 3, págs. 345-352, 1978).

"Fragmento de la misma" se refiere a un fragmento, pieza, o sub-región de un ácido nucleico o molécula de proteína cuya secuencia se describe en esta memoria, tal que dicho fragmento comprende 5 o más aminoácidos, o 10 o más nucleótidos que son contiguos en la proteína o molécula de ácido nucleico parental.

"Fragmento funcional" como se utiliza en esta memoria, se refiere a una subregión aislada, o fragmento de una proteína, o secuencia de aminoácidos descrita en esta memoria que, por ejemplo, comprende una región funcionalmente distinta tal como un sitio activo para un receptor. Fragmentos funcionales pueden producirse por tecnología de clonación, o como los productos naturales de mecanismos alternativos de remodelación.

El término "homólogo" u "homológico" describe la relación entre diferentes moléculas de ácido nucleico o secuencias de aminoácidos en la cual dichas secuencias o moléculas están relacionadas por identidad parcial o semejanza en uno o más bloques o regiones dentro de dichas moléculas o secuencias. "Compuesto de ácido nucleico aislado" se refiere a cualquier secuencia de RNA o DNA, con indiferencia de cómo esté construida o sintetizada, que está localizada de modo distinto de su localización natural.

Una "sonda de ácido nucleico" o "sonda", como se utiliza en esta memoria, es un compuesto de ácido nucleico marcado que está hibridado con otro compuesto de ácido nucleico. "Sonda de ácido nucleico" significa una secuencia de ácido nucleico monocatenario que se hibridará con una secuencia de ácido nucleico diana monocatenario. Una sonda de ácido nucleico puede ser un oligonucleótido o un polímero de nucleótidos. Una "sonda" contendrá usualmente un resto detectable que puede estar unido al o a los extremos de la sonda o ser interno a la secuencia de la sonda.

El término "iniciador" es un fragmento de ácido nucleico que funciona como sustrato de iniciación para la elongación enzimática o sintética de, por ejemplo, una molécula de ácido nucleico.

El término "hibridación", como se utiliza en esta memoria, se refiere a un proceso en el cual una molécula de ácido nucleico monocatenaria se une con una cadena complementaria por apareamiento de bases nucleotídicas.

El término "severidad" se refiere a las condiciones de hibridación. Las condiciones de severidad alta dificultan el apareamiento de bases no homólogo. Las condiciones de severidad baja tienen el efecto contrario. La severidad puede alterarse, por ejemplo, por temperatura y concentración de sales. "Condiciones severas" se refiere a una incubación durante una noche a 42°C en una solución que comprende 50% de formamida, 5x SSC (NaCl 750 mM, citrato de sodio 75 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5x solución de Denhardt, 10% solución de dextrano, y 20 µg/ml de DNA de esperma de salmón cizallado desnaturalizado, seguido por lavado de los filtros en 0,1 x SSC a aproximadamente 65°C. Otras condiciones de hibridación adecuadas se describen en los ejemplos.

"Condiciones de severidad inferior" incluyen una incubación durante una noche a 37°C en una solución que comprende 6X SSPE (20X SSPE = NaCl 3M; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 M; EDTA 0,02 M, pH 7,4), 0,5% SDS, 30% formamida, 100 µg/ml de DNA bloqueante de esperma de salmón; seguido por lavados a 50°C con 1X SSPE, 0,1% SDS. Adicionalmente, para conseguir una severidad menor aún, los lavados realizados después de la hibridación severa pueden realizarse a concentraciones mayores de sal (v.g. 5X SSC). Obsérvese que las variaciones en las condiciones anteriores pueden realizarse por la inclusión y/o sustitución de reactivos de bloqueo alternativos utilizados para suprimir el ruido de fondo en los experimentos de hibridación. Reactivos de bloqueo típicos incluyen reactivo de Denhardt, BLOTTO, heparina, DNA de esperma de salmón desnaturalizado, y formulaciones patentadas disponibles comercialmente. La inclusión de reactivos de bloqueo específicos puede requerir la modificación de las condiciones de hibridación arriba descritas, debido a problemas de compatibilidad.

El término "proteína de fusión", como se utiliza en esta memoria, se refiere a constructos proteínicos que son el resultado de la combinación de dominios múltiples de proteínas o regiones enlazadoras para el propósito de obtener las funciones combinadas de los dominios o regiones enlazadoras. Esto puede realizarse por clonación molecular de las secuencias de nucleótidos que codifican tales dominios a fin de producir una nueva secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína de fusión deseada. Alternativamente, la creación de una proteína de fusión puede realizarse por unión química de dos proteínas.

El término "región enlazadora" o "dominio enlazador" o términos descriptivos similares a éstos, tal como se utilizan en esta memoria, hacen referencia a secuencias de polinucleótidos o polipéptidos que se utilizan en la construcción de un vector de clonación o proteína de fusión. Las funciones de una región enlazadora pueden incluir introducción de sitios de clonación en la secuencia de nucleótidos, introducción de un componente flexible o región de creación de espacio entre dos dominios proteínicos, o creación de un marcador de afinidad para interacción de moléculas específicas. Una región enlazadora puede introducirse en una proteína de fusión resultante de las elecciones realizadas durante la construcción de la secuencia de polipéptidos o nucleótidos.

*Métodos de selección*

La presente invención se refiere a métodos de selección para identificar compuestos que modulan la depresión y el estrés inducidos por la hormona liberadora de corticotropina (CRH). La misma está basada en la identificación de diversos genes como moduladores de aguas abajo de los receptores de CRH activados por CRH. En particular, esta invención proporciona un método para identificar un compuesto capaz de alterar la respuesta de señalización de CRH en una célula, comprendiendo dicho método:

- a) poner en contacto dicha célula con CRH en presencia y ausencia de dicho compuesto;
- b) determinar el cambio al nivel de la transcripción de al menos una proteína que modula la señalización de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en dicha célula; y

- c) comparar el nivel de transcripción de dicha proteína en presencia y ausencia de dicho compuesto;

en el cual la proteína que modula la señalización de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) es SEQ ID NO. 20.

Para determinar el cambio de transcripción al nivel de proteína podría determinarse la cantidad de dicha proteína utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, utilizando técnicas de separación tales como enfoque isoeléctrico o SDS-PAGE en combinación con técnicas de tinción de proteínas tales como tinción con Coomassie o plata. Alternativamente, para las proteínas que son enzimas, la cantidad en una solución o extracto de tejido dado puede medirse o ensayarse en términos del efecto catalítico que produce la enzima, es decir la conversión de su sustrato en el producto de reacción. Por ejemplo, para las quinasas puede evaluarse la actividad de quinasas utilizando un sustrato que comprende el sitio de fosforilación específico de las quinasas y por medida de la fosforilación del sustrato por incorporación de fosfato radiactivo en el sustrato. Este ensayo puede realizarse tanto en presencia como en ausencia del compuesto a testar. Para las proteínas que no son enzimas, se requieren otros métodos de cuantificación. Por ejemplo, las proteínas de transporte pueden evaluarse por su fijación a la molécula que transportan y las hormonas y toxinas por el efecto biológico que producen las mismas.

Para evaluar los cambios en la transcripción a nivel génico, pueden utilizarse directamente RNA o cDNA para la detección o pueden amplificarse enzimáticamente utilizando PCR u otras técnicas de amplificación antes del análisis. Preferiblemente, dicho método de análisis comprende el uso de una sonda oligonucleotídica marcada direccionada a una región adecuada del gen que codifica una proteína que modula la señalización de CRH en dicha célula. De acuerdo con ello, en una realización preferida, el nivel de transcripción génica se evalúa utilizando una sonda que se fija a un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 20.

Se describe también una red de sondas oligonucleotídicas que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que modula la señalización de CRH o pueden construirse fragmentos de la misma para conseguir una selección eficiente de la expresión génica. Los métodos de tecnología de redes son bien conocidos y tienen aplicabilidad general, pudiendo utilizarse para abordar una diversidad de cuestiones en genética molecular que incluyen expresión génica, enlaces genéticos, y variabilidad genética (véase por ejemplo: M. Chee *et al.*, Science, Vol. 274, pp 610-613 (1996)).

Se describe también un método para identificación de un compuesto capaz de alterar la respuesta de señalización de CRH en una célula, que comprende:

- a) poner en contacto dicha célula con CRH en presencia y ausencia de dicho compuesto; y
- b) determinar el nivel de expresión de un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.15, SEQ ID NO.17, SEQ ID NO.19, SEQ ID NO.21, SEQ ID NO.23, SEQ ID NO.25, SEQ ID NO.26, SEQ ID NO.27, SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29, SEQ ID NO.30, SEQ ID NO.31, SEQ ID NO.32, SEQ ID NO.34, SEQ ID NO.36, SEQ ID NO.38 y SEQ ID NO.40.

Para evaluar los cambios en los niveles de expresión, pueden utilizarse directamente RNA o cDNA para detección o pueden amplificarse enzimáticamente utilizando PCR u otras técnicas de amplificación antes del análisis. Preferiblemente, dicho método de análisis comprende el uso de una sonda oligonucleotídica marcada direccionada a una región adecuada del polinucleótido. De acuerdo con ello, en una realización el nivel de transcripción génica se evalúa utilizando una sonda que se fija a un polinucleótido que comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.15, SEQ ID NO.17, SEQ ID NO.19, SEQ ID NO.21, SEQ ID NO.23, SEQ ID NO.25, SEQ ID NO.26, SEQ ID NO.27, SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29, SEQ ID NO.30, SEQ ID NO.31, SEQ ID NO.32, SEQ ID NO.34, SEQ ID NO.36, SEQ ID NO.38 y SEQ ID NO.40.

En otra realización, una red de sondas oligonucleotídicas que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína que modula la señalización de CRH o fragmentos de la misma puede construirse para conducir una selección eficiente de la expresión génica. En esta realización, la invención proporciona un método para identificar un compuesto capaz de alterar la respuesta de señalización de CRH en una célula, comprendiendo dicho método poner en

contacto dicha célula con CRH en presencia y ausencia de dicho compuesto; y determinar el nivel de expresión de los polinucleótidos que tienen las secuencias de ácido nucleico SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.15, SEQ ID NO.17, SEQ ID NO.19, SEQ ID NO.21, SEQ ID NO.23, SEQ ID NO.25, SEQ ID NO.26, SEQ ID NO.27, SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29, SEQ ID NO.30, SEQ ID NO.31, SEQ ID NO.32, SEQ ID NO.34, SEQ ID NO.36, SEQ ID NO.38 y SEQ ID NO.40. En particular, la utilización de una red de sondas oligonucleotídicas que se fijan a los polinucleótidos que tienen las secuencias de ácido nucleico SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.15, SEQ ID NO.17, SEQ ID NO.19, SEQ ID NO.21, SEQ ID NO.23, SEQ ID NO.25, SEQ ID NO.26, SEQ ID NO.27, SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29, SEQ ID NO.30, SEQ ID NO.31, SEQ ID NO.32, SEQ ID NO.34, SEQ ID NO.36, SEQ ID NO.38 y SEQ ID NO.40. Los métodos de tecnología de redes son bien conocidos y tienen aplicabilidad general, pudiendo utilizarse para abordar una diversidad de cuestiones de genética molecular que incluyen expresión génica, enlaces genéticos y variabilidad genética (véase por ejemplo: M. Chee *et al.*, Science, Vol. 274, pp 610-613 (1996)).

En el caso de que no se utilice directamente DNA genómico, puede aislarse mRNA, y llevarse a cabo una síntesis de cDNA de la primera cadena. Puede realizarse una segunda tanda de síntesis de DNA para la producción de la segunda cadena. Subsiguientemente, por la amplificación específica de PCR puede obtenerse un cDNA aislado. Si se desea, el cDNA bicatenario puede clonarse en cualquier vector adecuado, por ejemplo, un plásmido, formando con ello una biblioteca de cDNA. Por analogía con lo anterior, es posible cribar bibliotecas de cDNA construidas en un bacteriófago o vector lanzadera plasmídico con una sonda oligonucleotídica marcada direccionada a cualquier región adecuada del gen que codifica una proteína que modula la señalización por CRH. Véase v.g. PCR Protocols: A Guide to Method and Application, Ed. M. Innis *et al.*, Academic Press (1990).

Métodos para construcción de bibliotecas de cDNA en un vector lanzadera tal como un plásmido o fago para propagación en células procariotas o eucariotas son bien conocidos por los expertos en la técnica. [Véase v.g. Maniatis *et al.*, *supra*]. Vectores de clonación adecuados son bien conocidos y están ampliamente disponibles.

En una realización adicional, los cambios en la transcripción génica se determinan al nivel del mRNA. La expresión reducida o incrementada puede medirse al nivel del RNA utilizando cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica para la cuantificación de polinucleótidos, tales como, por ejemplo: amplificación de ácido nucleico, por ejemplo por PCR, RT-PCR; protección contra las RNasas; transferencia Northern y otros métodos de hibridación. Métodos que pueden utilizarse para determinar los niveles de una proteína, tal como un polipéptido de la presente invención, en una muestra derivada de un hospedador son bien conocidos por los expertos en la técnica. Tales métodos de ensayo incluyen radioinmunoensayos, ensayos de fijación competitiva, análisis por transferencia Western y ensayos ELISA. Técnicas de ensayo que pueden utilizarse para determinar la presencia de derivados o variantes de proteínas comprenden, entre otras, la espectrometría de masas.

Por consiguiente, es un objeto de la presente invención proporcionar un método para identificar un compuesto capaz de alterar la respuesta de señalización de CRH en una célula, comprendiendo dicho método:

- a) poner en contacto dicha célula con CRH en presencia y ausencia de dicho compuesto;
- b) determinar la cantidad de al menos una proteína que modula la señalización de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en dicha célula; y
- c) comparar la cantidad de dicha proteína en presencia y ausencia de dicho compuesto;

en el cual la proteína que modula la señalización de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) es SEQ ID NO. 20.

Preferiblemente, el método para ensayar la cantidad de la proteína que modula la señalización de CRH consiste en utilizar un anticuerpo que se fija a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 20.

Así, en otra realización, esta invención proporciona un anticuerpo monoespecífico inmunológicamente reactivo con una proteína que modula la señalización de CRH, siendo dicha proteína SEQ ID NO. 20.

Los anticuerpos generados contra los polipéptidos de la presente invención pueden obtenerse por administración de los polipéptidos o fragmentos, análogos o células vehículos de epítopo que expresan éstos a un animal, preferiblemente un animal no humano, utilizando protocolos de rutina. Para la preparación de anticuerpos monoclonales, puede utilizarse cualquier técnica que proporcione anticuerpos producidos por cultivos continuos de líneas de células. Ejemplos incluyen la técnica del hibridoma (Kohler, J. Milstein, C., *Nature* (1975) 256:495-497), la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de las células B humanas (Kozbor *et al.*, *Immunology Today* (1983) 4:72) y la técnica del hibridoma EBV (Cole *et al.*, MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp. 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985).

Técnicas para la producción de anticuerpos monocatenarios, tales como se describen en la patente U.S. NO. 4.946.778, pueden adaptarse también para producir anticuerpos monocatenarios para los polipéptidos de esta invención. Asimismo, ratones transgénicos, u otros organismos, con inclusión de otros mamíferos, pueden utilizarse para expresar anticuerpos humanizados.

Los anticuerpos arriba descritos pueden emplearse para aislar o identificar clones que expresan el polipéptido o para purificar los polipéptidos por cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos contra los polipéptidos de la presente invención pueden emplearse también para tratar los trastornos relacionados con el metabolismo del CRH tales como estrés o depresión inducidas por CRH, entre otros.

5 Para determinar la cantidad de proteína que modula la señalización de CRH, los anticuerpos de acuerdo con la invención se utilizan en técnicas inmunológicas convencionales. Métodos inmunológicos adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica e incluyen por ejemplo, ELISA, Análisis por Transferencia Western, inmunoensayos repetitivos o sándwich y análogos, dependiendo todos ellos, como es por lo demás bien sabido, de la formación de un  
10 complejo inmune antígeno-anticuerpo en donde, para el propósito del ensayo, el anticuerpo puede estar marcado detectablemente con, v.g. radiomarcadores, enzimas o marcadores fluorescentes, o puede estar inmovilizado en vehículos insolubles.

Por ejemplo, en un formato de selección ELISA, el anticuerpo se añade a una fase sólida (por ejemplo el fondo de una microplaca) que está recubierta con la proteína o un fragmento peptídico de la misma acoplado a un vehículo (tal como BSA), seguido por adición de un anticuerpo anti-inmunoglobulina (por ejemplo cuando la inmunización se realiza en ratones, se emplea un anticuerpo de inmunoglobulina anti-ratón, v.g. inmunoglobulina anti-ratón de oveja (Ig))  
15 conjugado con un marcador detectable tal como una enzima, preferiblemente peroxidasa de rábano picante, o un isótopo radioactivo tal como <sup>125</sup>I.

Por consiguiente, es un objeto de la invención proporcionar **inmunoensayos** para la determinación o detección de proteínas que modulan la señalización de CRH en una muestra, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con un anticuerpo para las proteínas de acuerdo con la invención y determinar si se forma un complejo inmune entre el anticuerpo y dicha proteína. Estos métodos pueden realizarse o bien sobre **muestras de tejido o muestras de fluidos corporales** y comprenden generalmente obtener una muestra a partir del cuerpo de un individuo; poner en contacto dicha muestra con una cantidad eficaz para la obtención de imagen de un anticuerpo marcado detectablemente de acuerdo con la invención; y detectar el marcador para establecer la presencia de las proteínas que modulan la  
20 señalización de CRH en la muestra.

Los métodos de medición que utilizan los anticuerpos de la presente invención no están particularmente limitados. Puede utilizarse cualquier método de medición con tal que la cantidad de anticuerpos, antígenos o los complejos antígeno-anticuerpo correspondientes a la cantidad de los antígenos a medir se detecte por medios químicos o físicos, y se calcule a partir de curvas estándar preparadas por el uso de soluciones estándar que contienen los antígenos en cantidades conocidas. Por ejemplo, se utilizan adecuadamente nefelometría, métodos competitivos, métodos  
30 inmunométricos y métodos sándwich. Con respecto a sensibilidad y especificidad, se prefiere particularmente la utilización de los métodos sándwich descritos más adelante.

En los métodos de medida que utilizan **sustancias marcadoras**, se emplean como agentes marcadores radioisótopos, enzimas, sustancias fluorescentes, sustancias luminosas, etc.. Ejemplos de los radioisótopos incluyen <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>3</sup>H y <sup>14</sup>C. Las enzimas se hacen detectables usualmente por conjugación de un sustrato apropiado que, a su vez, cataliza una reacción detectable. Ejemplos de las mismas incluyen, por ejemplo, beta-galactosidasa, beta-glucosidasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa y malato-deshidrogenasa, preferiblemente peroxidasa de rábano picante. Las sustancias luminosas incluyen, por ejemplo, luminol, derivados de luminol, luciferina, eucorina y luciferasa. Adicionalmente, pueden utilizarse también los sistemas avidina-biotina para marcar los anticuerpos e inmunógenos de la presente invención.

40 De acuerdo con ello, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método de identificación y obtención de compuestos que alteran la actividad de respuesta de señalización de CRH en una célula, que comprende:

a) poner en contacto una célula que expresa al menos una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 20, con dicho compuesto de test; y

b) comparar la actividad de respuesta de CRH de dicha célula en presencia y ausencia de dicho compuesto.

45 Los cambios en el potencial de membrana pueden medirse utilizando técnicas electrofisiológicas convencionales y, cuando están disponibles, utilizando nuevos métodos de alta capacidad que se encuentran actualmente en desarrollo. Dado que los cambios en el potencial de membrana son normalmente el resultado de flujos iónicos, como enfoque alternativo, los cambios en el potencial de membrana pueden medirse indirectamente por el cambio en las concentraciones intracelulares de iones empleando tintes fluorescentes sensibles a iones, con inclusión de fluo-3, fluo-4, fluo-5N, rojo fura, Verde de Sodio, SBFI y otras sondas similares de suministradores que incluyen Molecular Probes. Otros tintes fluorescentes, procedentes de suministradores que incluyen Molecular Probes, tales como DIBAC<sub>4(3)</sub> o Di-4-Anepps pueden detectar los cambios de potencial de membrana. Por ejemplo, los flujos iónicos de calcio y sodio pueden caracterizarse así en tiempo real, utilizando técnicas de producción de imágenes fluorométricas y de fluorescencia, con inclusión de microscopía de fluorescencia con o sin métodos láser confocales combinados con  
50 algoritmos de análisis de imágenes.

En una realización preferida, este ensayo está basado en un instrumento denominado **FLuorescence Imaging Plate Reader** ((FLIPR), Molecular Devices Corporation). En su configuración más común, dicho instrumento excita y mide la

- fluorescencia emitida por tintes basados en fluoresceína. El mismo utiliza un láser iónico de argón para producir excitación de alta potencia a 488 nm de un fluoróforo, un sistema de óptica para escanear rápidamente por encima del fondo de una placa de 96/384 pocillos y una cámara CCD sensible enfriada para capturar la fluorescencia emitida. El mismo contiene también una cabeza de pipeteado de 96/384 pocillos que permite que el instrumento suministre soluciones de los reactivos de test a los pocillos de una placa de 96/384 pocillos. El ensayo FLIPR está diseñado para medir las señales de fluorescencia procedentes de poblaciones de células antes, durante y después de la adición de los compuestos, en tiempo real, desde todos los 96/384 pocillos simultáneamente. Es por tanto un objeto de la presente invención proporcionar un ensayo FLIPR utilizado para seleccionar y caracterizar compuestos funcionalmente activos en la modulación de la respuesta de CRH en las células, expresando dichas células la proteína SEQ ID NO. 20.
- En una realización alternativa, la actividad de la célula puede evaluarse utilizando métodos electrofisiológicos. Para ello, las proteínas que modulan la señalización de CRH en una célula pueden caracterizarse utilizando electrofisiología de células enteras y canales simples.
- Así pues, es un objeto adicional de esta invención proporcionar un método de selección para identificar compuestos que modulan la actividad de la respuesta de señalización de CRH en una célula, comprendiendo dicho método:
- (a) poner en contacto una célula hospedadora que expresa la proteína SEQ ID NO. 20, con un compuesto a testar;
  - (b) medir el efecto del compuesto de test sobre el potencial de membrana de dicha célula utilizando técnicas electrofisiológicas; y
  - (c) comparar la actividad de la respuesta de CRH de dicha célula en presencia y ausencia de dicho compuesto.
- En una realización preferida, las células hospedadoras son oocitos de *Xenopus* y la medida electrofisiológica consiste en medir la corriente de membrana utilizando la técnica de selección por voltaje a potenciales de membrana distintos.
- Los cambios en la actividad enzimática de una enzima que modula la señalización de CRH en dicha célula, pueden medirse o ensayarse generalmente en términos del efecto catalítico que produce la enzima, es decir la conversión de su sustrato en el producto de reacción. Por ejemplo, para las quinasas puede evaluarse la actividad de quinasa utilizando un sustrato que comprende el sitio de fosforilación específico de la quinasa y por medida de la fosforilación del sustrato. Análogamente, para las fosfatasa puede evaluarse la actividad de fosfatasa utilizando un sustrato fosforilado y midiendo la desfosforilación del sustrato. Estos ensayos pueden realizarse tanto en presencia como en ausencia del compuesto a testar.
- Por consiguiente, es un objeto de la presente invención proporcionar un método para identificar un compuesto capaz de alterar la actividad de respuesta de señalización de CRH en una célula, comprendiendo dicho método:
- a) poner en contacto una mixtura que comprende la quinasa SEQ ID NO. 20, una fuente de fosfato y un sustrato de quinasa adecuado;
  - b) incubar dicha mixtura en presencia o ausencia de dicho compuesto, y
- medir el nivel de fosforilación de dicho sustrato en presencia de dicho compuesto comparado con el nivel de fosforilación de dicho sustrato en ausencia de dicho compuesto de test.
- En el ensayo de la invención, la quinasa puede proporcionarse como una proteína o puede proporcionarse en la mixtura de ensayo como un mRNA codificante de dicha quinasa. Cuando el ensayo comprende componentes exentos de células, la quinasa se proporciona como la proteína. Cuando el ensayo se conduce en el medio de una célula, la quinasa puede proporcionarse como una proteína o como un mRNA que codifica dicha quinasa, en donde, a fin de que la quinasa esté disponible en el ensayo, se traduce el mRNA y la quinasa proteínica se produce de este modo. Será evidente por los ejemplos que se proporcionan en esta memoria que es una cuestión sencilla obtener mRNA que especifica la quinasa e inyectar el mRNA en una célula para producción de la quinasa proteínica. La quinasa puede proporcionarse también por la expresión de un plásmido, que codifica la quinasa proteínica. Pueden utilizarse técnicas estándar de biología molecular para construir plásmidos operativos que codifican la quinasa proteínica y expresar los plásmidos en células (Sambrook, *et al.*, 1989, en: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York).
- Como se expone en esta memoria, el método de identificación de un modulador de quinasa puede realizarse sea in vitro, en cuyo caso la mixtura de ensayo está exenta de células, in vitro, en cuyo caso se utilizan en el ensayo células vivas, o in vivo en un animal. Así, en un aspecto de la invención, la mixtura está contenida en una célula eucariota y el método de la invención puede realizarse de tal modo que algunos de los componentes de la mixtura de ensayo pueden proporcionarse exógenamente a una célula por microinyección de los componentes en ella, y algunos de los componentes pueden ser endógenos en la célula.
- El término "endógeno en la célula", como se utiliza en esta memoria, significa que el componente se produce naturalmente en la célula en cuestión.

El término "exógeno a la célula", como se utiliza en esta memoria, significa que el componente no se encuentra naturalmente en la célula en cuestión, o se encuentra en ella a un nivel bajo, y se añade a la misma. Cuando el método de la invención se realiza utilizando una célula eucariota, uno o más de la quinasa proteínica, el sustrato de quinasa y el compuesto de test pueden inyectarse en la célula eucariota antes de la incubación. La célula así inyectada se incuba luego en condiciones que facilitan la actividad de la quinasa proteínica y el nivel de actividad de la quinasa proteínica se mide subsiguientemente después del periodo de incubación utilizando los ensayos descritos en esta memoria.

La célula eucariota que es útil en los métodos de la invención puede ser una cualquiera de un oocito de *Xenopus laevis*, una célula embrionaria de *Xenopus laevis*, una célula de mamífero (tal como una célula I OTI/2), una célula S2 de *Drosophila melanogaster*, una célula de *Dictyostelium discoideum* y una célula de levadura. Todavía más preferiblemente, la célula eucariota es una célula de la línea de células de adenoma derivado del corticotropo de pituitaria murina, AtT-20.

La fuente de fosfato para uso en los métodos de la invención puede ser cualquier fuente de fosfato común con inclusión, pero sin carácter limitante, de nucleótido-trifosfatos tales como, pero sin carácter limitante, ATP o GTP. En una realización preferida, la fuente de fosfato lleva fijado a ella un marcador detectable, marcador que se transfiere con el grupo fosfato al sustrato de la quinasa durante la reacción. De esta manera, el sustrato de quinasa fosforilado puede diferenciarse del sustrato de quinasa no fosforilado dado que el sustrato fosforilado contendrá el marcador detectable, mientras que el sustrato no fosforilado no contendrá el marcador. En otra realización, la fuente de fosfato no lleva fijado en ella un marcador detectable; en lugar de ello, el sustrato de quinasa fosforilado puede distinguirse del sustrato de quinasa no fosforilado, por ejemplo por reconocimiento de una forma de sustrato, pero no de la otra, por un anticuerpo.

El marcador detectable que es útil en los métodos de la invención puede incluir cualquier marcador detectable conocido o no conocido hasta ahora que se transfiere al sustrato de quinasa por transferencia de un grupo fosfato al mismo como resultado de la actividad de la quinasa proteínica. Marcadores que son útiles incluyen, pero sin carácter limitante, marcadores radiactivos, tales como  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ,  $^{31}\text{S}$ , y marcadores no radiactivos, tales como biotina y análogos.

Preferiblemente, el ensayo de la quinasa se realiza en una célula y comprende:

- a) poner en contacto una célula que comprende la quinasa SEQ ID NO. 20, con una fuente de fosfato y un sustrato de quinasa adecuado;
- b) incubar dicha mezcla en presencia o ausencia de dicho compuesto; y
- c) comparar la actividad de respuesta de CRH de dicha célula en presencia y ausencia de dicho compuesto.

Análogamente, un cambio en la respuesta de señalización de CRH puede evaluarse utilizando un ensayo de fosfatasa, comprendiendo dicho ensayo:

- a) poner en contacto una mezcla que comprende la fosfatasa SEQ ID NO. 20, y un sustrato fosforilado adecuado;
- b) incubar dicha mezcla en presencia o ausencia de dicho compuesto; y

medir el nivel de fosforilación de dicho sustrato en presencia de dicho compuesto comparado con el nivel de fosforilación de dicho sustrato en ausencia de dicho compuesto de test.

En cuanto al ensayo de la quinasa, la fosfatasa en el ensayo de la invención, puede proporcionarse como una proteína o puede proporcionarse en la mezcla de ensayo como un mRNA que codifica dicha fosfatasa. El sustrato fosforilado se marca típicamente con un residuo de fosfato detectable. Marcadores que son útiles incluyen, pero sin carácter limitante, marcadores radiactivos, tales como  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ,  $^{31}\text{S}$ , y marcadores no radiactivos, tales como biotina y análogos. Para uso en un ensayo de actividad de fosfatasa, el sustrato consiste preferiblemente en un sustrato peptídico, fosforilado en un residuo tirosina o serina, marcado típicamente con  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ . En general, la fosforilación puede realizarse de diversas maneras. Típicamente, se utiliza una tirosina-quinasa proteínica. Por ejemplo, puede utilizarse una quinasa del receptor de EGF soluble en combinación con ATP marcado con  $^{32}\text{P}$  a fin de fosforilar un residuo tirosina en un péptido de la presente invención. Una reacción de fosforilación de este tipo se deja transcurrir típicamente durante aproximadamente 2 horas a 30°C, o durante una noche a la temperatura ambiente. El péptido fosforilado, al que se hace referencia en lo sucesivo como "fosfopéptido", se purifica luego a partir de una mezcla de reacción de fosforilación. Por ejemplo, el péptido puede separarse de una mezcla de reacción por adición de ácido tricloroacético y centrifugación, con lo cual el péptido permanece en el sobrenadante. El plásmido se purifica por regla general ulteriormente por cromatografía en columna, v.g., en C18. El péptido fosforilado purificado puede liofilizarse y guardarse a -20°C antes de su utilización.

Después de la incubación, el fosfopéptido que no está desfosforilado ("fosfopéptido no desfosforilado") se separa de la radiactividad liberada por desfosforilación del fosfopéptido (es decir, del fósforo libre radiactivo separado por la desfosforilación). Como se utiliza en esta memoria, el término "fósforo radiactivo" incluye todas las formas en las cuales puede estar presente un átomo de fósforo radiactivo en un residuo tirosina y eliminarse por desfosforilación, v.g., como un grupo fosfato. Típicamente, la separación del fosfopéptido no desfosforilado del fósforo libre radiactivo separado por desfosforilación del fosfopéptido se efectúa por centrifugación, después de la terminación de la reacción de desfosforilación, por adición de sustancias que incluyen fosfatos no radiactivos y carbón vegetal. La radiactividad en el

sobrenadante se determina por medios bien conocidos por quienes poseen una experiencia ordinaria en la técnica. Basándose en la cantidad de radiactividad añadida, inicialmente a la mixtura de ensayo por el fosfopéptido y la cantidad de radiactividad detectada al final del ensayo como radiactividad separada por desfosforilación, puede calcularse la actividad enzimática de fosfatasa de la muestra ensayada.

5 Preferiblemente, el ensayo de fosfatasa se realiza en una célula y comprende:

a) poner en contacto una célula que comprende la fosfatasa SEQ ID NO. 20, con un sustrato fosforilado adecuado;

b) incubar dicha mixtura en presencia o ausencia de dicho compuesto y;

c) comparar la actividad de respuesta de CRH de dicha célula en presencia y ausencia de dicho compuesto, en donde la actividad de respuesta de CRH de dicha célula se determina por el cambio en el nivel de fosforilación del sustrato.

10 Es también una realización de la presente invención proporcionar un método para identificación de un compuesto capaz de alterar la actividad de respuesta de señalización de CRH en una célula, comprendiendo dicho método:

a) poner en contacto una célula que expresa al menos una proteína que comprende el aminoácido SEQ ID NO. 20 con dicho compuesto de test; y

15 b) comparar los niveles de un segundo mensajero, tales como cAMP, cGMP,  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{IP}_3$  en dicha célula, en presencia y ausencia de dicho compuesto.

Los niveles de segundos mensajeros pueden determinarse utilizando técnicas conocidas en células enteras o extractos celulares que comprenden una de las proteínas arriba mencionadas.

20 Un método adicional para identificar un compuesto capaz de alterar la señalización de CRH en una célula está basado en el uso de un gen, tal como un gen informador, enlazado operativamente a un gen promotor o elemento de secuencia reguladora del mismo, caracterizado porque dicho gen promotor o elemento de secuencia reguladora comprende un sitio de fijación de factor de transcripción, en donde dicho factor de transcripción es capaz de modular la señalización de CRH en una célula. En una realización preferida, el factor de transcripción capaz de modular la señalización de CRH en una célula es SEQ ID NO. 20.

25 De acuerdo con ello, la presente invención proporciona una molécula de DNA recombinante que comprende la región promotora del gen como se ha definido arriba. En dicha molécula de DNA recombinante, la región promotora puede estar enlazada operativamente a una molécula de ácido nucleico que codifica un producto detectable, tal como un gen informador. El término "enlazado operativamente", como se utiliza en esta memoria, significa fusionar funcionalmente un promotor con un gen en el marco apropiado para expresar el gen bajo control del promotor. Como se utiliza en esta memoria, el término "gen informador" significa un gen que codifica un producto génico que puede ser identificado utilizando métodos o reactivos sencillos y económicos y que puede estar enlazado operativamente a la región promotora de un fragmento activo del mismo. Genes informadores tales como, por ejemplo, un gen de luciferasa de luciérnaga,  $\beta$ -galactosidasa, fosfatasa alcalina, el gen de cloranfenicol-acetil-transferasa bacteriana o el gen informador de la proteína verde fluorescente, pueden utilizarse para determinar la actividad de transcripción en ensayos de selección de acuerdo con la invención (véase, por ejemplo, Goeddel (ed.), *Methods Enzymol.*, Vol. 185, San Diego: Academic Press, Inc. (1990); véase también Sambrook, supra). En una realización preferida, el gen informador es el gen de luciferasa de luciérnaga. La invención proporciona también un vector que comprende la molécula de DNA recombinante como se ha definido arriba, así como una célula hospedadora transformada de manera estable con un vector de este tipo, o generalmente con la molécula de DNA recombinante de acuerdo con la invención. El término "vector" hace referencia a cualquier vehículo de DNA exógeno que es útil para transferir el DNA a una célula hospedadora para replicación y/o expresión apropiada del DNA exógeno por la célula hospedadora. De acuerdo con ello, en una realización específica dicho vector es un vector de expresión tal como el vector de expresión pGL3luc disponible comercialmente.

*Identificación de un perfil de expresión de un gen inducido por CRH.*

45 En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de las moléculas de ácido nucleico aisladas y purificadas que se demostró están reguladas en sentido ascendente o descendente después de exposición prolongada a niveles elevados de CRH, en donde dicha molécula de ácido nucleico es RNA, DNA, cDNA o DNA genómico, como marcador de la señalización de CRH en una célula. En particular, la presente solicitud describe una molécula aislada y purificada de ácido nucleico que comprende un miembro seleccionado de un grupo constituido por:

50 a) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70% de identidad, preferiblemente al menos 80% de identidad, más preferiblemente al menos 90% de identidad, aún más preferiblemente al menos 95% de identidad, todavía más preferiblemente al menos 97-99% de identidad, con un polinucleótido seleccionado del grupo constituido por SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.25, SEQ ID NO.26, SEQ ID NO.27, SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29, SEQ ID NO.30 y SEQ ID NO.31, a lo largo de la longitud total de dicho polinucleótido;

b) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70% de identidad, preferiblemente al menos 80% de identidad, más preferiblemente al menos 90% de identidad, más preferiblemente al menos 90% de identidad, todavía más preferiblemente al menos 90% de identidad, aún más preferiblemente al menos 95% de identidad, todavía más preferiblemente al menos 97-99% de identidad, con un polinucleótido seleccionado del grupo constituido por SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.25, SEQ ID NO.26, SEQ ID NO.27, SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29, SEQ ID NO.30 y SEQ ID NO.31, a lo largo de la región codificante total de dicho polinucleótido;

c) un polinucleótido de secuencia nucleotídica seleccionado del grupo constituido por SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.25, SEQ ID NO.26, SEQ ID NO.27, SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29, SEQ ID NO.30 y SEQ ID NO.31.

Identidad o semejanza, como se conocen en la técnica, son relaciones entre dos o más secuencias de polipéptidos o dos o más secuencias de polinucleótidos, como se determinan por comparación de las secuencias. En la técnica, la identidad significa también el grado de interrelación de secuencia entre secuencias de polipéptidos o polinucleótidos, según sea el caso, tal como se determina por la coincidencia entre las cadenas de dichas secuencias. Tanto identidad como semejanza pueden calcularse fácilmente (Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991). Si bien existen cierto número de métodos para medir identidad y semejanza entre dos secuencias de polinucleótidos o de polipéptidos, ambos términos son bien conocidos para los profesionales expertos (Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo, H., y Lipman, D., (1988) SIAM J. Applied Math., 48, 1073. Métodos empleados comúnmente para determinar identidad o semejanza entre secuencias incluyen, pero sin carácter limitante, los descritos en Carillo, H., y Lipman, D., (1988) SIAM J. Applied Math., 48, 1073. Los métodos preferidos para determinar identidad están diseñados para obtener la coincidencia máxima entre las secuencias testadas. Los métodos para determinar identidad y semejanza están codificados en programas de computadora. Métodos preferidos de programas de computadora para determinar identidad y semejanza entre dos secuencias incluyen, pero sin carácter limitante, el paquete de programas GCG (Devereux, J., *et al.*, (1984) Nucleic Acids Research 12(1), 387), BLASTP, BLASTN, y FASTA (Altschul, S. F. *et al.*, (1990) J. Molec. Biol. 215, 403).

La secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína capaz de modular la actividad de CRH, o fragmento de la misma, puede aislarse a partir de un tejido en el cual se expresa dicho gen, tal como, pero sin carácter limitante, cerebro, corazón, riñón, páncreas, hígado y piel. Dicha secuencia puede aislarse también en mamíferos distintos de humano y ratón. La selección de células adecuadas puede realizarse por cribado de la actividad de modulación de CRH en extractos de células o en ensayos con células enteras, como se describe en esta memoria. Las células que poseen actividad moduladora de CRH en uno cualquiera de estos ensayos pueden ser adecuadas para el aislamiento de secuencias de ácido nucleico de acuerdo con la invención.

Cualquiera de una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica pueden utilizarse para clonar molecularmente DNA codificante de una proteína de acuerdo con la invención. En un método, se aísla el mRNA, y se realiza la síntesis del cDNA de la primera cadena. Puede llevarse a cabo una segunda tanda de síntesis de DNA para la producción de la segunda cadena. Subsiguientemente, por la amplificación PCR específica de fragmentos de DNA mediante el diseño de iniciadores oligonucleotídicos degenerados de la secuencia de aminoácidos de la proteína purificada que modula la señalización del CRH, puede obtenerse un cDNA aislado. Si se desea, el cDNA bicatenario puede clonarse en cualquier vector adecuado, por ejemplo, un plásmido, formándose de este modo una biblioteca de cDNA. Otro método consiste en seleccionar bibliotecas de cDNA construidas en un bacteriófago o vector lanzadera plasmídico con una sonda oligonucleotídica marcada direccionada para cualquier región adecuada de SEQ ID NO. 1, SEQ ID NO. 7 o SEQ ID NO. 3. Véase, v.g. PCR Protocols: A Guide to Method and Application, Ed. M. Innis *et al.*, Academic Press (1990).

Métodos para construcción de bibliotecas de cDNA en un vector adecuado tal como un plásmido o fago para propagación en células procariotas o eucariotas son bien conocidos por los expertos en la técnica. [Véase v.g. Maniatis *et al. supra*]. Vectores de clonación adecuados son bien conocidos y están generalmente disponibles.

Es fácilmente evidente para los expertos en la técnica que otros tipos de bibliotecas, así como bibliotecas construidas a partir de otras células o tipos de célula, pueden ser útiles para aislar las secuencias de ácido nucleico de acuerdo con la invención. Otros tipos de bibliotecas incluyen, pero sin carácter limitante, bibliotecas de cDNA derivadas de otras células, de organismos distintos de humano y ratón, y bibliotecas genómicas de DNA que incluyen Yac (cromosoma artificial de levadura), y bibliotecas de cósmidos. La construcción de bibliotecas de DNA genómico puede realizarse por métodos estándar bien conocidos en la técnica. Técnicas de construcción de bibliotecas de DNA genómico muy conocidas pueden encontrarse en T. Maniatis *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, capítulo 14 (1989).

El artesano experto apreciará que, en muchos casos, una secuencia de DNA aislada será incompleta, en el sentido de que la región que codifica el polipéptido está acortada en el extremo 5' del cDNA. Esto es una consecuencia de la transcriptasa inversa, una enzima con 'procesividad' inherentemente baja (una medida de la capacidad de la enzima

para mantenerse fijada al molde durante la reacción de polimerización), que no consigue completar una copia de DNA del molde de mRNA durante la síntesis del cDNA de la primera cadena.

Existen varios métodos disponibles y bien conocidos por los expertos en la técnica para obtener cDNAs de longitud total, o extender los cDNAs cortos, por ejemplo los basados en el método de Amplificación Rápida de los Extremos del cDNA (RACE) (Frohman *et al.*, 1988, PNAS USA 85, 8998-9002), o modificaciones recientes de esta técnica, ilustradas por la tecnología Marathon™ (Clontech Laboratories Inc.).

#### *Polipéptidos*

En una realización adicional, esta solicitud describe un polipéptido en una forma sustancialmente pura que modula la señalización del CRH en donde dicho polipéptido está codificado por una molécula de ácido nucleico aislada y purificada de acuerdo con la invención. En una realización preferida, el polipéptido tiene la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO.10, SEQ ID NO.12, SEQ ID NO.14, SEQ ID NO.16, SEQ ID NO.18, SEQ ID NO.20, SEQ ID NO.22, SEQ ID NO.24, SEQ ID NO.33, SEQ ID NO.35, SEQ ID NO.37, SEQ ID NO.39 y SEQ ID NO.41 y análogos funcionales de las mismas.

La proteína de acuerdo con la invención incluye todas variantes de aminoácidos posibles codificadas por el ácido nucleico de acuerdo con la invención, con inclusión de un polipéptido codificado por dicha molécula y que tiene cambios de aminoácidos conservadores.

Los expertos en la técnica reconocerán que la proteína que modula la señalización de CRH podría obtenerse por una pluralidad de técnicas de DNA recombinante que incluyen, por ejemplo, hibridación, reacción en cadena de polimerasa (PCR), amplificación, o síntesis de DNA *de novo* (véase v.g., T. Maniatis *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, cap. 14 (1989)).

La proteína purificada biológicamente activa que modula las señalizaciones de CRH puede presentar varias formas físicas diferentes. Los polipéptidos de acuerdo con la invención pueden existir como polipéptidos de longitud total nacientes o no procesados, o como polipéptidos parcialmente procesados o combinaciones de polipéptidos procesados. El polipéptido naciente de longitud total puede estar modificado con posterioridad a la traducción, entre otros, por sucesos específicos de escisión proteolítica que dan como resultado la formación de fragmentos del polipéptido naciente de longitud total. Un fragmento, o asociación física de fragmentos, puede tener la actividad biológica total asociada con las proteínas de acuerdo con la invención; sin embargo, el grado de actividad de modulación del CRH puede variar entre los fragmentos individuales.

Se prefieren también en este aspecto de la invención fragmentos caracterizados por atributos estructurales o funcionales del polipéptido. Realizaciones preferidas de la invención a este respecto incluyen fragmentos que comprenden regiones de hélice alfa y regiones formadoras de hélice alfa, regiones de hélice beta y regiones formadoras de hélice beta, regiones de vuelta y formadoras de vuelta, regiones de serpentín y formadoras de serpentín, regiones hidrófilas, regiones hidrófobas, regiones anfipáticas alfa, regiones anfipáticas beta, regiones flexibles, regiones formadoras de superficie, región de fijación de sustrato, regiones de índice antigénico alto, regiones del polipéptido de la invención, y combinaciones de tales fragmentos. Regiones preferidas son aquellas que median las actividades de los polipéptidos de la invención. Sumamente preferidos a este respecto son fragmentos que tienen una actividad química, biológica o de otro tipo del polipéptido regulador de la respuesta de la invención, con inclusión de aquéllos que tienen una actividad similar o una actividad mejorada, o con una actividad indeseable reducida.

#### *Expresión recombinante de polinucleótidos que codifican la proteína que modula la actividad de CRH*

En otra realización, los polinucleótidos de acuerdo con la invención pueden ser expresados recombinantemente por clonación molecular en un vector de expresión que contiene un promotor adecuado y otros elementos reguladores de la transcripción apropiados, y transferidos a células hospedadoras procariotas o eucariotas para producir una proteína que modula la señalización de CRH. Métodos para tales manipulaciones se describen detalladamente en Maniatis, T., et al., supra, y son bien conocidos en la técnica.

Por consiguiente, en un aspecto adicional esta solicitud describe un vector de expresión para expresión de una proteína que modula la señalización de CRH en un hospedador recombinante, en donde dicho vector contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que modula la señalización del CRH y análogos funcionales del mismo. En un aspecto más preferido de esta invención, este vector de expresión contiene una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que modula la señalización de CRH, que tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada de un grupo constituido por: SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.15, SEQ ID NO.17, SEQ ID NO.19, SEQ ID NO.21, SEQ ID NO.23, SEQ ID NO.32, SEQ ID NO.34, SEQ ID NO.36, SEQ ID NO.38 y SEQ ID NO.40 y análogos funcionales de la misma, o contiene DNA genómico que codifica una proteína que modula la señalización de CRH.

Los vectores de expresión se definen en esta memoria como secuencias de DNA que se requieren para la transcripción de copias clonadas de genes y la traducción de sus mRNAs en un hospedador apropiado. Dichos vectores pueden utilizarse para expresar genes eucariotas en una diversidad de hospedadores tales como bacterias que incluyen *E. coli*, cianobacterias, células vegetales, células de insecto, células de anfibio, células fúngicas con inclusión de células de levadura, y células animales.

5 Vectores diseñados específicamente permiten el uso como lanzadera de DNA entre hospedadores tales como bacterias-levaduras o bacterias-células animales o bacterias-células fúngicas o bacterias-células de invertebrado. Un vector de expresión construido adecuadamente puede contener: un origen de replicación para replicación autónoma en células hospedadoras, marcadores seleccionables, un número limitado de sitios de enzimas de restricción útiles, un potencial para alto número de copias, y promotores activos. Un promotor se define como una secuencia de DNA que dirige la RNA-polimerasa para fijarse a DNA e iniciar la síntesis del RNA. Un promotor fuerte es uno que hace que los mRNAs se inicien con frecuencia alta. Vectores de expresión pueden incluir, pero sin carácter limitante, vectores de clonación, vectores de clonación modificados, y plásmidos o virus diseñados específicamente.

10 Las moléculas de ácido nucleico aisladas y purificadas, de acuerdo con la invención, que codifican una proteína que modula la señalización de CRH pueden clonarse en un vector de expresión para expresión en una célula hospedadora recombinante. Células hospedadoras recombinantes pueden ser procariotas o eucariotas, con inclusión, pero sin carácter limitante, de bacterias tales como *E. coli*, células fúngicas tales como levadura, células de anfibio tales como oocitos de *Xenopus*, células de mamífero con inclusión pero sin carácter limitante de líneas de células de origen humano, bovino, porcino, mono y roedor, y células de insecto que incluyen, pero sin carácter limitante, líneas de células derivadas de *Drosophila* y del gusano de la seda. Líneas de células derivadas de especies de mamífero que pueden ser adecuadas y que están disponibles comercialmente incluyen, pero sin carácter limitante, CV-1 (ATCC CCL 70), COS-1 (ATCC CRL 1650), COS-7 (ATCC CRL 1651), CHO-K1 (ATCC CCL 61), 3T3 (ATCC CCL 92), NIH/3T3 (ATCC CRL 1658), HeLa (ATCC CCL 2), C1271 (ATCC CRL 1616), BS-C-1 (ATCC CCL 26), MRC-5 (ATCC CCL 171), células L, neuroblastoma, células gliales y HEK-293 (ATCC CRL1573).

20 Por consiguiente, en una realización adicional, esta solicitud describe una célula hospedadora recombinante que contiene una molécula de ácido nucleico clonada recombinantemente que codifica una proteína que modula la señalización de CRH o análogo funcional de la misma. En un aspecto adicional, la célula hospedadora recombinante de acuerdo con la invención contiene una molécula de ácido nucleico que es DNA genómico o tiene una secuencia de nucleótidos seleccionada de un grupo constituido por SEQ ID NO.9, SEQ ID 11, SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.15, SEQ ID NO.17, SEQ ID NO.19, SEQ ID NO.21, SEQ ID NO.23, SEQ ID NO.32, SEQ ID NO.34, SEQ ID NO.36, SEQ ID NO.38 y SEQ ID NO.40; y análogos funcionales de la misma.

30 El vector de expresión puede introducirse en las células hospedadoras por una cualquiera de diversas técnicas que incluyen, pero sin carácter limitante, transformación, transfección, fusión de protoplastos, lipofección, y electroporación. Las células que contienen el vector de expresión se propagan clónicamente y se analizan para determinar si las mismas producen una proteína que module la señalización de CRH. La identificación de permeasas que expresan clones de la célula hospedadora puede realizarse por diversos medios, con inclusión pero sin carácter limitante de reactividad inmunológica con anticuerpos dirigidos contra los polipéptidos de acuerdo con la invención, y la presencia de actividad de purina-permeasas de mamífero asociadas con las células hospedadoras.

35 Así pues, la presente invención se refiere también a un proceso para expresión de una proteína que modula la señalización de CRH en una célula hospedadora recombinante, que comprende cultivar las células hospedadoras de acuerdo con la invención en condiciones que permiten la expresión de la proteína que modula la señalización de CRH a partir del vector de expresión como se reseña en esta memoria. Las proteínas de esta invención pueden sintetizarse sea por expresión directa o como una proteína de fusión que comprende la proteína de interés como una fusión de traducción con otra proteína o péptido que puede ser eliminable autoescisión, o por escisión enzimática o química. Por consiguiente, en una realización particular, esta invención proporciona las proteínas de acuerdo con la invención en las cuales dichos polipéptidos forman parte de una proteína de fusión.

45 A menudo se observa en la producción de ciertos péptidos en sistemas recombinantes que la expresión como una proteína de fusión prolonga la duración de vida, aumenta el rendimiento del péptido deseado, o proporciona un medio conveniente de purificación de la proteína. Esto es particularmente relevante cuando se expresan proteínas de mamífero en hospedadores procariotas. Se conocen una diversidad de peptidasas (v.g. enteroquinasa y trombina), que escinden un polipéptido en sitios o materiales de digestión específicos, los péptidos de los términos amino o carboxi (v.g. diaminopeptidasa) de la cadena peptídica. Adicionalmente, productos químicos particulares (v.g. bromuro de cianógeno) escindirán una cadena polipeptídica en sitios específicos. El artesano experto apreciará las modificaciones necesarias para la secuencia de aminoácidos (y la secuencia codificante sintética o semisintética si se emplean medios recombinantes) para incorporar sitios de escisión internos de acción específica. Véase, v.g. P. Carter, "Site Specific Proteolysis of Fusion Proteins", capítulo 13, en Protein Purification: From Molecular Mechanisms to Large Scale Processes. American Chemical Society, Washington, D.C. (1990).

55 Adicionalmente, podría utilizarse, v.g., una célula de mamífero que comprende ya en su genoma una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína que modula la señalización de CRH como se ha descrito arriba, pero no expresa el mismo o no lo hace de una manera apropiada debido, v.g., a un promotor débil, e introducir en la célula de mamífero una secuencia reguladora tal como un promotor fuerte en proximidad estrecha a la molécula de ácido nucleico endógena que codifica dicho polipéptido de purina-permeasa a fin de inducir la expresión del mismo.

60 Como tal, una célula hospedadora recombinante que contiene un polinucleótido que codifica una proteína que modula la señalización de CRH bajo el control de una secuencia o proteína heteróloga de transcripción y/o reguladora, podría ser otra realización de esta invención.

En este contexto, el término "secuencia reguladora" denota una molécula de ácido nucleico que puede utilizarse para aumentar la expresión del polipéptido purina-permeasa, debido a su integración en el genoma de una célula en estrecha proximidad al gen codificante de la proteína moduladora de CRH. Tales secuencias reguladoras comprenden promotores, intensificadores, secuencias intrón silenciadoras desactivadas, regiones codificantes 3'UTR y/o 5'UTR, elementos estabilizadores de proteínas y/o RNA, moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína reguladora, v.g., un factor de transcripción, capaces de inducir o desencadenar la expresión del gen codificante de la proteína moduladora de CRH u otros elementos de control de la expresión génica que se sabe activan la expresión génica y/o aumentan la cantidad del producto génico. La introducción de dicha secuencia reguladora conduce a aumento y/o inducción de la expresión de polipéptidos, que modulan la señalización de CRH, dando como resultado al final una cantidad incrementada de dichos polipéptidos en la célula. Así, la presente invención está orientada a proporcionar la expresión *de novo* y/o incrementada de polipéptidos que modulan la señalización de CRH.

La introducción del constructo en la célula hospedadora puede efectuarse por transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, infección, u otros métodos. Tales métodos se describen en muchos manuales estándar de laboratorio, tales como Davis, Basic Methods in Molecular Biology (1986). Se contempla específicamente que los polipéptidos, que modulan la señalización de CRH, pueden ser expresados de hecho por una célula hospedadora que carece de un vector recombinante.

Adicionalmente, la expresión de los nucleótidos de acuerdo con la invención puede realizarse también utilizando un mRNA sintético producido *in vitro*. El mRNA sintético o mRNA aislado de células capaces de modular la señalización de CRH puede traducirse eficientemente en diversos sistemas exentos de células con inclusión, pero sin carácter limitante, de extractos de germen de trigo y extractos de reticulocitos, así como traducirse eficientemente en sistemas basados en células que incluyen, pero sin carácter limitante, microinyección en oocitos de rana, prefiriéndose generalmente la microinyección en oocitos de rana.

#### *Animales transgénicos no humanos*

La presente invención se refiere también a un método para la producción de un animal transgénico no humano, preferiblemente ratón transgénico, que comprende la introducción de un polinucleótido o vector de la invención en una célula germinal, una célula embrionaria, célula madre o un huevo o una célula derivada del mismo. El animal no humano puede utilizarse de acuerdo con un método de selección de la invención descrito en esta memoria y puede ser un animal sano no transgénico, o puede tener un trastorno de absorción o reabsorción de fosfato, preferiblemente un trastorno causado por al menos una mutación en la proteína que modula la señalización de CRH. Tales animales transgénicos son perfectamente adecuados para, v.g. estudios farmacológicos de fármacos en conexión con formas mutantes de los polipéptidos arriba descritos. La producción de embriones transgénicos y la selección de los mismos pueden realizarse, v.g., como se describe por A. L. Joyner Ed., Gene Targeting, A Practical Approach (1993), Oxford University Press. El DNA de las membranas embrionarias de los embriones puede analizarse utilizando, v.g., transferencias Southern con una sonda apropiada; véase arriba.

Preferiblemente, el animal transgénico no humano de la invención comprende adicionalmente al menos un alelo desactivado de tipo salvaje del gen codificante de la proteína moduladora de CRH del mamífero correspondiente; véase arriba. Esta realización permite por ejemplo el estudio de la interacción de diversas formas mutantes de polipéptidos de acuerdo con la invención en cuanto al comienzo de los síntomas clínicos de enfermedad relacionados con trastornos en el metabolismo de CRH. Todas las solicitudes que se han expuesto anteriormente en esta memoria con respecto a un animal transgénico son aplicables también a animales que llevan 2, 3 o más transgenes; v.g. codificantes de la endopeptidasa neutra (NEP). Podría ser deseable también desactivar la proteína que modula la expresión o función de la señalización de CRH en una cierta etapa del desarrollo y/o la vida del animal transgénico. Esto puede conseguirse utilizando, por ejemplo, promotores específicos de tejido, experimentales y/o regulados por la célula y/o inducibles, que impulsan la expresión de, v.g., un transcrito antisentido o dirigido por ribozima contra el RNA que codifica la proteína capaz de modular la señalización de CRH; véase también arriba. Un sistema inducible adecuado es por ejemplo la expresión del gen regulado por tetraciclina como ha sido descrito, v.g., por Gossen y Bujard (Proc. Natl. Acad. Sci. 89 USA (1992), 5547-5551) y Gossen *et al.* (Trends Biotech. 12 (1994), 58-62). Análogamente, la expresión de la proteína mutante que modula la señalización de CRH puede ser controlada por dichos elementos reguladores.

Adicionalmente, la invención se refiere también a una célula transgénica de mamífero que contiene (integrada preferiblemente de manera estable en su genoma) una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención o parte de la misma, en donde la transcripción y/o expresión de la molécula de ácido nucleico o parte de la misma conduce a una reducción de la síntesis de una proteína que modula la señalización de CRH.

En una realización preferida, la reducción se consigue por un efecto mutante antisentido, de sentido, ribozima, co-supresión y/o efecto dominante. "Antisentido" y "nucleótidos antisentido" significa constructos de DNA o RNA que bloquean la expresión del producto génico existente naturalmente.

La provisión del polinucleótido de acuerdo con la invención abre la posibilidad de producir animales transgénicos no humanos con un nivel reducido de la proteína como se describe arriba y, por tanto, con un defecto en el metabolismo del fosfato. Métodos para conseguir esto son bien conocidos para las personas expertas en la técnica. Dichos métodos

5 incluyen, por ejemplo, la expresión de RNA antisentido, ribozimas, de moléculas que combinan funciones antisentido y de ribozima y/o de moléculas que proporcionarán un efecto de cosupresión; véase también arriba. Cuando se utiliza el enfoque antisentido para reducción de la cantidad de proteína que modula la señalización de CRH en las células, la molécula de ácido nucleico que codifica el RNA antisentido es preferiblemente de origen homólogo con respecto a la especie animal utilizada para la transformación. Sin embargo, es también posible utilizar moléculas de ácido nucleico que exhiben un alto grado de homología respecto a las moléculas de ácido nucleico existentes endógenamente que codifican una proteína que modula la señalización de CRH. En este caso, la homología es preferiblemente mayor que 80%, particularmente mayor que 90% y todavía más preferiblemente mayor que 95%. La reducción de la síntesis de una proteína de acuerdo con la invención en las células transgénicas de mamífero puede dar como resultado una alteración en, v.g., la reabsorción de adenina. En los animales transgénicos que contienen dichas células, esto puede conducir a diversos cambios fisiológicos, del desarrollo y/o morfológicos.

15 Así pues, la presente invención se refiere también a animales transgénicos no humanos que comprenden las células transgénicas arriba descritas. Éstas pueden exhibir, por ejemplo, una deficiencia en el metabolismo del CRH comparadas con los animales de tipo salvaje debido a la presencia estable o transitoria de un DNA extraño que da como resultado al menos una de las características siguientes:

- (a) disrupción de (uno o más) genes endógenos que codifican una proteína capaz de modular la señalización de CRH;
- (b) expresión de al menos un RNA antisentido y/o ribozima contra un transcrito que comprende un polinucleótido de la invención;
- 20 (c) expresión de un mRNA de sentido y/o no traducible del polinucleótido de la invención;
- (d) expresión de un anticuerpo de la invención;
- (e) incorporación de una copia funcional o no funcional de la secuencia reguladora de la invención; o
- (f) incorporación de una molécula de DNA recombinante o vector de la invención.

25 Con los polipéptidos, sus polinucleótidos codificantes y vectores de la invención, es posible ahora estudiar *in vivo* e *in vitro* la eficiencia de los fármacos en relación con mutaciones particulares en la proteína que modula las señalizaciones de CRH de un paciente y el fenotipo afectado. Adicionalmente, pueden utilizarse formas mutantes de los polipéptidos de la invención para determinar el perfil farmacológico de los fármacos y para la identificación y preparación de fármacos ulteriores que puedan ser eficaces para el tratamiento de trastornos relacionados con el metabolismo del CRH, en particular para la mejora del estrés o depresión inducidos por CRH.

30 Se apreciará por tanto que la presente invención se refiere también a un método para prevenir, tratar o mejorar una condición médica relacionada con un trastorno del metabolismo de CRH que incluye trastornos relacionados con los receptores de CRH, que comprende administrar a un mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de los polipéptidos, los polinucleótidos o los vectores que codifican una proteína susceptible de modulación de la señalización de CRH de la presente invención.

### 35 *Ensayos de Diagnóstico*

Esta invención se refiere adicionalmente al uso de polinucleótidos de la presente invención como reactivos de diagnóstico. La detección de una forma mutada del gen caracterizado por el polinucleótido de SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.15, SEQ ID NO.17, SEQ ID NO.19, SEQ ID NO.21, SEQ ID NO.23, SEQ ID NO.25, SEQ ID NO.26, SEQ ID NO.27, SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29, SEQ ID NO.30, SEQ ID NO.31, SEQ ID NO.32, SEQ ID NO.34, SEQ ID NO.36, SEQ ID NO.38 y SEQ ID NO.40 que está asociado con una disfunción proporcionará una herramienta de diagnóstico que puede sumarse a, o definir, un diagnóstico de una enfermedad, o propensión a una enfermedad, que es resultado de la infraexpresión, sobreexpresión o expresión espacial o temporal alterada del gen. Los individuos que llevan mutaciones en el gen pueden ser detectados al nivel del DNA por una diversidad de técnicas.

45 Se apreciará por tanto que esta invención proporciona un método de diagnóstico de una condición patológica o una propensión a una condición patológica en un individuo relacionada con un trastorno de la actividad del CRH que comprende:

- (a) determinar la presencia o ausencia de una mutación en el polinucleótido de acuerdo con la invención; y
- (b) diagnosticar una condición patológica o propensión a una condición patológica basada en la presencia o ausencia de dicha mutación.

50 Los ácidos nucleicos para el diagnóstico pueden obtenerse a partir de las células de un individuo, por ejemplo de sangre, orina, saliva, o material de biopsia tisular o autopsia. El DNA genómico puede utilizarse directamente para la detección o puede amplificarse enzimáticamente por utilización de PCR u otras técnicas de amplificación antes del análisis. Pueden utilizarse también RNA o cDNA de manera similar. Pueden detectarse delecciones e inserciones por un

- cambio en el tamaño del producto amplificado en comparación con el genotipo normal. Pueden identificarse mutaciones puntuales por hibridación de DNA amplificado a secuencias nucleotídicas marcadas de acuerdo con la invención. Secuencias perfectamente coincidentes pueden distinguirse de los dúplex incorrectamente apareados por digestión con RNasa o por diferencias en las temperaturas de fusión. Pueden detectarse también diferencias en la secuencia de DNA por alteraciones en la movilidad electroforética de fragmentos de DNA en columnas o geles de electroforesis capilar, con o sin agentes desnaturalizantes, o por secuenciación directa del DNA (v.g., Myers *et al.*, *Science* (1985) 230:1242). Los cambios de secuencia en localizaciones específicas pueden revelarse también por endonucleasas de restricción específicas, ensayos de protección contra las nucleasas, tales como la protección contra RNasa y S1 o un método de escisión química (véase Cotton *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* (1985) 85: 4397-4401). En otra realización, puede construirse una red de sondas oligonucleotídicas que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína capaz de modular la actividad de CRH o fragmentos de la misma para realizar una selección eficiente de v.g., mutaciones genéticas. Los métodos de tecnología de redes son bien conocidos y tienen aplicabilidad general, pudiendo utilizarse para abordar una diversidad de cuestiones de genética molecular que incluyen expresión de genes, enlaces genéticos, y variabilidad genética (véase por ejemplo; M. Chee *et al.*, *Science*, Vol. 274, pp. 610-613 (1996)).
- Los ensayos de diagnóstico ofrecen un proceso para diagnosticar o determinar una propensión a las enfermedades por detección de mutaciones en el gen codificante de la proteína moduladora de CRH por los métodos descritos. Adicionalmente, dichas enfermedades pueden diagnosticarse por métodos que comprenden determinar a partir de una muestra derivada de un individuo un nivel anormalmente reducido o incrementado de polipéptido o mRNA, así como por determinación a partir de dichas muestras de la presencia de derivados de proteína comparada con la estructural normal (véase arriba). La expresión reducida o incrementada puede medirse al nivel del RNA utilizando cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica para la cuantificación de polinucleótidos, tales como, por ejemplo, amplificación de ácido nucleico, por ejemplo por PCR, RT-PCR; protección contra RNasas, transferencia Northern y otros métodos de hibridación. Técnicas de ensayo que pueden utilizarse para determinar los niveles de una proteína, tal como un polipéptido de la presente invención, en una muestra derivada de un hospedador son bien conocidas por los expertos en la técnica. Dichos métodos de ensayo incluyen radioinmunoensayos, ensayos de fijación competitiva, análisis por transferencia Western, y ensayos ELISA. Técnicas de ensayo que pueden utilizarse para determinar la presencia de derivados de proteínas o variantes comprenden, entre otras, la espectrometría de masas.
- Así, en otro aspecto, la presente invención proporciona un método de diagnóstico de una condición patológica o una propensión a una condición patológica en un individuo relacionada con un trastorno de exposición prolongada al CRH que comprende:
- determinar la presencia o cantidad de expresión del polipéptido o un derivado del mismo de acuerdo con la invención en una muestra biológica; y
  - diagnosticar una condición patológica o propensión a una condición patológica basándose en la presencia o cantidad de expresión del polipéptido o un derivado del mismo.
- En particular, la presente invención proporciona un método de diagnóstico de un perfil de expresión génica inducido por CRH en un individuo, comprendiendo dicho método:
- obtener una muestra biológica de dicho individuo; y
  - determinar la cantidad de al menos una proteína que modula la señalización de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en dicha muestra biológica;
- en el cual la proteína que modula la señalización de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) es SEQ ID NO. 20. En una realización alternativa, el método de diagnóstico de un perfil de expresión inducido por CCRH no está limitado al menos una proteína de acuerdo con la invención, sino que requiere la evaluación simultánea de los niveles de expresión del grupo de proteínas identificadas como implicadas en la señalización del CRH, es decir las proteínas que tienen las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO.10, SEQ ID NO.12, SEQ ID NO.14, SEQ ID NO.16, SEQ ID NO.18, SEQ ID NO.20, SEQ ID NO.22, SEQ ID NO.24, SEQ ID NO.33, SEQ ID NO.35, SEQ ID NO.37, SEQ ID NO.39 y SEQ ID NO.41.
- Preferiblemente, la cantidad de dichas proteínas se determina sea al nivel de proteína, utilizando preferiblemente anticuerpos que se fijan a ella, o al nivel de la transcripción génica, utilizando preferiblemente sondas que se fijan a un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 20.
- Alternativamente, el perfil de expresión génica inducida por CRH se determina por evaluación del nivel de transcripción génica de un gen que comprende la secuencia de ácido nucleico seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.15, SEQ ID NO.17, SEQ ID NO.19, SEQ ID NO.21, SEQ ID NO.23, SEQ ID NO.25, SEQ ID NO.26, SEQ ID NO.27, SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29, SEQ ID NO.30, SEQ ID NO.31, SEQ ID NO.32, SEQ ID NO.34, SEQ ID NO.36, SEQ ID NO.38 y SEQ ID NO.40. Métodos para determinar el nivel de transcripción génica han sido descritos anteriormente en esta memoria y comprenden, en una realización preferida, el uso de una sonda que se fija, y con preferencia se fija selectivamente, a un polinucleótido seleccionado del grupo constituido por SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.11, SEQ ID NO.13, SEQ ID NO.15, SEQ ID NO.17, SEQ ID NO.19, SEQ ID NO.21, SEQ ID

NO.23, SEQ ID NO.25, SEQ ID NO.26, SEQ ID NO.27, SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29, SEQ ID NO.30, SEQ ID NO.31, SEQ ID NO.32, SEQ ID NO.34, SEQ ID NO.36, SEQ ID NO.38 y SEQ ID NO. 40 o el complemento del mismo. En otra realización, puede construirse una red de sondas oligonucleotídicas que comprenden una secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención o fragmentos de la misma, a fin de conducir una selección eficiente del nivel de transcripción génica en la muestra de un individuo.

Se describe también un kit de diagnóstico que comprende:

(a) un polinucleótido de la presente invención, preferiblemente la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO.1, SEQ ID NO.2, SEQ ID NO.3, SEQ ID NO.4, SEQ ID NO.5, SEQ ID NO.6, SEQ ID NO.7, SEQ ID NO.8, SEQ ID NO.9, SEQ ID NO.11, SEQ ID NO. 13, SEQ ID NO.15, SEQ ID NO.17, SEQ ID NO.19, SEQ ID NO.21, SEQ ID NO.23, SEQ ID NO.25, SEQ ID NO.26, SEQ ID NO.27, SEQ ID NO.28, SEQ ID NO.29, SEQ ID NO.30, SEQ ID NO.31, SEQ ID NO.32, SEQ ID NO.34, SEQ ID NO.36, SEQ ID NO. 38 y SEQ ID NO. 40 o un fragmento del mismo;

(b) una secuencia de nucleótidos complementaria a la de (a);

(c) un polipéptido de la presente invención, preferiblemente el polipéptido de SEQ ID NO. NO.10, SEQ ID 12, SEQ ID NO.14, SEQ ID NO.16, SEQ ID NO.18, SEQ ID NO.20, SEQ ID NO.22, SEQ ID NO.24, SEQ ID NO.33, SEQ ID NO.35, SEQ ID NO.37, SEQ ID NO.39 y SEQ ID NO.41 o un fragmento del mismo; o

(d) un anticuerpo para un polipéptido de la presente invención, preferiblemente para el polipéptido de SEQ ID NO.10, SEQ ID 12, SEQ ID NO.14, SEQ ID NO.16, SEQ ID NO.18, SEQ ID NO.20, SEQ ID NO.22, SEQ ID NO.24, SEQ ID NO.33, SEQ ID NO.35, SEQ ID NO.37, SEQ ID NO.39 y SEQ ID NO.41 y medios de detección opcionalmente adecuados.

Se apreciará que en cualquier kit de este tipo, (a), (b), (c) o (d) pueden comprender un componente sustancial. Un kit de este tipo será útil en el diagnóstico de una enfermedad o propensión a una enfermedad, particularmente trastornos relacionados con el metabolismo de CRH tales como estrés o depresión inducidas por CRH.

Las secuencias de nucleótidos de la presente invención son valiosas también para localización de cromosomas. Estas secuencias están direccionadas específicamente para, y pueden hibridarse con, una localización particular en un cromosoma humano individual. El mapeado de secuencias relevantes para los cromosomas de acuerdo con la presente invención es un primer paso importante en la correlación de dichas secuencias con la enfermedad asociada al gen. Una vez que una secuencia se ha mapeado a una localización cromosómica precisa, la posición física de la secuencia en el cromosoma puede correlacionarse con datos del mapa genético. Dichos datos se encuentran, por ejemplo, en V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (disponible en línea de Johns Hopkins University Welch Medical Library). La relación entre genes y enfermedades que se han mapeado a la misma región cromosómica se identifica luego por análisis de enlaces (herencia común de genes físicamente adyacentes). El gen de la presente invención mapea al cromosoma humano 15.

Pueden determinarse también diferencias en el cDNA o la secuencia genómica entre individuos afectados y no afectados. Si se observa una mutación en algunos o la totalidad de los individuos afectados pero no en ningún individuo normal, entonces es probable que la mutación sea el agente causante de la enfermedad.

Las secuencias de nucleótidos de la presente invención son valiosas también para localización tisular. Dichas técnicas permiten la determinación de los patrones de expresión de los polipéptidos de acuerdo con la invención en tejidos por detección de los mRNAs que codifican los mismos. Estas técnicas incluyen técnicas de hibridación *in situ* y técnicas de amplificación de nucleótidos, por ejemplo PCR. Dichos métodos son bien conocidos en la técnica. Los resultados de estos estudios proporcionan una indicación de las funciones normales de los polipéptidos en el organismo.

Los polipéptidos de la invención o sus fragmentos o análogos de los mismos, o células que expresan los mismos, pueden utilizarse también como inmunógenos para producción de anticuerpos inmuno-específicos para los polipéptidos de la presente invención. El término "inmuno-específico" significa que los anticuerpos tienen afinidad sustancialmente mayor para los polipéptidos de la invención que su afinidad para otros polipéptidos afines en la técnica anterior.

Así, en otra realización, esta solicitud describe un anticuerpo mono-específico inmunológicamente reactivo con una purina-permeasa de mamífero. En una realización preferida, dicho anticuerpo es inmunológicamente reactivo con un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de un grupo constituido por: SEQ ID NO.10, SEQ ID 12, SEQ ID NO.14, SEQ ID NO.16, SEQ ID NO.18, SEQ ID NO.20, SEQ ID NO.22, SEQ ID NO.24, SEQ ID NO.33, SEQ ID NO.35, SEQ ID NO.37, SEQ ID NO.39 y SEQ ID NO.41; y análogos funcionales del mismo, o dicho anticuerpo bloquea la actividad de una proteína que modula la señalización de CRH.

Los anticuerpos generados contra los polipéptidos de la presente invención pueden obtenerse por administración de los polipéptidos o fragmentos vehículos de epítopo, análogos o células que expresan éstos a un animal, preferiblemente un animal no humano, utilizando protocolos de rutina. Para la preparación de anticuerpos monoclonales, puede utilizarse cualquier técnica que proporcione anticuerpos producidos por cultivos continuos de líneas de células. Ejemplos incluyen la técnica del hibridoma (Kohler, G. y Milstein, C., *Nature* (1975) 256; 495-497), la técnica del trioma, la técnica del

hibridoma de las células B humanas (Kozbor *et al.*, *Immunology Today* (1983) 4:72) y la técnica del hibridoma EBV (Cole, *et al.*, *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, pp. 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985).

Técnicas para la producción de anticuerpos monocatenarios, tales como los descritos en la patente U.S. NO. 4.946.778, pueden adaptarse también para producir anticuerpos monocatenarios para los polipéptidos de esta invención. Asimismo, ratones transgénicos, u otros organismos, que incluyen otros animales, pueden utilizarse para expresar anticuerpos humanizados.

Los anticuerpos arriba descritos pueden emplearse para aislar o identificar clones que expresan el polipéptido o para purificar los polipéptidos por cromatografía de afinidad.

Los anticuerpos contra los polipéptidos de la presente invención pueden emplearse también para tratar los trastornos relacionados con el metabolismo de CRH.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a proteínas de fusión solubles modificadas por ingeniería genética, que comprenden un polipéptido de la presente invención, o un fragmento del mismo, y diversas porciones de las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulinas de diversas subclases (IgG, IgM, IgD, IgE). Como inmunoglobulina se prefiere la parte constante de la cadena pesada de IgG humana, particularmente IgG 1, donde la fusión tiene lugar en la región bisagra. En una realización particular, la parte Fc puede eliminarse simplemente por incorporación de una secuencia de escisión que puede ser escindida por ejemplo con el factor Xa. de coagulación de la sangre. Adicionalmente, esta invención se refiere a procesos para la preparación de estas proteínas de fusión por ingeniería genética, y al uso de los mismos para selección de fármacos, diagnosis y terapia. Un aspecto adicional de la invención se refiere también a polinucleótidos que codifican tales proteínas de fusión. Ejemplos de la tecnología de las proteínas de fusión pueden encontrarse en las Solicitudes de Patente Internacional núms. WO 94/29458 y WO 94/22914.

#### *Utilidad Terapéutica*

Un aspecto adicional de la invención se refiere a una formulación (composición) inmunológica/vacunal que, cuando se introduce en un hospedador mamífero, induce una respuesta inmunológica en dicho mamífero para un polipéptido de la presente invención en donde la composición comprende un polipéptido o polinucleótido de la presente invención. La formulación de vacuna puede comprender adicionalmente un vehículo adecuado. Dado que un polipéptido puede descomponerse en el estómago, el mismo se administra preferiblemente por vía parenteral (por ejemplo, inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa, o intradérmica). Formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión o agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en envases de dosis unitaria o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales sellados y pueden guardarse en una condición liofilizada que requiere únicamente la adición del vehículo líquido estéril inmediatamente antes de su utilización. La formulación de vacuna puede incluir también sistemas adyuvantes para mejora de la inmunogenicidad de la formulación, tales como sistemas de aceite en agua y otros sistemas conocidos en la técnica. La dosificación dependerá de la actividad específica de la vacuna y puede ser determinada fácilmente por experimentación de rutina.

En otro enfoque adicional, la expresión del gen que codifica las proteínas que modulan la señalización de CRH puede inhibirse utilizando técnicas de bloqueo de la expresión. Técnicas conocidas de este tipo implican el uso de secuencias antisentido, generadas internamente o administradas externamente (véase, por ejemplo, O'Connor, *J. Neurochem* (1991) 56:560; Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, Boca Raton, FL (1988)). Alternativamente, pueden suministrarse oligonucleótidos que forman hélices triples ("triplex") con el gen (véase, por ejemplo, Lee *et al.*, *Nucleic Acids Res* (1979) 6:3073; Cooney *et al.*, *Science* (1988) 241:456; Dervan *et al.*, *Science* (1991) 251:1360). Estos oligómeros pueden ser administrados *per se*, o los oligómeros relevantes pueden expresarse *in vivo*. Los oligonucleótidos antisentido sintéticos o triples pueden comprender bases modificadas o cadenas principales modificadas. Ejemplos de las últimas incluyen metilfosfonato, fosforotioato o cadenas principales de ácido nucleico peptídico. Tales cadenas principales se incorporan en el oligonucleótido antisentido o triplex a fin de proporcionar protección contra la degradación por las nucleasas y son bien conocidas en la técnica. Las moléculas antisentido y triplex sintetizadas con éstas y otras cadenas principales modificadas forman parte también de la presente invención.

En otro proceso para inhibir la expresión de un gen diana en una célula, se introduce RNA con carácter parcial o totalmente bicatenario en la célula o en el entorno extracelular. La inhibición es específica en el sentido de que se selecciona una secuencia nucleotídica de una porción de gen diana para producir RNA inhibidor. El RNA puede comprender una o más cadenas de ribonucleótido polimerizado; el mismo puede incluir modificaciones en la cadena principal fosfato-azúcar o en el nucleósido. La estructura bicatenaria puede estar formada por una cadena de RNA simple autocomplementaria o por dos cadenas complementarias. La inhibición es específica de la secuencia en el sentido de que las secuencias de nucleótidos que corresponden a la región dúplex del RNA están direccionadas para la inhibición genética. Se prefiere RNA que contenga una secuencia de nucleótidos idéntica a una porción de la secuencia diana. Ejemplos de la tecnología de inhibición de RNA pueden encontrarse en la Solicitud de Patente Internacional WO 99/32619.

Adicionalmente, la expresión de las proteínas que modulan la señalización de CRH puede prevenirse por utilización de ribozimas específicas de la secuencia de mRNA que codifica dicha proteína. Las ribozimas son RNAs catalíticamente activos que pueden ser naturales o sintéticos (véase por ejemplo Usman, N. *et al.*, Curr. Opin. Struct. Biol. (1996) 6(4), 527-33.) Las ribozimas sintéticas pueden diseñarse para escindir específicamente los mRNAs mencionados anteriormente en posiciones seleccionadas previniendo con ello la traducción de dichos mRNAs en polipéptido funcional. Pueden sintetizarse ribozimas con una cadena principal natural ribosa-fosfato y bases naturales, como se encuentran normalmente en las moléculas de RNA. Alternativamente, las ribozimas pueden sintetizarse con cadenas principales no naturales para proporcionar protección contra la degradación por las ribonucleasas, por ejemplo, 2'-O-metil-RNA, y pueden contener bases modificadas.

Para el tratamiento de condiciones anormales relacionadas con una infraexpresión de proteínas que modulan la señalización de CRH, están disponibles también varios enfoques. Un enfoque comprende administrar a un individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que activa un polipéptido de la presente invención, es decir, un agonista como se ha descrito arriba, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, para aliviar con ello la condición anormal. Alternativamente, puede emplearse terapia génica para conseguir la producción endógena de purina-permeasa de mamífero por las células relevantes en el individuo. Por ejemplo, puede modificarse un polinucleótido de la invención por ingeniería genética para expresión en un vector retroviral deficiente en replicación, como se ha expuesto anteriormente. El constructo de expresión retroviral puede aislarse e introducirse luego en una célula de empaquetamiento transducida con un vector plasmídico retroviral que contiene el RNA codificante de un polipéptido de la presente invención de tal modo que la célula de empaquetamiento produce ahora partículas virales infecciosas que contienen el gen de interés. Estas células productoras pueden administrarse a un individuo para modificación de las células por ingeniería genética *in vivo* y expresión del polipéptido *in vivo*. Para una revisión de la terapia génica, véase capítulo 20, *Gene Therapy and other Molecular Genetic-based Therapeutic Approaches* (y las referencias citadas en dicho lugar) en Human Molecular Genetics, T. Strachan y A.P. Read, BIOS Scientific Publishers Ltd (1996). Otro enfoque consiste en administrar una cantidad terapéutica de un polipéptido de la presente invención en combinación con un vehículo farmacéutico adecuado.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido, tal como la forma soluble de un polipéptido de la presente invención, péptido agonista/antagonista o compuesto de molécula pequeña, en combinación con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Tales vehículos incluyen, pero sin carácter limitante, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol, y combinaciones de los mismos. La invención se refiere adicionalmente a paquetes y kits farmacéuticos que comprenden uno o más envases llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones de la invención arriba mencionadas. Los polipéptidos y otros compuestos de la presente invención pueden emplearse solos o en asociación con otros compuestos, tales como compuestos terapéuticos.

La composición se adaptará a la ruta de administración, por ejemplo por una ruta sistémica u oral. Formas preferidas de administración sistémica incluyen inyección, típicamente por inyección intravenosa. Pueden utilizarse otras rutas de inyección, tales como subcutánea, intramuscular, o intraperitoneal. Medios alternativos para administración sistémica incluyen administración transmucosal y transdérmica, utilizando penetrantes tales como sales biliares o ácidos fusídicos u otros detergentes. Adicionalmente, si un polipéptido u otros compuestos de la presente invención pueden formularse en una formulación entérica o encapsulada, puede ser posible también la administración oral. La administración de estos compuestos puede ser tópica y/o localizada, en la forma de parches, pomadas, pastas, geles, y análogos.

El intervalo de dosificación requerido depende de la elección del péptido u otros compuestos de la presente invención, la ruta de administración, la naturaleza de la formulación, la naturaleza de la condición del individuo, y el criterio del especialista que tenga a su cargo el tratamiento. Sin embargo, las dosis adecuadas están comprendidas en el intervalo de 0,1-100 µg/kg de individuo. Sin embargo, son de esperar variaciones amplias en la dosificación necesaria teniendo en cuenta la diversidad de compuestos disponibles y las diferentes eficiencias de diversas rutas de administración. Por ejemplo, podría esperarse que la administración oral requiera mayores dosis que la administración por inyección intravenosa. Las variaciones en estos niveles de dosificación pueden ajustarse utilizando rutinas empíricas estándar para optimización, como es bien conocido en la técnica.

Los polipéptidos utilizados en el tratamiento pueden generarse también endógenamente en el individuo, en modalidades de tratamiento a las que se hace referencia a menudo como "terapia génica", como se ha descrito arriba. Así, por ejemplo, las células de un individuo pueden modificarse por ingeniería genética con un polinucleótido, tal como DNA o RNA, para codificar un polipéptido *ex vivo* y por ejemplo, por el uso de un vector retroviral plasmídico. Las células se introducen luego en el individuo.

Esta invención se comprenderá mejor por referencia a los Detalles Experimentales que siguen, pero los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que éstos son únicamente ilustrativos de la invención como se describe más plenamente en las reivindicaciones que siguen más adelante. Adicionalmente, a lo largo de esta solicitud, se citan diversas publicaciones. La descripción de estas publicaciones se incorpora por la presente por referencia en esta memoria a fin de describir más plenamente el estado de la técnica a la que pertenece esta invención.

## PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

*Alojamiento y tratamiento de los animales* - Ratones transgénicos macho CRF que sobreexpresaban C57BL/6J (CRF-OE o TG) y sus hermanos de camada de tipo salvaje (WT) se mantuvieron en una instalación específica exenta de patógenos que cumple todos los requerimientos nacionales y europeos respecto a atención animal. Los ratones se alojaron individualmente 4 semanas antes del comienzo del experimento en una colonia de animales controlada climáticamente con un ciclo oscuridad-luz de 12 horas (con encendido de las luces a las 7:00 EST) con acceso libre a alimento y agua. Antes del tratamiento, ratones de 3 meses de edad se distribuyeron aleatoriamente en 3 grupos, cada uno de los cuales comprendía 4 animales de tipo salvaje y 4 transgénicos. Un grupo no recibió tratamiento alguno, un segundo grupo recibió inyección de vehículo 5 días, dos veces al día (10% ciclodextrano (CD), pH 4) y un tercer grupo recibió 10 mg/kg de un antagonista específico de CRH-RI, R121919 en 10% de CD siguiendo el mismo régimen. 16 horas después del último tratamiento, los animales se sacrificaron para disección de las áreas cerebrales y aislamiento subsiguiente de RNA.

*Preparación de la muestra* - Se disecaron macroscópicamente las áreas cerebrales siguientes de los animales transgénicos y de tipo salvaje: pituitaria, cerebelo, área temporal, hipocampo, corteza frontal, y nucleus accumbens. El tejido cerebral se homogeneizó en Trizol (Invitrogen Life Technologies) utilizando una trituradora Ultra-Turrax T25 (IKA-labortechnik). Se extrajo el RNA total utilizando Trizol de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El RNA total se purificó ulteriormente utilizando el kit Rneasy (Qiagen) con tratamiento de DNase I en la columna.

*Hibridación de microrredes* - Se preparó cRNA como sigue. La transcripción inversa se llevó a cabo sobre 10 µg de RNA total durante 1 h a 42°C utilizando un iniciador T7-oligo(dT)<sub>24</sub> y SuperscriptII RT (Invitrogen Life Technologies). La síntesis del cDNA de la segunda cadena se realizó durante 2 h a 16°C utilizando DNA-polimerasa I de *Escherichia coli*, DNA-ligasa y RNaseH (Invitrogen Life Technologies). Después de extracción con fenol-cloroformo utilizando gel de bloqueo de fase (Eppendorf) se realizó una transcripción in vitro durante 6 h a 37°C utilizando el kit de marcación de transcritos de RNA de alto rendimiento Bioarray con ribonucleótidos marcados con Biotina (Enzo Diagnostics). Las muestras de cDNA se purificaron en columnas Qiagen Rneasy seguido por fragmentación durante 35 minutos a 95°C. Los rendimientos de cRNA estaban comprendidos entre 50 y 100 µg. Las muestras se procesaron en GeneChips (Affymetrix, Santa Clara, CA). Con objeto de comprobar la cantidad de cada muestra, se corrieron 5 µg de cRNA marcado en redes Test2. Los experimentos reales se realizaron sobre redes Murine Genome U74Av2, que contenían equipos de sonda que interrogaban aproximadamente 12.000 genes de ratón de longitud total y agrupaciones EST de la base de datos UniGene (tipo 74). La hibridación se realizó utilizando 15 µg de cRNA durante 16 h a 45°C bajo rotación continua. Las redes se tiñeron en estaciones Affymetrix Fluidics utilizando estreptavidina/ficoeritrina (SAPE) seguido por tinción con anticuerpo anti-estreptavidina y una segunda tinción con SAPE. Subsiguientemente, las redes se escanearon con un Laserscanner HP y los datos se analizaron con el software Microarray Suite (Affymetrix). En esta etapa no se realizó aumento de escala o normalización alguna. La calidad del experimento se evaluó basándose en los porcentajes de llamadas presentes (véase la tabla).

| Área              | Llamadas presentes | 3'/5' β-Actina | 3'/5' GAPDH |
|-------------------|--------------------|----------------|-------------|
| área temporal     | 46,15±1,98%        | 1,96±0,53      | 1,46±0,38   |
| hipocampo         | 46,27±1,89%        | 1,58±0,39      | 1,22±0,29   |
| cerebelo          | 47,14±2,13         | 1,67±0,37      | 0,97±0,08   |
| corteza frontal   | 44,68±2,23         | 1,85±0,39      | 1,29±0,26   |
| nucleus accumbens | 44,27±2,11         | 2,69±0,85      | 2,52±1,20   |
| pituitaria        | 45,33±1,67         | 1,53±0,28      | 1,25±0,21   |

Las muestras con rendimientos bajos de RNA o porcentajes bajos de llamadas presentes o relaciones 3'/5' que se desviaban se omitieron del análisis subsiguiente. El número de animales que se utilizaron para el análisis se muestra en la tabla.

|                   | WT sin tratar | WT vehículo | WT R121919 | TG sin tratar | TG vehículo | TG R121919 |
|-------------------|---------------|-------------|------------|---------------|-------------|------------|
| área temporal     | 4             | 4           | 4          | 3             | 4           | 3          |
| hipocampo         | 4             | 4           | 4          | 3             | 3           | 4          |
| cerebelo          | 3             | 4           | 4          | 3             | 4           | 3          |
| corteza frontal   | 3             | 4           | 4          | 3             | 4           | 4          |
| nucleus accumbens | 4             | 3           | 4          | 4             | 3           | 4          |

|            | WT<br>sin tratar | WT<br>vehículo | WT<br>R121919 | TG<br>sin tratar | TG<br>vehículo | TG<br>R121919 |
|------------|------------------|----------------|---------------|------------------|----------------|---------------|
| pituitaria | 4                | 4              | 4             | 4                | 3              | 4             |

### Análisis de los datos y selección de genes

Las intensidades brutas en cada red se normalizaron utilizando el algoritmo siguiente:

$$\log l_{\text{alineado}} = \log l_{\text{bruto}} + \left( \log \frac{\sum_{\text{todas las muestras}} l_{\text{bruto}}}{\# \text{ genes} \times \# \text{ muestras}} - \log \frac{\sum_{\text{muestra}} l_{\text{bruto}}}{\# \text{ genes}} \right)$$

5 Básicamente, esta alineación ajusta la intensidad media de una red al valor medio medido. Esta normalización  
compensa las variaciones de red a red en hibridación, lavado y tinción, permitiendo finalmente una comparación  
razonable entre redes. Después de la normalización, se analizaron los datos utilizando el análisis de mapeado espectral  
ponderado (SMA) (7). El mapeado espectral ponderado es un método de análisis multivariante no supervisado que  
10 incluye doble centrado de los datos combinados con una visualización especializada que representa los dos  
componentes principales máximos del principio que explican la mayor parte de la varianza en la serie de datos. Aun  
cuando el doble centrado elimina el componente de "tamaño" de los datos de la red, esta información se reintroduce en  
la visualización por la vía del área de los símbolos que representan el tamaño de las muestras (representadas por  
cuadrados) y genes (representados por círculos) respectivos. Lo que queda son contrastes entre los diferentes genes y  
15 contrastes entre las diferentes muestras de la tabla de datos. Estos contrastes pueden expresarse como relaciones  
debido a la transformación logarítmica realizada por el algoritmo. Los contrastes pueden entenderse como  
especificidades de los diferentes genes para las distintas muestras. Inversamente, aquéllos se refieren también a las  
especificidades o preferencias de las diferentes muestras para algunos de los genes. Por consiguiente, podría afirmarse  
que SMA proporciona una visualización de las interacciones entre genes y muestras. Este método permite la reducción  
20 de una gran serie de datos de microrredes y proporciona medios para inspeccionar e identificar con ello visualmente  
agrupaciones de genes y/o individuos en los datos. En el mapa espectral, las muestras se agrupan pueden interpretarse  
por tanto como similares. Correspondientemente, las muestras localizadas en sitios opuestos de los ejes o en el centro  
puede interpretarse distintas.

Además de este análisis global, la identificación de genes individuales con un nivel de expresión diferente entre grupos  
se identificó, utilizando análisis de significación de datos de microrredes (SAM) (8). SAM identifica genes con cambios  
25 estadísticamente significativos en la expresión por asimilación de una serie de tests t específicos de gen. En contraste  
con el test t clásico, estos tests t específicos de gen no sólo tienen en cuenta la varianza observada para un gen  
particular, sino que incluyen también un denominado factor de elusión que cubre la varianza total a través de todos los  
genes medidos. Los genes con registros mayores que un umbral se consideran potencialmente significativos. Con  
objeto de estimar el número de positivos falsos entre estos genes modificados de modo potencialmente significativo,  
30 SAM utiliza permutaciones para estimar la tasa de descubrimientos falsos. A este fin, se calculan iterativamente los  
valores t sobre las permutaciones de las medidas. El umbral puede ajustarse para identificar conjuntos de genes  
menores o mayores, y se calculan los FDRs correspondientes. Además del delta umbral que influye en el número de  
genes modificados significativamente y un FDR correspondiente, puede imponerse un umbral de número modificaciones  
para desechar aquellos genes que exhiben solamente una diferencia limitada en expresión entre las muestras. Estos  
35 cambios son probablemente de poca significación desde un punto de vista biológico.

Se realizó una agrupación de valores K medios de los datos de expresión obtenidos en un área dada del cerebro  
utilizando el programa OmniViz. Todos los registros que estaban ausentes en todas las muestras se eliminaron y todas  
las señales inferiores a 20 se ajustaron a 20. Esto permitió la agrupación de genes con comportamiento similar.

40 *RT-PCR cuantitativa* - Los datos de microrredes se confirmaron utilizando análisis PCR en tiempo real. La síntesis del  
cDNA de la primera cadena se llevó a cabo sobre 0,5 µg de RNA total utilizando iniciadores hexámeros aleatorios y  
SuperscriptII RT (Invitrogen Life Technologies). La PCR cuantitativa se llevó a cabo en un ciclador ABIPrism 7700  
(Applied Biosystems) utilizando un kit Taqman PCR. Se utilizaron diluciones seriadas de cDNA para generar curvas  
estándar de ciclos umbral frente a los logaritmos de concentración para β-actina, receptor 1 de CRH (Crh-R1), receptor  
45 2 de CRH (Crh-R2), receptor 1 de neurotensina (Ntsr1), receptor 2 de neurotensina (Ntsr2), receptor 3 de neurotensina  
(Ntsr3), 11β-hidroxisteroide-deshidrogenasa I (Hsd11B1), quinasa regulada por suero/glucocorticoides (Sgk) y los  
genes de interés (véase la Tabla para las secuencias de los iniciadores). Una línea de regresión lineal calculada a partir  
de las curvas estándar permitió la determinación de los niveles de transcritos en las muestras de RNA de los diferentes  
grupos de tratamiento para cada área cerebral.

|                          |                                     |
|--------------------------|-------------------------------------|
| $\beta$ -actina directa  | 5'-CATCTTGGCCTCACTGTCCAC-3'         |
| $\beta$ -actina sonda    | 5'-TGCTTGCTGATCCACATCTGCTGGA-3'     |
| $\beta$ -actina inversa  | 5'-GGGCCGGACTCATCGTACT-3'           |
| CRF <sub>2</sub> directa | 5'-GGGAGAACAGAAGCGCCTG-3'           |
| CRF <sub>2</sub> sonda   | 5'-AGAAGGGTGAGGATCCCCCAAATCAGAGT-3' |
| CRF <sub>2</sub> inversa | 5'-CCCTTGTTTCAATCACTCCCA-3'         |
| CRF <sub>1</sub> directa | 5'-TTTCTGAACAGTGAGGTCCGC-3'         |
| CRF <sub>1</sub> sonda   | 5'-CCGGAAGAGGTGGCGGCGA-3'           |
| CRF <sub>1</sub> inversa | 5'-GGGCTCTGATGGAGTGCTTG-3'-         |
| Nts1 directa             | 5'-CGCCGCCGAAAGAAGAG-3'             |
| Nts1 sonda               | 5'-CCAACGTTCTCCAGGAAGCCAAACAG-3'    |
| Nts1 inversa             | 5'-ACGCATGGTTGCTGGACAT-3'           |
| Nts2 directa             | 5'-TGGTGACCAACACGCTCTTCT-3'         |
| Nts2 sonda               | 5'-TCAGCTCGGCAGTGACCCCA-3'          |
| Nts2 inversa             | 5'-AGGAAGACACGGCGTTGTAGA-3'         |
| Nts3 directa             | 5'-GGAAGCCGGAGAACAGCAA-3'           |
| Nts3 sonda               | 5'-TGCGACGCTACCGCAAAGAACA-3'        |
| Nts3 inversa             | 5'GGATATGAAGGCTGCACTCGTT-3'         |
| Sgk directa              | 5'-TGGACCAATGCCCCAGTT-3'            |
| Sgk sonda                | 5'-TCAGTCAAAGCCGTTGGTGTTTTCATTG-3'  |
| Sgk inversa              | 5'-GCCCCGTTTTATAGGTGACATTTTAA-3'    |
| Hsd11b1 directa          | 5'-GGGATAATTAACGCCCAAGCTT-3'        |
| Hsd11b1 sonda            | 5'-CCCAAGGAGGAGTGCGCCCT-3'          |
| Hsd11b1 inversa          | 5'-AGAGCTGTGCCTTTGATGATCTC-3'       |

**Autorradiografía** - La fijación de [<sup>125</sup>I]neurotensina y las radiografías de película de los cerebros de ratones transgénicos macho adultos C57BL/6J y sus hermanos de camada de tipo salvaje, se realizó como ha sido descrito previamente por Moyse *et al.* (12). Se incubaron secciones de 20 micrómetros de espesor con monoyodo-[<sup>125</sup>I]Tyr<sub>3</sub>-neurotensina 0,1 nM (2200 Ci/mmol, Perkin Elmer) en Tris-HCl 50 mM, de pH 7,4, que contenía 0,1% de seroalbúmina bovina, EDTA 1 mM, bacitracina 5 x 10<sup>-5</sup>M, 2 µg/ml de quimostatina y 4 µg/ml de leupeptina. La incubación de secciones adicionales en presencia de neurotensina nativa 1 µM evaluó la tinción inespecífica. La fijación de [<sup>125</sup>I]neurotensina con bloqueo de la Nts2 se realizó en secciones de hipocampo en presencia de levocabastina 1 µM, un antagonista de Nts2. El análisis densitométrico de las radiografías de película se realizó utilizando un analizador digital MCID M4 (Imaging Research, St. Cathalines, ON, Canadá). En cada sección se delinearon interactivamente las estructuras y se midieron los niveles de píxel grises en las áreas reseñadas. Los niveles de píxel grises se convirtieron en radiactividad por mg de tejido utilizando los estándares <sup>125</sup>I co-expuestos y se promediaron para el área medida. Los datos se analizaron estadísticamente por un ANOVA de dos vías y el test Bonferroni's Post-hoc concomitante utilizando software SPSS 11.0.

## RESULTADOS & DISCUSIÓN

Con objeto de estudiar los efectos de la administración prolongada de CRH sobre el sistema nervioso central, se compararon los perfiles de expresión génica en regiones del cerebro derivadas de ratones que sobreexpresaban CRH con los de sus hermanos de camada de tipo salvaje. Adicionalmente, se estudiaron los efectos de la administración del antagonista de CHR-R1 sobre estos niveles de expresión. Las regiones del cerebro investigados en este estudio incluyen pituitaria, nucleus accumbens, corteza frontal, área temporal, hipocampo y cerebelo. La expresión del receptor 1 de CRH (CRH-R1) y 2 (CRH-R2) se midió en áreas del cerebro utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real (RTq). Aunque CRH-R1 era fácilmente detectable, no pudo obtenerse medida fiable alguna para CRH-R2 en estas áreas del cerebro. Los niveles de expresión observados de los receptores CRH en estas áreas del cerebro corresponden con

informes previos de niveles altos de CRH-R1 en el cerebelo y corteza frontal y niveles inferiores expresión de CRH-R2, que es principalmente un receptor periférico (véase la Figura 1) (9).

Los RNA aislados de las diferentes áreas del cerebro derivadas de animales diferentes se procesaron por separado en redes que contenían 12.000 EST murinos. Después de la normalización, se analizaron los datos por área del cerebro. El examen de primer paso de los datos se realizó utilizando análisis de mapeado espectral (SMA), permitiendo una interpretación gráfica global de las respuestas de expresión génica en relación con el grupo de tratamiento y el genotipo. SMA indicaba la ausencia de grandes cambios de expresión entre los grupos de tratamiento para todas las áreas excepto la pituitaria. En todas las áreas del cerebro, la mayor parte de las muestras derivadas de animales transgénicos (TG) se agrupan en una localización distinta de las derivadas de animales de tipo salvaje (WT). Esto alcanza su máxima evidencia al nivel de la pituitaria, en el que se observa una diferencia clara en el patrón de expresión entre los animales TG y WT con las muestras agrupadas en los sitios opuestos del mapa espectral. Considerados en su conjunto, estos datos indican que la exposición a lo largo de la vida a CRH induce cambios en los perfiles de expresión génica en todas las áreas del cerebro estudiadas, observándose los efectos más notables en la pituitaria. Estos cambios en el perfil de expresión no se ven afectados (o lo hacen sólo en un grado limitado) por un tratamiento de 5 días con el antagonista de CRH-R1 como se ilustra por el mapa espectral de la pituitaria.

Con objeto de identificar genes que estaban significativamente modificados, se aplicó el análisis de significación del algoritmo de datos de microrredes (SAM). En concordancia con el SMA, únicamente un número limitado de genes se encontraron modificados significativamente en la mayor parte de las áreas del cerebro (véase información suplementaria). En cambio, en la pituitaria, más de 300 genes se expresaban de modo diferente entre los animales WT y TG. Los perfiles de expresión génica en las áreas estudiadas del cerebro de los ratones que sobreexpresaban CRH ilustraban mecanismos homeostáticos no reducidos con anterioridad en estos animales. En general, los perfiles de expresión observados apuntan hacia un pequeño número de caminos que están afectados en los animales transgénicos (TG).

Los animales TG tienen niveles de glucocorticoides en plasma que son 6-8 veces mayores que en los animales WT (véase la Figura 3). Como consecuencia, los perfiles de expresión génica exhiben una adaptación a estos altos niveles de corticosterona. Esto se consigue tanto por regulación descendente de los intensificadores de la señalización de receptores de glucocorticoides tales como 11 $\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa tipo 1 (11 $\beta$ -HSD1) en el hipocampo como por regulación ascendente de los represores supuestos de este camino de señalización tales como la proteína 5 fijadora de FK506 (Fkbp5) (véase la Figura 4).

Las concentraciones de glucocorticoides en los tejidos se determinan no sólo por los niveles hormonales en plasma, sino también por dos 11 $\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasas intracelulares (tipo 1 y 2), que interconvierten localmente los glucocorticoides activos y las formas inertes 11-ceto. 11 $\beta$ -HSD1, la isoforma predominante del cerebro, parece funcionar como 11 $\beta$ -reductasa predominante, regenerando glucocorticoides activos a partir de las formas 11-ceto. Por estudio de ratones deficientes en 11 $\beta$ -HSD1, se demostró que la regeneración intracelular de glucocorticoides por 11 $\beta$ -HSD1 juega un papel importante en el control del eje HPA. En respuesta a un estrés restringido, estos ratones exhiben niveles exagerados de ACTH y corticosterona. Adicionalmente, los ratones deficientes en 11 $\beta$ -HSD1 eran menos sensibles a la supresión exógena de cortisol de la activación de HPA, lo que sugiere una retroalimentación disminuida de glucocorticoides en estos animales. Teniendo en cuenta la regulación significativamente descendente de 11 $\beta$ -HSD1 en el hipocampo de los sobreexpresantes de CRH, puede considerarse que estos ratones tienen una realimentación de glucocorticoides alterada.

Se encontró que Fbp5 estaba regulada en sentido ascendente en todas las áreas del cerebro testadas, aunque sólo significativamente en un pequeño número de ellas, exhibiendo todas las demás una tendencia similar (Figura 4). Es interesante la observación de que el cambio de la inmunofilina Fkbp5 por Fkbp4 es un primer paso importante para la activación del receptor de glucocorticoides (GR). En el mono ardilla y los géneros de primates del Nuevo Mundo en general, Fkbp5 se ha identificado como un inhibidor potente de la fijación de receptores de glucocorticoides. La observación por los autores de la invención de la inducción de Fkbp5 podría explicarse como una atenuación del GR en los altos niveles persistentes de respuesta de glucocorticoide circulante. Otra indicación de señalización alterada de glucocorticoides es la regulación ascendente de suero/glucocorticoide-quinasa (Sgk) en el cerebelo, el nucleus accumbens y el área temporal (Figura 4). Sgk es una serina/treonina-proteína-quinasa cuya transcripción es inducida por glucocorticoide y suero y está regulada por cambios en el volumen de células anisotónicas e isotónicas. En el cerebro de la rata, se ha demostrado que los niveles de mRNA de Sgk estaban incrementados por deshidratación en el lóbulo temporal, incluyendo el hipocampo. En el mismo estudio se demostró que Sgk aumentaba notablemente la actividad del canal neuronal K<sup>+</sup>, Kv1.3, lo que sugería que Sgk podría participar en la regulación de la excitabilidad neuronal. Es interesante un informe reciente acerca de la facilitación por Sgk de la consolidación de la memoria de aprendizaje espacial en las ratas. Se demostró que Sgk se expresa diferentemente en los animales que aprenden rápidamente frente a los que aprenden lentamente, demostrándose además que la transfección de Sgk en la región CA1 del hipocampo conduce a una eficiencia incrementada en el laberinto de agua (10). A este respecto, es notable que si bien este estudio demuestra que los sobreexpresantes de CRH exhiben niveles altos de mRNA de Sgk, se ha consignado que estos animales exhiben un déficit profundo de aprendizaje (11).

El receptor 2 de neurotensina (Ntsr2) se encontró regulado descendentemente en varios tejidos cerebrales que incluían el hipocampo y el nucleus accumbens excepto la pituitaria (véase la Figura 5). La neurotensina (NT) es un

tridecapéptido que se encuentra en concentración alta en numerosas áreas del CNS, donde la misma juega un papel como neurotransmisor y neuromodulador. Cuando se administra NT por inyección intracerebroventricular, se observan una diversidad de efectos en el CNS, que incluyen hipolocomoción, hipotermia, analgesia, y consumo reducido de alimento. Se han identificado 3 receptores para NT (Ntsr1, 2 y 3). Estudios de ratones deficientes en Ntsr1 demostraron que este receptor es responsable de los efectos de NT sobre la temperatura corporal, el comportamiento de alimentación y la hipolocomoción. Por otra parte, Ntsr2 parece explicar los efectos analgésicos de NT como se demuestra por aplicación de una estrategia antisentido en el cerebro de los ratones. La observación de la regulación descendente de Ntsr2 impulsó a los autores de esta invención a investigar los niveles de expresión de otros miembros de la familia de receptores NT por RTq. Ntsr3 no exhibía cambio alguno en la expresión en todas las áreas testadas. En contraste, Ntsr1 estaba significativamente regulado en sentido descendente en los sobreexpresantes de CHR, acusándose el efecto más pronunciado en el hipocampo (Figura 5). El nivel de regulación descendente era mayor para Ntsr1 que para Ntsr2. Era notable la regulación ascendente tanto de Ntsr1 como Ntsr2 en los animales tratados con vehículo (tanto TG como WT) comparados con los animales sin tratar. Este aumento en el nivel de expresión se anulaba en los animales tratados con R121919, lo que sugería que el estrés repetido inducía la expresión de Ntsr1 (y en menor proporción Ntsr2) y que esta inducción podría ser invertida por un antagonista de CRH-R1 (incluso 16 horas después del último tratamiento). Los datos de los autores de la invención demuestran por primera vez un enlace entre los sistemas CRH y NT en los animales que sobreexpresan CRH, y sugieren un papel para estos receptores NT en el estrés repetido.

Con objeto de evaluar los cambios en el mRNA de Nts1 y Nts2 al nivel de expresión de las proteínas, se evaluó la expresión de los receptores (Nts1-3) por autorradiografía de la fijación de [<sup>125</sup>I]NT en secciones cerebrales. Los datos generados demostraron una regulación descendente global no selectiva (Nts1-3) determinada genéticamente de la capacidad de fijación de [<sup>125</sup>I]NT en el *stratum radiatum* que bordea la región CA1-CA2 del hipocampo ( $-21,8 \pm 3,0\%$ ,  $p < 0,05$ ) y la corteza cingulada anterior ( $-22,2 \pm 2,7\%$ ,  $p < 0,05\%$ ) en los animales CRF-OE frente a los animales WT (Fig. 6). No se observó cambio alguno en el bulbo olfativo, el nucleus accumbens y el septo.

La capacidad de fijación de [<sup>125</sup>I]NT de los animales tratados con vehículo (tanto en los animales WT como en los CRF-OE, no estaba alterada comparada con los animales sin tratar. Sin embargo, la administración subcrónica del antagonista R121919 de CRF<sub>1</sub>, daba como resultado una tendencia ascendente ( $p = 0,057$ ) de la capacidad de fijación de [<sup>125</sup>I]NT para el *stratum radiatum* que bordeaba la región CA1-CA2 comparada con los animales tratados con vehículo, tanto en los animales WT como en los animales CRF-OE. Además, el nivel de fijación de [<sup>125</sup>I]NT en los animales CRF-OE tratados con R121919 era igual al nivel medido en los animales WT sin tratar (Fig. 6).

Para discriminar entre los diferentes receptores, se llevaron a cabo experimentos de fijación de [<sup>125</sup>I]NT en presencia de una concentración saturante de Levocabastina, un antagonista específico de Nts2. Basándose en los resultados de los experimentos de fijación anteriores, se concentró la atención en las secciones de hipocampo del cerebro (Fig. 7). La capacidad de fijación de [<sup>125</sup>I]NT estaba regulada en sentido descendente en los animales CRF-OE comparados con los animales WT, en el *stratum radiatum* ( $-63,8 \pm 6,5\%$ ,  $p < 0,001\%$ ), la corteza granular retroesplénica ( $-49,4 \pm 7,5\%$ ,  $p < 0,001\%$ ) y la corteza temporal ( $-34,8 \pm 3,5\%$ ,  $p < 0,001\%$ ).

Aunque en el hipocampo de los animales WT y CRF-OE tratados con vehículo, los niveles de mRNA de Nts1 estaban regulados en sentido ascendente (Fig. 5), no se observó ninguna de dichas alteraciones en los animales tratados con vehículo al nivel de fijación de [<sup>125</sup>I]NT (Fig. 6 & 7). Globalmente, la capacidad de fijación de [<sup>125</sup>I]NT para Nts1-3 estaba regulada en sentido descendente en el *stratum radiatum* del hipocampo y la corteza cingulada anterior en CRF-OE cuando se comparaban contra los animales WT (Fig. 6). Además, cuando se bloquearon los receptores Nts2 con el antagonista específico de Nts2 Levocabastina, la regulación descendente de la capacidad de fijación de [<sup>125</sup>I]NT era aún más pronunciada en el *stratum radiatum* del hipocampo, la corteza granular retroesplénica y la corteza temporal en los animales CRF-OE frente a sus hermanos de camada WT (Fig. 7). Aunque Nts3 se expresa también en las regiones mencionadas, la afinidad para NT de Nts3 es mucho menor que la de Nts1, lo que sugiere que [<sup>125</sup>I]NT se fija primariamente a Nts1. Adicionalmente, dado que no se observó alteración alguna en el mRNA de Nts3 en la Rtq, los autores de la invención atribuyen esta regulación descendente enteramente a la Nts1.

Sorprendentemente, la expresión de mRNA de Nts1 (menos pronunciada para Nts2) estaba regulada ascendentemente en los animales CRF-OE y WT tratados con vehículo. Este aumento de mRNA podría ser inducido por estrés por inyección repetida y estaba contrarrestado por administración subcrónica del antagonista R121919 de CRF<sub>1</sub>. Sin embargo, esto no se traduce al nivel de los receptores. [<sup>125</sup>I]NT exhibía fijación igual a Nts1 en el hipocampo de los ratones WT y CRF-OE sin tratar y tratados con vehículo (Fig. 6, 7). Sin embargo, al nivel de fijación total de NT, R121919 contrarrestaba la regulación descendente de la fijación de [<sup>125</sup>I]NT. En los animales CRF-OE, R121919 aumentaba el nivel de fijación de [<sup>125</sup>I]NT en el *stratum radiatum* en una magnitud que igualaba la de los animales sin tratar (Fig. 6). Esto podría implicar los receptores CRF<sub>1</sub> en la regulación de la expresión de los receptores NT.

Informes previos demuestran que los glucocorticoides aumentan la expresión de mRNA de NT (+ 92%) y la liberación de NT (+ 100%) en cultivos primarios de neuronas hipotalámicas y núcleos hipotalámicos periventriculares (PVN) (Nicot *et al.*, 1995; Scarceriaux *et al.*, 1995; Souza *et al.*, 1997). Es interesante que estresantes distintos como el baño forzado en agua fría, estrés por inmovilización y estrés por golpes en el rabo suscitan también aumentos en el mRNA de NT en los PVN y el núcleo amigdalóide central de las ratas. A su vez, NT puede conducir a activación del eje HPA como se demuestra por administración intracerebroventricular. Esta activación puede ser bloqueada tanto por CRF alfa-helicoidal, un antagonista de CRF inespecífico y por SR-48450, un antagonista de Nts1-2 (Azzi *et al.*, 1998; Lepee-

Lorgeoux *et al.*, 2000; Nicot *et al.*, 1994; Rowe *et al.*, 1995). Los niveles altos de NT regulan también en sentido descendente Nts1 y Nts2 (Hermans y Maloteaux, 1998). Podría argumentarse que la regulación descendente observada de los niveles de Nts1-2 en los animales CRF-OE está relacionada con sus niveles incrementados de glucocorticoides. Las observaciones de que el hipercortisolismo o la administración de dexametasona da como resultado una regulación descendente selectiva de mRNA de Nts1 (40-70%) en los PVN (Nicot *et al.*, 1995) y que la dexametasona reduce la fijación de [<sup>125</sup>I]NT en los cultivos primarios de neuronas hipotalámicas (Scarceriaux *et al.*, 1996), respaldan esta idea. Así, la regulación descendente de Nts1-2 podría evitar por tanto una liberación ulterior de CRF inducida por NT. Considerados en su conjunto, estos datos demuestran un enlace claro entre el eje HPA y el sistema NT en las áreas límbicas del cerebro. El sistema NT podría tener por tanto un papel regulador en el estrés y la ansiedad repetidos además de los papeles propuestos previamente en la esquizofrenia y la supresión del dolor.

Otros caminos afectados incluyen señalización/detección de calcio intracelular (afín a la hipocalcina 1, calciclina, ...), mielinación (mielina, glicoproteína asociada a mielina, ...), proliferación de células y neurogénesis (Edg2, Id2, GAB1, ...) y la formación de matriz extracelular (decorina, brevicán, ...).

La símil-hipocalcina 1 (Hpcal1) pertenece a la familia de sensores neuronales de calcio de proteínas de fijación de Ca<sup>2+</sup> que juegan un papel en diversos procesos, con inclusión de la modulación de la liberación de neurotransmisores, el control del metabolismo de nucleótidos cíclicos, la biosíntesis de fosfoinosítidos y la regulación indirecta de los canales iónicos. Se ha demostrado que la hipocalcina podría potenciar la protección contra la apoptosis ejercida por las proteínas neuronales inhibitoras de la apoptosis (IAPs).

Los cambios de expresión observados en los genes que codifican las proteínas implicadas en la mielinación, la proliferación celular y la formación de la matriz extracelular sugieren un cambio en la dinámica de la neurogénesis en los sobreexpresantes de CRH. En respaldo de esto pueden citarse los cambios en la expresión observados principalmente en el nucleus accumbens, que implican el receptor 2 acoplado a la proteína G del ácido lisofosfatídico de diferenciación endotelial (Edg2), la proteína 1 asociada con la proteína 2 fijada a receptores de factores de crecimiento (Gab1), el inhibidor 2 de la fijación de DNA (Id2) y el receptor 2 del factor de crecimiento de los fibroblastos (Fgfr2).

Dado que la pituitaria es el órgano diana primario para CRH, se espera que los niveles elevados prolongados de CRH tal como están presentes en los expresantes de CRH induzcan cambios importantes en los perfiles de expresión en la pituitaria de los animales transgénicos. El estado activado de la pituitaria se ilustra por niveles de expresión altos de varias calicreínas, que juegan un papel como enzimas coordinadoras de proproteínas en el procesamiento de diversas hormonas secretadas por la pituitaria. Son notables los niveles elevados de preproencefalina A (10 veces mayores en TG frente a WT) y en menor proporción de prodinorfina (dos veces mayores en TG frente a WT). Este descubrimiento de niveles elevados de opioides endógenos en los sobreexpresantes de CRH está en línea con la noción de que estos opioides representan un sistema modulador importante en la adaptación de un organismo al estrés crónico, compensando la respuesta que el estresante impone sobre el cerebro con los efectos potencialmente perjudiciales que puede producir una respuesta sostenida de estrés. Otros descubrimientos interesantes en la pituitaria incluyen la elevación de los niveles de mRNA de Bdnf, uno de los factores neurotróficos predominantes en el cerebro, y del transportador de aminoácidos inhibidores vesiculares (Vía). Este aumento de Bdnf está en contraste con informes de niveles descendentes de estrés agudo y crónico de Bdnf en el hipocampo (11).

En conclusión, el perfil de expresión génica de diversas áreas del cerebro de ratones que sobreexpresaban CRH esclarecía mecanismos homeostáticos no reconocidos previamente, presentes en estos animales.

La identificación de los genes alterados en ratones sobreexpresantes de CRH comparados con sus hermanos de camada de tipo salvaje permite una caracterización molecular ulterior de este modelo animal de activación crónica pituitaria-adrenal. En esta memoria se proporcionan las herramientas para evaluar al nivel de expresión génica las consecuencias de una exposición prolongada a CRH, que podría conducir finalmente al uso de nuevos marcadores en el estrés, la ansiedad o la depresión tanto en animales como en humanos. Adicionalmente, los autores de la invención demuestran que la administración de un antagonista de CRH-R1 no conduce a una 'normalización' general de los niveles de expresión en los animales transgénicos, aunque al nivel de la pituitaria se mide algún efecto del compuesto. Adicionalmente, el estrés repetido infligido por el tratamiento parece provocar una respuesta en la expresión génica de genes específicos tales como el receptor de neurotensina 1. Este efecto puede ser invertido por antagonistas específicos de CRH-R1, lo que sugiere una relación estrecha entre la neurotensina y CRH.

## REFERENCIAS

1. De Souza EB 1995 Corticotropin-releasing factor receptors: physiology, pharmacology, biochemistry and role in central nervous system and immune disorders. *Psychoneuroendocrinology* 20:789-819
2. Holsboer F 2001 Stress, hypercortisolism and corticosteroid receptors in depression: implications for therapy. *J Affect Disord* 62:77-91
3. Holsboer F, Gerken A, Stalla GK, Muller OA 1987 Blunted aldosterone and ACTH release after human CRH administration in depressed patients. *Am J Psychiatry* 144:229-231

4. Holsboer F, Gerken A, von Bardeleben U, Grimm W, Beyer H, Muller OA, Stalla GK 1986 Human corticotropin-releasing hormone in depression--correlation with thyrotropin secretion following thyrotropin-releasing hormone. *Biol Psychiatry* 21:601-611
5. Nemeroff CB, Owens MJ, Bissette G, Andorn AC, Stanley M 1988 Reduced corticotropin releasing factor binding sites in the corteza frontal of suicide victims. *Arch Gen Psychiatry* 45:577-579
6. Raadsheer FC, Hoogendijk WJ, Stam FC, Tilders FJ, Swaab DF 1994 Increased numbers of corticotropin-releasing hormone expressing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of depressed patients. *Neuroendocrinology* 60:436-444
10. Wouters L, Göhlmann HW, Bijmens L, Kass SU, Molenberghs G, Lewi PJ 2002 Graphical exploration of gene expression data:a comparative study of three multivariate methods. *Biometrics*
8. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G 2001 Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:5116-5121
9. Van Pett K, Viau V, Bittencourt JC, Chan RK, Li HY, Arias C, Prins GS, Perrin M, Vale W, Sawchenko PE 2000 Distribution of mRNAs encoding CRF receptors in brain and pituitaria of rat and mouse. *J Comp Neurol* 428:191-212
15. 10. Tsai KJ, Chen SK, Ma YL, Hsu WL, Lee EH 2002 sgk, a primary glucocorticoid-induced gene, facilitates memory consolidation of spatial learning in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3990-3995
11. Heinrichs SC, Stenzel-Poore MP, Gold LH, Battenberg E, Bloom FE, Koob GF, Vale WW, Pich EM 1996 Learning impairment in transgenic mice with central overexpression of corticotropin-releasing factor. *Neuroscience* 74:303-311
20. 12. Moyse E, Rostene W, Vial M, Leonard K, Mazella J, Kitabgi P, Vincent JP, Beaudet A (1987) Distribution of neurotensin binding sites in rat brain: a light microscopic radioautographic study using monoiodo [125I]Tyr3-neurotensin. *Neuroscience* 22: 525-536.
13. Nicot A, Berod A, Gully D, Rowe W, Quirion R, de Kloet ER, Rostene W (1994) Blockade of neurotensin binding in the rat hypothalamus and of the central action of neurotensin on the hypothalamic-pituitaria-adrenal axis with non-peptide receptor antagonists. *Neuroendocrinology* 59: 572-578.
25. 14. Scarceriaux V, Pelaprat D, Forgez P, Lhiaubet AM, Rostene W (1995) Effects of dexamethasone and forskolin on neurotensin production in rat hypothalamic cultures. *Endocrinology* 136: 2554-2560.
15. Souaze F, Rostene W, Forgez P (1997) Neurotensin agonist induces differential regulation of neurotensin receptor mRNA. Identification of distinct transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J Biol Chem* 272: 10087-10094.
30. 16. Azzi M, Betancur C, Sillaber I, Spangel R, Rostene W, Berod A (1998) Repeated administration of the neurotensin receptor antagonist SR 48692 differentially regulates mesocortical and mesolimbic dopaminergic systems. *J Neurochem* 71: 1158-1167.
17. Lepee-Lorgeoux I, Betancur C, Souaze F, Rostene W, Berod A, Pelaprat D (2000) Regulation of the neurotensin NT(1) receptor in the developing rat brain following chronic treatment with the antagonist SR 48692. *J Neurosci Res* 60: 362-369.
35. 18. Nicot A, Berod A, Gully D, Rowe W, Quirion R, de Kloet ER, Rostene W (1994) Blockade of neurotensin binding in the rat hypothalamus and of the central action of neurotensin on the hypothalamic-pituitaria-adrenal axis with non-peptide receptor antagonists. *Neuroendocrinology* 59: 572-578.
19. Rowe W, Viau V, Meaney MJ, Quirion R (1995) Stimulation of CRH-mediated ACTH secretion by central administration of neurotensin: evidence for the participation of the paraventricular nucleus. *J Neuroendocrinol* 7: 109-117.
- 40.

## LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO.1

tttttttttttttaccaaaaatatcatittattctttaatggaaaaaggcattaatatccaacaagggaatcacattttaataaccctatagataagaaacaggc  
tccaggaacattcaagcagcagtcatgagggaataatgttccaatagcccgattttctca

SEQ ID NO.2

[illegible]

SEQ ID NO. 3

ttttttttttttggcatgaagtgtgtttattaggaagaacaciccagcactcacaatggctttcacaacacttagcctaggctggaacacaaaaggga  
tatcacaacagatgcattgggttttacttgcctatcatcaccaaaagaattgcatggcagtaattttcaggctgtaaaaactacatctatggcaccaacatgg

## SEQ ID NO.4

atatttaactcaaggcagaggaagattatcccgactaataatccattcagctgatgaactctgattattagagagcagctcccaataagcagctttaagt  
tccgtatctattttaaacatcagctgattaccttcaatatggtaagatgtttttcagtggaatgggtcatalatttggtgcagtggttgatgttcacaaaaaatgt  
tacaataataactaacata

SEQ ID NO.5

gaaggcgaagatcatttgcattgtttattttaaagtaaacagctgttaagatagaagggcagatgtttcttattgtaaacacgcagttacaaaagagttac  
aagttacaagtcaaaataaatatgacattagaattttgtttgtttgttttaaaaaatacaacacccccctcccggtattgtgagaagtcccaagaaact  
caagatacaaaaaactgtctcatcggcgagaataacattcttcagttctctgaactgnttgcacacacgggaatttggtcattgattcaaaaaga

SEQ ID NO.6

tttttttttttttggntttttacacattattgttcaattttttaatttttttgcagtaatagatgaggcacaaacacctctgtcttccatcactgcaacagaaa  
ggacaatagtcaagggttaacagtgaattaaaaaatacaaacgcctaaaggctctgggagaaacctgactacaattctacgtggagaaact  
tgtaaatgactccagcctgtgtctccgattgcaccacttcacagaccacagaggagggtgtgccagcagaaggacacagccaggctcagctcgcca  
gggtgtgtggcccttgcctccacacctgcgttctgctcagctagctcaatgtcacatctgtactcacatgtcgcctctgttttcaaagtactggtacaa  
acggctagctcctctgctgccg

SEQ ID NO.7

gtggcaacacaggaaactcacagaccttggttattagattattttaataigccagaccaatgaaaggaggacggagcacacaggaaacacctgtgttg  
caggacagagggcagatgtccacagccttgggcacatgcatgtatctctgtgtaattaggcaaatgaatacttaataaccacacaaccgccagacttgggg  
gtggggagaatacacaggccacaggggacatgctttaaaggcagtcagaggctttaataacaggggctgaaccttgcactttatacaaaacttatatatta  
aaagttaaggataaccacggtatatacatcgaacagcgttgggttgagaaaaatgaccaaggagggtggagccttgaatgagaaaggcctntgccatataat  
gtctacttcttctcattccaaagtcaccttgggattatagaataatcagagctgtgtcagtagaataatgaaagctcgtgtgtgtcttaagtctgtaaan  
gccnccgtngcagggaaggngcctttncgagatactgaacctnagaaggacacagctgagactnagttgtgggtgact

SEQ ID NO.8

ttattttgatcattttaatatgccaggctcaatggaaagggaaggacagagcacacaggaaacacctgtatttgcaggacggaggggcagatgtccacagccttg  
ggcatgcatgtatctcctgtgtaattaggcaataatacttaaataccacagcacagccagacttgggggtgggggggaatcacaggccacagggggac  
catgctttaag

SEQ ID NO.9

ttaataaagaagtcagatctgtgggactgtgataggcagcctatttagtgaatggggcttgctctgggagcccaatagagaatctacaagggatgaaa  
 aggtgagccatattccagaatcaggagcctgtccataattctgttactatcagtcgtcagacaatgtcccaagcttctggcattctggtagactccaccc  
 ccacagccacctgactatagctactataagaggggctgttggccctcctcgccttttagccctcaggtttctactctctagcctcctcctcctctctct  
 ctctctctccctcccatctctccacatggccatggctgtttctctcttctaccttcttcttctccttgcctttctacaataaagctctaaaccataaa  
 ctgtctctgatcatgaaggcctgccatgctgaactgccatgcttaggctttctcctaaggagccgagctaacctccaccagaaggccatcctgtgtcc  
 agccacagacctgaccaaggactctcgcggagtggaaccatccagtgccctcctcccccagccctcctcctttcatccctggggccaagtgcacc  
 ccgggcccctattctgttctgttctgtatccagcctgggatgtcggagccgagaatctggtacctggggctgcccctgtctaccaccgctgt  
 gtggggttagtggtctctacagcagacaccaccggggccgtgtgtgaaaagcgtgaacagtcctcctccgaccaccgcccagagcactggatctct  
 ggccgggacacgggttctctccacccctcttccccacatccacagccctgcaaaagatcaggcttgcagacaccactgttcttttgcgcttgcg  
 aagcaatgatcaacccaccgcttctccttggggccacgctcctttagagctgttgcagacaagttccaaagacagcagaaaaattctatgctctgagc  
 actgaagagaaaagattggctataagggttctcctttcacagaattgtccaggatcatgtgccagggtgtgtgacttccacacgcccgtaatggcactgat  
 ggaggtccatctacggagagaatctgaggatgacaatttcatctgaagcatacaggtcctggcatctgtccatggcaaatgtggaccaaacacaa  
 atgggtccagttttatctgactgccaagactgaatgctcagtgccaagcatttggcttggaaaggtgaaaggaagcaatgaacattgtcgaagcc  
 atggagcgttttgggtccaaagatgccaagaccagcaagaagatcaccatttggactgtggacaagictaattcttttactttcgggcattttaccatca  
 aaccattcttctgtgctcataagacaccctacccatctgctcctcaatgtcctgtaattctctgctcactgaagttcttgggttccatatttctcctatcc  
 ccttcaagctagctggaatgcaaaagtaagcttatgattatgaataaaaaactaataaagaaaaaaagtaagatcagattgaattaaaaacaactataca  
 gaggtaccatlaactaaatcaatttatgttcttaagatgtatacaaaaataaagttgataattctgtgaattttgttttaaccaagaaaaagaaaaaaaat  
 aaaaaaggatttttgcacaaacacataccaccaagtgcttatctaaatatacaagaataatgtatatagcacagcagaaagggaacaaaaaacccca  
 actttaaagtaggaaaaatttactatgactgcatgaacggtatttcaaaaccagaaaaatcacattaaaaaaatgttcagtgtccttagtagtgaggggaa  
 tgcaatttgttgaaggtgtggttccaaagatccttggagaacagtggtgtgtagctgtctaaagaatcaggcaaaagccagaaggtgtcctacatt  
 taggagcctgtgtgtcgggggtggagggatgactgctaaactggggagcaaaatgagctaaagtctttacagcaactgtcatttggagagtaaaacc  
 attagaacggagcggcaggttgtgtggaattccacaagggtgggtggaactagtcctatgtatgacagcactgaagccacacagctatggggacagttct  
 ggtgtttacgataaacagggtatgctgccatccagctagcacagcactagggctaaagcgtactgagccctgtcttccgtgggagctgcagagtgaggatgc  
 atgcgtgtgagctgaggtcgaagctgcgctggcagaagagcaggggttgcctgtcagactccagggctcttctctctgagcctgggaaagtgcact  
 ttattgcatctataaagccggggggggggggggggggggaatcgaagggtgaaggaaggttcacagaccccttaacgccccttattgaacctcca  
 gctattctctacactgtacactgagctggcacacagatataggcaagttctattgcacacccctctagtctcctcctgggtatgcaagcctcatattia  
 ggtagatgtgaccttaggaacacaaatattcttaagatcttactaactggttgcctgttcagcttttccacattgacctgtagccccctcaggagggtgaa  
 ggaaaaaaatctcctcttfttcttcttaactcattatgaatttlaagggcactctgtgaaggttcccttccattctggttctgtacattctgagaacacact  
 gtgtttgtgtgagagttggtcctcctagctacactgtctgtcactgagtgaggacaggggttcattaggaataatatttctacacactgtgtat  
 cttttcctagtgttgcatattctagtctgatttggctctgttttaataataaaagaaaaactaaacacaccccttcagagccctatgtctgaaaaatctggcattt  
 ccgtgggttttcttaaggagccctcatttgaaccaacacactgctccttaaggaaatcaatctcaatgccctattatcctccttcttcttctccaggtt  
 gaggtctcagttgctcttttttttctatccctgctgaacctgaaaaacccctctcttttctacagtttttcttccaggccccgctgacttcttttagagcatgg  
 gggggggggggatcaggattgtgtgtgaactgggaggtatcttgcctactcctcctaaccagtgccctgagcaaatcacaaaggaggttggagc  
 catctgccagccctcccccagggcagcctgctggaagagacaagtttagtcatcattgaatggtccttttgccttctctctaaataagaaaggcag  
 cagcttctgtgaggtgcaaaagggtttgtgaattacgggtgtgtggtgaagcccgagttcctcagttcctgcttcttctcagctgactaggcggttaaggga  
 tggtagatgtcttctgcgaacctggaagctgacagacagtcagaattttagatgatacagaagctcgggttaggtaaaataaagacgtactgttttctct  
 taactctgtattttgatccttaagaacccccgatttacttaccagggttctgaagacagggctgagcacattgtgtcaattatactaaagactgtgcatagccca  
 caaataatcttactgtgtatttctgctccttctggaagaaatcaataaaaggacatttgaatcctgtggataatgtgaagccttctgaacttttgaga  
 agggagtgagaagggtcctatttgtgcttactgttccatggctagtggagtaaccattatcagggttggagcaaatctacacttagaattccaattctgatt  
 cttagagtgacaagcagatttctgaactatttggaaagtgtgttactgctgctggccttctgtgttcaaggcgtgggttggccactaggcaagtgaggga  
 aacgtgaccaaaacacactgtgattatcagtcaggaaggtgcaaaagtgtgatccggacacaaatgcacattcaagaacacagagatcaattccaagctg  
 ggagaagagtttgaagaacacgcatagatgacagaaactgtaaggtaaggagcagcttattccgggtgaggtgggacagaggattccaatctcctca  
 cagacatggagaagggggaacaaagcttcagaatcccccttcagggaaggaaggagccagagctaacattctagggtttactgggtgtatcccgacactga  
 gtaattccagagccaaactgacggctattatcctttttacatttataagcaacttttaccagagagattgaacctgttttttgaagaaggaacacac  
 ctgttcttctctctgtatcatctcagcttgaccaattatgctcgtgcacagcaaaagcttcttaagcaagaagagtgactgttctgtattttttctgtacta  
 tgcgtgttttttgaactggtgtatatacagtcagcgtgaatcataaatggccacatttttgaagaacagagattcttgaagtaacagagaggtgaagtgtgct  
 ggaataattatgagtgatgactcagttatggccctctgtataatgctgtcgtttagcttctgtgaaaagtgagacttgcctgttaaccccttgaattgtgt  
 tgcctcagctgtgtgttcgttggtgagagacaagctcattatgtgcagaaagtgaggatggcaaaagaaacaaattgtaccagagaataaaggatggca  
 agatgtgtcgtgtgaagtcgaaggagctgtccttttctgtccctgttcccttctgaagcatcttcttgcactccccctgtggacttcttctttagccccact  
 ttgtctcctcccaaccccttatttctctcagcttctcctgctccttcaagtccttcaatgtaaaacagggaggaaggaacaaactcagaactagaagaagc  
 ctgaggttgccacctgtagatttttaaaattatacatcaatttaccacaaaagtggtgtgtcaagaaccgtgggcatgggattgtgtgaatgtccagccttcaa  
 ctggaacttaaatgaagctactcattaggaaaaatttgaagataactcataggaacataaaagtaacgaataatcagagtagttaccatttagagactgt  
 aattaaaggcatttttaaacattttaatttttagttataagagctcagtgcaataattttaacaaaagggtgaagcttttaatttttactagatctgtttgatttacc  
 ttacagttgttttataattatgaatcagctaaagtttcaagatatgtccagtgacagctagggcatataaatacctaagatagaataaattttataaataattt  
 cctcatgatagaaggttagccttgaactgacgtgtgagacaattttaaaaaatagaataattatgatgatagtgataagggttaagttgatttactcttgagg  
 atgtctgggttcccttacaacccctgtcaagatttctagctgccttctagtgcttctgtgtgtacagaataagttgctcacttcttactatcacagt  
 cagaactattctgacttaatacacttcttctacatgtaaatgttggagagcagggagcagagatttttctgaataatacaaaagaaaagaggttcattt

tacaattactctaaagttaacttttttagtagtgccttgattccttcttggtttatacaaaagctagagcaagctcatctttgaaatcctgactgtggtcaggcgaagactgagttctgcagaactcagattacagaaaagcctaactgaaattctgaggggttaccaatgcttgcgaacgtcttgggtataaaccttaatacttttttttgtagtaattcttcactttcagagtagagcatcaaaattcagtgccctgcacctaagcatctagattatgttcacatgagctaaacatgacagtcaaaagtagagagaacacctgtagtgaactctcttgagactcaaaataagctcaactctgataccatgagctcaaaggctgtatttttcaaaaacccatcagagattgttggatagaacactgttatgaaatcatgaaaacctgaaatgccctttcaaacgacagaaltgagccacagtgcacatgctgcgtttttcttgatccaatttctctgggttcccttagcaattttacaggaagaaggaatttttaaacatagttccaatcagtttctacttctttatcattataaataagatgacatgagctgttccactttataaacatgagcatcttttggtttgtaggaacaatgaatatatgcaacattaatgcttgcctatgtcctcattcttggctaatattaaagtcataaaatgacaatgtttaaaatttcagcagtgaaatgcttcttagtgaaaacgattcaattatcttggactatttcagaccttacccttggggalatcgttgcgttgcgtgttatgaaaaggcatagaaagagatgacagagcattttgacaacttggtttctctggagtcccagagtgtagccagctaataagaacactggctactaattataaagtttgcttcggtgttgagtagaagaattataacttaactgattgtttactccaaacattatggaaatttgatagcaaaatttactgttttccatttttttaataattttacaactcttttttagaagttggaatatactttagactcttcttgggaatgcacaacgttggaaataaaaataacacacatagatttcttctgatttttataatccgtcaatctatctgaattttccatacagtagccttcttatagcataaagtaaggctggaaaaaagtcctgtatctgtataagatactcattcataagatagccttgatgccagaaaaaatatggagatgccacataattgagactatgatgaagaacctggaaattagtaagttcatctgtgtcaggacctaagggaagttggttatagtaagactacaaaatgatcttctgtattaaaacagataaaggaaaaaaaacagcctcaacatgtgaccacaggtaaatataatacaagtgccatggaatcacgtgccattatcaaaagttttatagcaaagacaattgaaaaaagaagtcaattttatcctccactcttagcacgagctcctcaaacactgcactacactgaactttacaaggccaagaatggtagcaatgaagcctatacagaatccatgaaatgttccaattccatttttcaggggttaggaagaacaggtaattagaacagagct

SEQ ID NO.10

MVDAFCATWKLTD SQNFDEYMKALGVGFATRQVGNVTKPTVIISQEGGKVVIRTQCTFKNTEI  
NFQLGEEFEETSIDDRNCKSVVRLDGDGLIHVQKWDGKETNCTREIKDGKMMVVTLTFGDIVAVR  
CYKA

SEQ ID NO.11

[illegible]

gatcaccgtagtagcaggacaaagatttgcctcaggattcccccaatccaagaaatttaaactggaatgagtgaccgaacttggactttattgattccccctt  
tatgggggaggtaagagactattgaattgaaagcatactaattgaaccttaataaatcattctcaatcagtggtttggcgaatgtgtggttctgtctgtctttt  
tctatttcgagaagcctctgctgtgctgtgatggcttctctctgaccttcttaacagctctgaggcagcccaacaactgttccttagtgcagatactggt  
cctcatcatgagatgagatgagagcgtgttacctcaatggaatgagtactagaaagtaatttagagagatttttttatttatttatttatttgaataaaat  
gtatgtacataaagataaaataaa

## SEQ ID NO.12

MAAASTSSPVISQPFTAMNEQQCFYNESIAFFYNRSKYLATEWNTVSKLVMGLGITVCVFIM  
 LANLLVMVAIYVNRFRHFPIYYLMAANLAAADFFAGLAYFYLMFNTGPNTRRLTVNTWLLRQGLI  
 DTSLTASVANLLAIAIERHITVFRMQLHTRMSNRRVVVVIVVIWTMAIVMGAMPTVGWNCICDI  
 DHCSNMAPLYSDSYLVFWAIFNLVTFVVMVVLVYAHIFGYVRQRTMRMSRHSSGPRRNRDMM  
 SLLKTVVIVLGAFTVCWTPGLVLLLLDVCCPQCDVLAYEKFFLLLAEFNSAMNPIYSYRDKEMS  
 ATRQILCCQRNENPNPTEGSDRSASSLNHTILAGVHSNDHSVV

## SEQ ID NO. 13

cccagagataagctgacgctgggcaaacccctgggggaaggtgcttcgggcaagtagtcatggctgaagcagtggaatcgataagacaaacca  
 aggaggcggtcaccgtggcagtggaagatgttgaagatgatccacagagaagacgtgtctggtatcagagatggatgatgaagatgattg  
 ggaaacataagaacattatcaacctctggggcctgcacgcagatggacctctctacgtcatagttgaatgcatcgaaggcaacctccgggaata  
 cctccgagccggagccacctggcagtgagtagtctctatgacattaaccgtgtcccaggagcagatgacctcaaggacttggtctctgcaccta  
 ccagctggtagaggcatggagtacttggttcccaaaatgtatccatcgagattggctgccagaacgtgttgtaacagaaaacaatgtgatgaag  
 atagcagactttggcctggccaggatatacaacatagactactataaaagaccacaaatggcgacttcagtaagtggatggctctgaagcc  
 cttttgatagatttactcatcagagcgtgtctgtcttcgggtgttaatgtgggagatcttttaggggctcacctaccagggttccgt  
 ggaggaaacttttaagctgctaaaggaggacacaggatggacaagcccaccaactgcaccaatgaactgtacatgatgatgggattgctgcatgc  
 tgtacctcacagagaccacattcaagcagttggtcgaagacttgatcgaattctgactctcacaaccaatgaggaatacttgatctcaccagcctct  
 cgaacagtattctctagttaccctgcacaaagtactctgtcttcaggggacgattctgtgtttctccagaccccatgacctatgaacctgtctgcctca  
 gtatccacacataaacggcagtggttaaacatga

## SEQ ID NO.14

PRDKLTGKPLGEGCFQVVMMAEAVGIDKDKPKEAVTVAVKMLKDDATEKDLSDLVSEMEM  
 MKMIGKHKNIINLLGACTQDGPLYVIVEYASKGNLREYLRRRPPGMEYSYDINRVPEEQMTFK  
 DLVSCTYQLARGMEYLASQKCIHRDLAARNVLVTENVMKIADFGLARDINNIDYYKKTNGR  
 LPVKWMAPEALFDRVYTHQSDVWSFGVLMWEIFTLGGSPYPGIPVEELFKLLKEGHRMDKPTN  
 CTNELYMMMRDCWHA VPSQRPTFKQLVEDLDRILTLTTNEEYLDLTQPLEQYSPSPDTSSSCS  
 SGDDSVFSPDMPYEPCLPQYPHINGSVKT

## SEQ ID NO.15

ctcagagtcctcacggcgtgcaccatgagcggcgccgaagtgggttgcctcgggatggctccgaagtcgccccggagaagaagtgaagcgttatgcg  
 tggagaagaaggtgtttgtgttcgcagtgccgtttgactggagaccggatgtcctggagtattacaaaaacgatcatccaagaagcctattcggat  
 tattgatttaaatattatgcagcaagttgatctgggttgacattcaacaaaaaggagttgaaaacagctatatctttgatataacaccatcgaccggatttct  
 tacttggtggcagatagtgaggagacatgacaaagtggtgtccgtgtatctgtgacatctgtgattcaatccacagagaagaagatcctgtgaagccgt  
 gactggctcctcacaaagcaccgtcgttccattctgtatagtagacaccagcctccagtcagatggagaagcttcttcagtcgcgtacctcctcctta  
 ccaggtcatcagccttcccccacacccagacacccctggcctccaggacgacccacaagactacctctgtgatcaactgtcaagcaagaagcctga  
 acctaacagaacctctttgactctgccaagcccacctttctgagacagactgcaatgacaacgtcccttcccaccagactcctgcttctcccagagca  
 aacacggaatgaatggcttttgcagcaacaaatgatgatgactgccaccgctcccggctgacatctgtctcgggagagtgccagcctctataacctgcc  
 aggagctattcccatgacgtgttgccaaaggaatccccatcaagcacggaggccgacggggagctgtacacctttaacccccatctgggactgcaggt  
 gtagaaacgcagatgagacatgtatccatcagttacgacattccgccaacacctggcaacacttaccagatccaccggacatttcagaaaagcacactg  
 ggacagtcacaaagctggacacattcctgataatccccccacctggccaccaaagccacatccaagtcacgacctgtgtggaacgtgtgga  
 gtcccacgcacggcctcggacactgacagcagttactgtatccctcctccagtaggcacgacccctccggagtaataaccattccaccgtggatttgaa  
 caagttgcggaaagatgctagtctcaagattgctatgattccacggacctttccgagcgatagatctagtccctggaaggcttccatagccagtataaa  
 atcaaaagcgtgtgacagcgggaggtgtctcgggtgaagagctggatgagaactacgttccatgaaccccaactcgccacctgacaacattccggc  
 agctttaccgagccaatccaggagccaactatgtccaatgaccccaaggacctttgacttttctctttggaatgcaagtcctcctcctgctcatatgg

gcttcagggtccagcccaagacccctcccaggaggccagttcctgttgcgtgactgtgaaccaccccggtggataggaatctcaagccagacagaaaa  
 gtcaagccggcaccctttagacataaaacctctgtcagaatgggaagagctgcaagccccagtcagatctcccatcaccaggagcttcgctcgggactcc  
 ttaggtttcccatgtcccctcggcctgattctgtgcacagtacgacatcgagcagcagcttctcatgacagtgaaagagaactatgtcccatgaatccaaat  
 ctgtctggcgaagaccggaactcttcttccagcaacagccttgatgggggaagcagcccgatgaataaaacccaaaggagacaaacaagtcgaatfacc  
 ggatttagacatagattctgggaagtccacgccaccaggaagcaaaagagcagtggttctgagcagcagatggcagacgagagggtgattacgttg  
 tgggtggacaacagaagactctggccctgaagagtaccagagaagcgttgacggatgggaggcagtcacagagatccgagacaccacaaaagaatg  
 tgaagtgaagacatgccgtcctctgcgggaagacgagatctgagtggaagagagatgccaagtgaagatgttccactctcagtgagcctcgag  
 cagagggggaagagaagagatctctcacatgttcaagcaaatgagttggaatggtgctgtgtgtgatttgattataacgtgtaataaaccgggga  
 aatagtgttttagtcacagagaagctttctgctccataaacacacctgtagtactatactgacacgttttcatttaaaccttgggttggcttcccg  
 atctacctaacagactttccttggggaggtcttttggcctcctcacactctctataaacaataactaagtgaactgagctacttgaattctggaattccagtt  
 gaagctacaggggctaaccattataaacaagaagtaagttgacacattcgttttctctgaagggtggtagccattagcttaagctgtagaacatagttggc  
 cg

## SEQ ID NO.16

MSGGEVVCSGWLRKSPPEKKLKRYAWKRRWFVLRSGRLTGDPDVLEYKNDHAKKPIRIIDLN  
 LCQQVDAGLTFNKKEFENSIFYDINTIDRIFYLVADSEEDMNKWVRCICDICGFNPTEEDPVKPLT  
 GSSQAPVDSFPAISTAPASSQMEASSVALPPPYQVISLPPHPDTLGLQDDPDYLLINCQSKKPEP  
 NRTLFDSSAKPTFSETDCNDNVPSHQTPASSQSKHGMNGFLOQQMMYDCPPSRLTSVSGESSLYN  
 LPRSYSHDVLPKESPSSTEADGELYTFNTPSGTAGVETQMRHVSISYDIPPTPGNTYQIPRTFPEST  
 LGQSSKLDITIPDIPPRPPKPHPSHRSVPVETCGVPRTASDTSYCIPPPVGMTPSRSNTISTVDLN  
 KLRKDASSQDCYDIPRTFSDRSSLEGFHSQYKIKSVLTAGGVSGEELDENEYVPMNPNSPPRQH  
 SGSFTEPIQEPNYVPMPTGTFDFSSFGMQVPPPAHMGFRSSPKTPRRPVVADCEPPPVDRNLKP  
 DRKVKPAPLDIKPLSEWHEELQAPVRSPITRSFARDSSRFMSPRPDSVHSTSSSDSHDSEENYVP  
 MNPNLGSDPNLFAASNLDGSSPMNPKPGDKQVEYLDLDSGKSTPPRKQKSSGSGSSMADE  
 RVDYVVVDQKQTLALKSTREAWTDGRQSTESPTKNNV

## SEQ ID NO.17

gtcgacccacgcgtccggcgccgctcgccggtggtgacctgcagacgcccgtcggccacacctcgtctctcctggcgccgacccctttgtct  
 ctccgagcggcgaggtcgagagcagcgccgctcgccgacgcaaacgcccgtctctcgtcactccccagcctcgccaccgcagaaac  
 ttggctcgagagccagcgaccgctccagctccagagccggttagctcactccagctccatggcgaagcagaacagcaagctcgctct  
 gaggtgctcagcagcctcgccggaacacacgggaattcaccgacctgagcttcagagtggtgacaaaggcttcctcaaggactgcccactgcccacct  
 gactgtgacgagttcaagaagatctacgcaactcttccctacggcgatgctccaagttcgctgaacacgcttccgacaccttgacaccaacagc  
 gatggcaccatcgacttccgggagttcattgctctgagtgacctctcggggcaagctggaacagaagctcaagtgcccttagcatgtacgacct  
 ggacggcaatgctcatcagccgagtgaaatgctggagatagtcagggccatctacaagatggtgctcctccgtgatgaagtgctgagggacgagt  
 ccacgcccgagaagcgaacagacaagatctcagcgagatggacacaaacatgatggcaactgtccctggaagaattcatcaaaagggtgccaagag  
 cgacccatcattgtccggtgctgctgagtgatccagcagtgctagccagttctgaggggaatgggctttggacattgtgagaacacagggctggc  
 ctgccatctcagctttgctgtaaaagtggtgcttccctccaatggttcaaggttctcggctgctgggctcctcctgcccacagaggcgctggcgccct  
 actgtggtctcctcctccagctcagcgtggctcctccaatggttcaaggttctcggctgctgggctcctcctgcccacagaggcgctggcgccct  
 taaggacaccagacaggaactttcagtaatttaccagaccagctaatatttctatgatccaggtgactttgtgaggaatgaaagatggagagtagaca  
 ggcaagccctcctgctgcatggctccaccccttctgcttctcctgacaaaagccgcttgcattgatataccgtggtatccttcttataatagattatt  
 gtatggtgagatggactataatgttcagccctgtattaatgcctctgactgcctttgaagcatgggtccctgtggcctgtgattccccccccccaagct  
 ggctgtgctgtgtattatgattcattgattgctgattccacagagatcatgcatgccagggtgtggacatctgcctcctgctgtaaatgacagg  
 ttttctgtgtgctgtcctcctgctgattggtatggcatataaaatgatcaaat

## SEQ ID NO.18

MGKQNSKLRPEVLQDLREHTEFTDHELQEWYKGFLLKDCPTGHLTVDEFKKIYANFFPYGDASK  
 FAEHVFRFTDNTSDGTIDFREFFIALSVTSRGKLEQKLKWAFSMYDLGNGYISRSEMLEIVQAIY  
 KMVSSVMKMPPEDESTPEKRTDKIFRQMDTNNDGKLSLEEFKGAKSDDPSIVRLQLQCDPSSASQF

## SEQ ID NO.19

ggatgagacagaaggatagagaggagagagagagagagaagagaagcaaccagaaataggcagccaataaaaaggagccgcacttatctga  
 agcctcaagggcgctgagccaggtccctgtttgatggcagttatgaaaaattacctcctccgatcctggtgctcctcctggcctactactactatttaca  
 atgaagagttcagaccagaaatgctccagggaagaaagtattgtcactggggccagcaaaagggttgaagagaatggcataatcatctgtcaaaa  
 atgggagcccatgtggtttagtgcaggtcgagggaaggtctccagaaggtagtctcgtcgtccttgaactcggagcagcctctgctcactacattg  
 ctggcactatggaagacatgacatttgcggagcaattattgtcaagcggggaagctcatggcgaggactggacatgctatttctaaaccacatcactcag  
 accctcgtctctcttccatgacgacatccactctgtcggaagagtcagtgaggtcaacttctcagctacgtggtcatgagcacagccgcttgcctatg  
 ctgaagcagagcaatggcagcattgccgtatctcctccttggctgggaaaatgaccagcctatgattgctcctactctcgaagcaagtttgccttgat  
 gggtcttttccacattagaacagaactctacataaccaagggtcaacgtgtccatcactctctgtgctcttggcctcatagacacagaacagctatgaag  
 gaaatctctgggataattgacgcccctagcttctcccaaggaggagtgccctggagatcatcaaaaggcagcgtctacgaaaaggaggtgtactat  
 gacaaattgcctttgactcaatcctgcttgggaaccagggaaggaagatcatggaattttttcattacgatattataataaggacatgtttgaagtaactag  
 gaactcctgagccctggtgaggtgcttgaacacagtcctcctcactctcagtaagccctaccacaaaagtatctttccagagatacacaattttggggt  
 acacctcatcatgagaattcttgaacacttgcacagtgaattgttaataatgtcacaaccactttgggcctgcagttgtgaactgtattgtaac  
 tatggataataacacatagtggtgtatcggtttacctcactcactgaatgaacaatgataactaatgtaacattataataaaggtaataatcaacttcgta  
 aatgcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

## SEQ ID NO.20

MAVMKKNYLLPILVLSLAYYYYSTNEEFRPEMLQGKKVIVTGASKGIGREMAYHLSKMGAHVVL  
TARSEGLQKVVSRCLELGAASAHYIAGTMEDMTFAEQFIVKAGKLMGGDLMLILNHITQTSLS  
LFHDDIHSVRRVMEVNFLSYVVMSTAALPMLKQSNGSIAVISSLAGKMTQPMIAPYSASKFALD  
GFSTIRTELLYTKVNVSTLCVLGLDITDAMKEISIIDALASPKEECALEIKGTALRKSEVYYD  
KLPLTPILLNGPRKIMEFFSLRYYNKDMFVSN

SEQ ID NO.21

[illegible]

SEQ ID NO.22

METSSLWPPRSPSAGLSLEARLGVDTLWAKVLFTALYSLIFALGTAGNALSVHVLKARTGR  
PGRRLRYHVLSLALSALLLLISVPMELYNFVWSHYPWVFGDLGCRGYYFVRELCAyatVLSVAS  
LSAERCLAVCQPLRARLLTPRTRCRLSLVWVASLGLALPMAVIMGQKHEMERADGEPEPASR  
VCTVLVSRASSRSTFQVKRAGLLRSPLWELTAILNGITVNHLVALYSQVPSASAQVNSIPSRLLEL  
SEEGLLGFITWRKLTSLFYQVQASLVRHKDASQIRSLQHSAQVLRAIVAVYVICWLPYHARRLMYC  
YIPDDGWTDELYDFYHYFVMVTNTLFYVSSAVTPVLYNAVSSFRKLFLESLSLSCGEQRSVPL  
PQEAPESTTSTYSFRLWGSPRNP SLGEIOV

SEQ ID NO.23

ggcgctcgcctcgtcgcgatggagaaagaccgagctgatccagaaggccaagctggccgagcagccgagcgtacgacgacatggccacctgc  
atgaaagccgtgacggagcagggcgccgagctgtccaacgaggagcgcaacctgctgtcgggtggcctcaaaaacgtggtatggggggccgcaggtc  
cgctggaggggtcatctcgacattgagcagaagaccgacacctctgacaagaagtgcagctgatalcaaggactatcgggagaagtggagtcggag  
ctgaggtccatctgcaccacgctcctggaattgttgataagtatttaatgccaatgcaactaatcagagagtaaggtctctatctgaaaaatgaaggga  
gattattccggtaictgtgtaagtgcctgtgcgcatatcgaaaacaacaatgaaaattcccaaggagcctaccaagggccgttgatataagcaag  
aaggagatcgagcctacgcatccaatccgcctggggctggtcttaactttctgttttactatgagatccttaataatccagagcttgcctgcacactggc  
taaaacgctctttgatgagccatcgcagagcttgatacatgaacgaagactctcaacaagcagcacacctcatcatgagtcagttgtagagacaacttaa  
cattatggcatcagacagctgcaggagaagaagtgtgatgcagcagagggggccgaaactaaacc

SEO ID NO.24

MEKTELIQKAKLAEQAERYDDMATCMKAVTEQGAELSNEERNLLSVAYKNVVGGRRSAWRV  
SSIEQKTDTSDDKLQLIKDYREKVESELRSICTTVLELLDKYLIANATNPESKVFYLMKMGDYFR  
YLAEVACGDDRKQTIENSQGAYQEAFDISKKEMQPTHPIRLGLALNFSVFYYEILNNPELACTLA  
KTAFDEAIAELDTLNEDSYKDSLIMQLLRDNLTLWTSDSAGEECDAAEGAEN

SEQ ID NO.25

tttttttttttttcccatccctgctggctttattactgggcaggggaaacagatccttggcagtggttaggactgagagtacaagatgggaagccctggg  
gctcagctttactagggcagggttgggcacactagcaagtgcagagaggaggcctgtatatgtcaaccccacggagaatatatcctatgcagccgtt  
cattatggctatgatgcaggacaggtgtgcgttcattgggcgagaagcccaagactgggatccccaccgccggataaaagcgctgtcagtggcagc  
aggaagaatctctggctccagatgaggttcattgccttcaggctccgctgaaagctgccaccagggatctgaatcatccgtgggtgtcattcagggc  
tctgtaaacctga

SEQ ID NO.26

gccatcaatgctttatctctcatctctgctctgccaacactagtgaacacacacctctggctcattaagggaagtgcagatgagcaactaggataga  
aacatcattcacacactctttcagggtgtctccgggtgcacactcacacgagtttgcacatactataagcctgaataatgatgccattatctgcacagggt  
aaaactgattccatactgggtgcaacctgttggaagtcttcaggacacttaacaaaattatctgattatcatttttagatttgggatgaaaatagaaaag  
aatataaacaagcatgctttttaggtttcttgggtcagtttagtaaaaaatagggttttctttagagggtttttaattgttattcttatttttaagtggag  
aactgtgaaactggaattcctgagggtttttttccctcactcatcagctttaagagagtggttaggcttggcagtcctgctgtgacaaagtctgtttctaa  
actgagccttcttataggcgtgatgcagctctgtatgtgccacagagagtaaaaggaggacagaagctgttctgtccttngtggggcatagcctttcc  
tatgctgatgtcatatttctgcaaaacctcgggtccagagggtcgtgcatcttgtaactatttgcattaaatgttcaac

SEQ ID NO.27

gtgacaggagcctccccacaccatattctaagctttatctcttagtagcctgagggtggagagaggtatttctgccgattgtgtcatctggagtcgt  
tcctgtggcctccttttctctgtgttttgcatttttcttgggtccgatgaaagcatttcttttaaccaataaagtgtcgttgcagcaatgg

SEQ ID NO.28

agcaatgaatgtggaacatgaagttaacctcctgggtggaggaaattcatcgctgggtccagaaatgctgatggaaaatagtggaagtgtgggtcct  
ctccaggatgacagatgtgccaatctctttgaagcgttggttaggaactctgaaagctgcaaaacgaaggagattgtacatacgagggaactactttt  
gcaagggtgtcatgatgatgtgacattgtattgctcaagattaatgtgtttagcatggctgtgtatctgataaactggaataactaagttaagagactagc  
gtgaatttcttatgtattttatagaactttgtaacaaaaggggggtgtgtgagaagtcctgttttataccttgaaagcaaaacattacaatgtaaaatgagac  
aaacctattattttcttaagaaggtaatttgggaaatgtaggtaatgaaacatttttgggaggtgtgaaaaagc

SEQ ID NO.29

attggtgcatgtgtgttctagctcactgtccatgagaatattttatgatattaaagaaaaccttttgaatggctgtttcaagaagataattcatggcttct  
cattttcagtccttcaaaagtgtggctggcctgtttatgactgcagagtggttatgtttttaaatttgaatatfgcctattaaagataggacaaacttggagatt  
atgatgttcttggcacagactgtattaaaacaacactcccgtga

SEQ ID NO.30

ctggcacggacatggctgtctctgtctgtgtgtgggaaacgctttcaggcacaaaagcgactccagcagcacatggagggtccacgcaggcgtgcgc  
agctatatttgcagtgagtgcaaccgcaccttccccagccacacggctctcaagcgccaccttcgctcacatacagggttttttctcatgtgtcaccagtg  
aagtttgccttctatagcaaaagagaatattttatcctactaactacagtagattttttagtgaacatttttattttattataagtcataagaaaaata  
gcgatgttcagttgtataccttgaatctgcagttagaagagaataaagttaactc

SEQ ID NO.31

tttttttttttttgcaggagtaaaagtctttaattactgtgcacctcagaaagctacaagtaaaatgtttgtaagaatatacacaaagaattcagagtataaaa  
ttctccatgtaattagtagtcataattaattagaactacagtagaaaaaaatagctgtctcctagattctccaggagcctaactgtgtggctttgagaagggtg  
gagttgttctgagtgagcgggaagtcaagctcactctccagttctccagcagctccacgaagtcagtgatgtaccacttggcgttgccttaacctgctg  
cctgatcacattgcctccaaagccaatgaagcatcag

## SEQ ID NO.32

ggggcgggacgacggcgggctgccggcgccactagccggcttgcggcgctgccagtctccggcgcggtgtccggcgcgcggtgagcgac  
cgagcgtgcggacggagcgcgccctgctggcgggcgtagcgcgcgcgcgcgcgcgagagacgcggagcgaggacgcggcgcgcg  
gacgcggcgacaggtcttctacttacaagacaaatgactactgatgagggcaccagtaacaatggagagaaccagcagccaccatgactgagcag  
ggtgaagatatcactacgaagaaagacagggaggtattaaagattgtcaaaagagtgaggactagtacgagggcccaatgtttggtgacaaagtattg  
tccactacaaagggtgtgtcagatggaagaaagtttgattccagtcacagaaagaaagccattgacctttagccttgccaaaggccaggttatcaa  
gcctgggacattgggggtgtctactatgaagaaaggcgagatctgccatttattgtaaaccagaatatgcttatggctcggctggccacctcaaaaaatt  
ccatcaaatgcaactctctttttgagattgagctccttgatttcaaaaggtaggatttatttgaagattcaggcgcttatccgtagaatcaaacggaaggcga  
gggatactcaaaccaaacgaaggagcaacggtaaaagtcacctgggaaggctgctgtgtgtggaaggacatttgattgccgagatgtgtgttctgtgtt  
ggggaaggagaagaccacgacattccgattgggagtcgacaagccctggtagaatgcagagagaagaacagtgtattctatatcttgaccacgctat  
ggttttggagaagccgggaagcctaagtttgccattgacccaatgctgagcttatgtacgaggtcaccccttaagagcttcgagaaggccaaagaatttg  
ggagatggacacaaagaaagctgacgagcgctgcatctgtaaaagagaagggaactgtgtacttcaagggaaggcaagtacacgcaggccgtgat  
tcagtacaggaagatagtgtcttggctggagatggaatacggcctgtcagagaaggagtcacaagcctcagagtcgttctctcgcagccctctgaac  
ctggcctagtgtactctcagagtcagatcaacaagccgtggaagtgtcgcgacaaggcccttgactggacagtgcgaatgagaagagcctgtga  
cagaaggcgcgaggccagctgctcatgaatgactttagtcggccaaggcgacttcgagaagggtgttgagtcgaatctcagaacaggccgctc  
gcctgcagatctccatgtgccagaggaaggcggaaggacacaacgagcgaggaccgaggggtgtacccaacatgttcaagaagttcgagagcggg  
acgcaaaaggagaagccagcaagcgtgggagcaagaaggctgtgaaggagccgctggcaacaacacgagagtcaggccatggaagaaggaa  
aggccaaaggccatgtatgacgctgcgcacggaggggaagagagtcctaatgaactcggccctcctcgtgggctgcctccaactcaggactgaac  
agtgttagtgtaagggtttacagctctctgtattctggaagcaaatggcataccagtagcttcccaatgaccacctgctgctgcgggggggtgggggt  
gggggacatgccaggaacagcagagaaggccgctgggtgtgaagagaccagggcagcagtcagtcagccatttcagttgtcaccttcagtgtc  
cagcacagcatccctgtgaacctgagggccagctgctgtgggttctacatcggcactaggggtcacactgcagaaaccgttgataaaacaaactcagtgat  
ctctgtcttcttattgtgggcatggcaggcggggtgatgagatttgcctagcactgactgactggcctgctaagaacacaaagccacagccaggggct  
ccctgttccacagctgggtctcagcccttacctgcctccaagtccttgcagactcttgagtgtggttctgtcctagccagcatgtcccacagactc  
tgttcttctccaacgccgctcattagtgcagcttctctctgagtttctgtgtgtgtggaagtgggtagaagtaggttatcttccgctgtctgccccactc  
aaggacgat

## SEQ ID NO.33

MTTDEGTSNNGENPAATMTEQGEDITTKKDRGVLKIVKRVGTSDEAPMFGDKVYVHYKGMLS  
DGKKFDSSHDRKPPAFSLGQGQVIKAWDIGVSTMKKGEICHLCKPEYAYGSAGHLQKIPNSA  
TLFFEIELLDFKGEDLFEDSGVIRRIKRGEGYSNPNEGATVKVHLEGCCGGRTFDCRDVVFVVG  
EGEDHDIPIGIDKALVKMQREEQCILYLGPYRGFGEAGKPKFGIDPNAELMYEVTLSFEKAKES  
WEMDTKEKLQAAIVKEKGTVYFKGGKYTQAVIQYRKIVSWLEMEYGLSEKESKASESFLAA  
FLNLAMCYLKLREYNKAVECCDKALGLDSANEKGLYRRGEAQLLMNDFESAKGDFEKLAVN  
PQNRAARLQISMCRKAKEHNERDRRVYANMFKKFAERDAKEEASKAGSKKAVEGAAGKQHE  
SQAMEEGKAKGHV

## SEQ ID NO.34

atggcgtggctccaggctgatgtggtgagcttgcctcctcgtgatgccctctaattgttatggcgactgcctgtccctgtgctccctgtgtgagtgaggattc  
aggatgggccccgtccatcaacccccctgatttgcctcgtgagtgccaggacctggtgccgccccctcagaggagtggagacatgccggggcttctca  
tcttttctaccctgacggtctctgggctccgtggcaaggatgacttggagatgaggttgccttggagaaggcatcagtcacatccaagctcttgaa  
cccgtcctgaaggagctggagaaaagccgactcctaccagcgtccagaggaaaaggtcagggggtctctccagcagctttggcaacggaaaagaatc

tgagctggcgggtgctgaccggatgaatgatgaagccgcacagggcgccaccgtccattttaatgaggaggacttgagaaaacaggccaaacgctatg  
gcggctttttgcgcaaatcccccaagaggaggttccgagatggccgggagtagggacggggccaggatggggatcaggtaggatgagggacgtgt  
acaaacgctatgggggcttctcgtcggcgcatcgcaccaagctgaagtgggacaaccagaagcgctatgggttctcgtcggcgctcagttcaaggtgg  
tgacgcggtccaggagaacccaatctattctgaagattagattgttga

## SEQ ID NO.35

MAWSRLMLAACL VMPSNMADCLSLCSLCAVRIQDGRPINPLICSLECDLVPPSEEWETCR  
GFSSFLTIVSGLRGKDDLEDEVAALEEGISAHAKLLEPVLKELEKSRLTSPPEEKFRGLSSSFGN  
GKESELAGADRMNDEAAQGRTVHFNEEDLRKQAKRYGGFLRKYPKRSSEMARDEDGGQDGD  
QVGHELDLYKRYGGFLRRIRPKLWDNQKRYGGFLRRQFKVVTQSQENPNTYSEDLDV

SEQ ID NO.36

gacagggcgcctctggaagcacagatgcatcaggaaaacaggactccccgtgggaa gataggatactccaggaa gatagaatagtcccaaggca  
tcactagaacacgacaggaaacactagggtccaagctctcattgaggcaccggggaggtgtgtgtgtgtgtggcggggctcaggaaagactgtccctgct  
ggctctgataccagaccaccaccggcagggttctctctaa gagaacctgtcagagacagaacgggtccctacaggcgcgttctctctctacagcc  
catggcgcggttcttgaggcttgcacctggctgctggcgttgggtctctccctctgcttacagtgcagcgggaatgcagccaggactgcgcftaatg  
cagctaccggctggctggctggcagcatcaattctgctggctgcacactggaatgaaagtgacgtgccttcttcaaaatctgggagacctgcaag  
gacttctgcaggtgtccagcggcgagggtcttctgggataacatgacatgtacacaaagcagcagaacaaggatgagagccattgtagccaagaa  
gtacggaggctcatgaaacggtagcgggcttctcatgaagaagatgtagcagactatccatgagccgaagaagaagaagcgaacggaggagagat  
ccttgccaagaggtatggcggcttcatgaagaaggatgcagatgaggagacacctggccaactctccgctgtctgaagagctactgggaacgg  
gagacaaccgtgcgaagacagccaccaacaagagagcaccacaacatgacgaagacatgagcagcaagaaggtatgggggtctcatgagaagcctc  
aaaagaagcccccaactggaagatgaagcaaaaagagctgcagaagcgtactgggggttcatgagaagggtgggacgccccgagtgtggtgatgga  
ctaccagaagaggtatgggggttctgaa gcgcttctgctgagctctgcccctcgatgaagaaggcgaaaaattactcgaagaagttctgagatagag  
aaaagatacgggggttattcggttctgaagccctttccagcagtgacccccgacccccactagcctgtccatcccccatgagcaactgccttgtcaat  
gctgtttctgtacatgctgttctgtgtgtacagttgccccgtggctctagataactacactgctgaaagctgtgatittaggtctgtgtcttttagtcttg  
aagctcagtatgtgtctctttaggtctatgtgttatcaaatgtttgtacctcatctctctgacgaacatcaataaatgctatttgtatataataataaacc  
gtgacccaactgc

SEQ ID NO.37

MARFLRLCTWLLALGSCLLATVQAECSQDCAKCTYRLVRPGDINFLACTLECEGQLPSFKIWET  
CKDLLQVSRPEFPWDNIDMYKDSSKQDESHLLAKKYGGFMKRYGGFMKKMDELYPMEPEEEA  
NGGEILAKRYGGFMKKDADEGDTLANSSDLLKELLGTGDNRAKDSHQQUESTNNDMDSSKRY  
GGFMRLSRPSQLEDEAKELQKRYGGFMRRVGRPEWWMYQKRYGGFLKRFAESLPSDEEGE  
NYSKEVPEIEKRYGGFMRF

SEQ ID NO.38

accacgcgtccggccggtttcactgctccctcagctctcttttgggtctttccgggcacfcgggacgataccgtcaaagccagagctgctcgaagcac  
ccttacctactccagaatgaggggaatggtagc gattctcatcgctttatgaacagagaaggatgggcctgaacgattttatcagaagattgccagcaa  
cacctatgatgcacaaacgcgtgaagttcagtcattttgaaatgtcccatcctcaggagccggagcttatgaacgctaaccctctctccgccaaagtc  
cctctcaacaaatcaacctgggtccgctccaacccctcacgccaaacctccgactttcactcttfgaaagtatcggaagggcagttttggaagggttc  
ttcggctatggcacaaggcagaagaagtattctatcagctcaaaagtgtttacagaagaaagccatcctgaagaagaaggaggagaagcatattatgtcaga  
cggaatgtctgttgaagaatgtgaagcaccccttctgtgtggttcggaactcttctatccagacgcctgacaacitctactttgtctggactacaataatg  
gtggagagctgttctacatccctcagagaggagcgtctgtcttgcgaacacggctcagctgtaatagccaggtcgttggctgtctatctgtcga  
ctccctaaacatcgtttatagagacttaaaacctfgaataattctcctgactccagggggcacatcgtctctcactgactttgggctctgcaaaagagaatatt  
gagcataacgggacaacatctaccttctgtggcacgcctgagtaictgtgctcctgaggtcctccataaagcagccgtatgaccggagcggtggactgtgtgt  
gtcttggggctgtcctgtatgagatgctctacggcctgccccgttttatagccggaacacggctgagatgtacgacaatattctgaacaagcctctccagt  
tgaacccaaatattacaacactcggaaggcacctcctggaaggcctcctgcagaaggaccggaccaagagagctgggtgccaaaggatgactttatggag  
attaaggatcatattttctctttaattaactgggatgatctcatcaataagaagattacacccccatttaacccaaatgtgagtgggccagtgaccttcgg  
cactttgacccgagtgtttaccgaggagacgcgtcccgactcccatcaggagctccctgcagacagcactctgtcacggccaggtgtgaagggaagcagcaaa  
gccttcctcggtctctactgacacctctgttgattccttcctatgagctgtccggcgtgtgtctgaaggacctctcagcgttctctaaagtgtttcttcctac  
cctttgtggaggttgccagctgacagaacattttaaaagaatttcacaccttgaagctgtggcagctctcgccttccccggcgtggcgcgacgcagcgcgc

[illegible]

## SEQ ID NO.39

MTVKAEEARSTLTYSRMRGMVAILIAFMKQRRMGLNDFIQKIASNTYACKHAEVQSILKMSHP  
 QEPELMNANPSPPPSPSQINLGSSNPFAKPSDFHFLKVIGKGSFGKVLLARHKAEEVFYAVKV.  
 LQKKAILKKKEEKHIMSERNVLLKNVHPFLVGLHFSFQTADKLYFVLDYINGGELFYHLQRER  
 CFLEPRARFYAAEIASALGYLHSLNIVYRDLKPENILLDSQGHIVLTDGFLCKENIEHNGTTSTFCG  
 TPEYLAPEVLHKQPYDRTVDWWCLGAVLYEMLYGLPPFYSRNTAEMYDNILNKPLQLKPNITN  
 SARHLEGLLQKDRTKRLGAKDDFMEIKSHIFFSLINWDDLINKKITPPFNPVSGPSDLRHFDP  
 FTEEPVPSSIGRSPDSILVTASVKEAAEAFLGFSYAPPVDSFL

## SEQ ID NO.40

gaagcagaagaggggagaacgaggggtgagcacgctggcgagccgtgctgctcctctgcgccacaggctcgcccaacgaagcacaagccag  
 cagggctcgggtcctgaggacatcgctgccacccaggagtgacagagaaccaaccacagaatctggaggtcggtagacgccccgatctaggcaggct  
 cggagccaggggggggtgcccaggaagaaccggaagcagatccacagactgaaggagaaagaagtgatccctgagccggcacgtctcag  
 cccagagctccacagatctcctgtagatgctgcttcgcccgggacggcacgcccccttagcttccacacctctcctctgagcgctcctcctatctgc  
 ccttgaggggacttccaccttcaagggtgcaggacaaagccgcatactgctggcggccaccatgcacctcaacagctccgtgcagcaggagccccaaagt  
 gaacccggtgcccagccctccacatccacagttcgagctggagagcatgctcctggcgctcagcttgagcaatggttctggaattcctcagaatcca  
 tcttgagcccaacgaacctggagctgaacactgacatttattccaaggtgctggtgaccgctgtatacctggcaccttttgggtgggactgtgggc  
 aactcggtagacgcttactctagcgcggaagaagtcgctgcagagcctgcagagcactgtgcattaccacctgggtagcctggcactgtctgactg  
 ctcatcctgctgtggccatgcccgtgagctgtacaacttcatctgggtgacacatccctgggcttggggatgctggctgcccgtgctactatttctg  
 cgagatgctgcacatgacccacgctcaatgtagccagcctgagtggtgagcgctacttggccatgctccatccctcaaggccaagaccctcatgt  
 cccgcagccgcaccaagaattcatcagtgccatagggtagcctcggcgctgctgctgtaccatgctttcaccatggcctgcagaaccgacgtgc  
 cgatggccagcaccctggtgctgctgacacccacgggtggacacgcccacgctcaaggctgcatccaggttaacaccttcatgtcttctctgttc  
 ccatgctgatcatctccatctaaactgtgtagcccaaaaactgaccgtcatggtgaccaggctcccagcaggggccgtggtgtgtgacccgtgg  
 gcaccacaacagtttagcagcacgacgctcaacatgtccatgcagccagccgtgtccagccctgcccagcagtgagtcctgtcttacgtgtgtgt  
 aatcgcttgggtgctgctggtgctccctaccacgtgcccgcctcatgttctgctatctcagatgaacagtgactacgttctcttcgacttctaccact  
 atttctatgtgaccaacgctctcttctacgtcagctcagccatcaatccatcctttacaacctgtctccgccaacttccgccaggtcttctgtccacac  
 tggcttgcctctgctcgtgggtggcgccgcccgaagaagaggcccaacgttctccaggaagccaaacagatgtccagcaaccatgcgtttccacca  
 gcgcccacccgggaacccctgtactagccatgaggaggtgagcctgtgacaggggagcaactcccccacccccacccccaccccaagcctccc  
 aaggttaagtagtgcccactaagccatgcccgtgaggtggggcaccctcagcggaggcttcttcttccagtttcttcttcttcttcttctggttctc  
 cctccctagctcttattcttggcccttacccttctcctacctccacctttaaacaagagggcgttctctcctggccctacaaaaggcctttaacaa  
 gaagaatttagcactaccagagcgtgctccttggctccagactaatgaggttttagaagcaagaatgaagcaccacattggcctggacagatg  
 agctgtgtaaccataacagcacttggagctgagcggcgagacagtgctgtgtagtggacttgggttcagagacacaggtccatctcagccc  
 ctttatgcttactctgcccgtggtccagacagatacctagcactctgagccttatgtccagacccttcttggcaggtggtacactgcccctccaga  
 gtggtccagagagaagccccaaattactgtgtaagggtccagggccacagctgggaagctgtgggaatccatgccacacctggatggctatggcccacta  
 aagagaccccaattcccatgcccaggaaggataaaaggctggcctggaatcaacacaggacaagcttcaagtggttgcacggggaccttacc  
 tcttgatctcagaaaggatggaagataagtggtggccagcctccacagtgccgttggctgggacatgcatggttctgcttcatatacagatg  
 tatagactaagggtgacagcagctgggttcaggtggtgacttctgagaaggggactgagccaggtcctcagcaagatgccagtgtctgagactccac  
 aggttaaggggagcccaagcaccacagcttagctgcccagcagccctggactgagcagatgtcaattgtaaccagccgccaagcagccacct  
 ggcccaggttctagggcctggaaaagcaggcacccttcatcttgggagctgtctccaacaagacagggccattcagcctcagccaacaagctgg  
 ctgggacgttgagacagctccagggatgcccagcaccacaaaggtagagtagcagagagtcagtgtagcctttgcaaaagagccttagctgtgt  
 gtcttggaagagatggctgagatgagctgctgtgagatgaaatgtccacgggacatgggaggtcagtcacagcccaggtgtagcctctgctc  
 cctctgaactataaaacatgggtgaaaagtcaggtatctgtgtgacccagagaaaatggggaggggttcaagtactgaaccccacaaactgct  
 actagtaattgtattcctcagggcatcaagggcagacgtgggtgagtcggatcaaggctgacaccaggaagatgtgatcccaagaggggaagcc  
 cctctcctaagaaatgtctgcatggagccccacagccacctggccagtgagtggtgcaaggctagcgttgcagagatttgacttagact

caagccaggcagcccagcccaggactctaccctgggttttagaccttaagccatttctgagccttgatttctcctcatctcggcggaccgggactgctt  
 gaaggactcagcctggagtacacagaagtgggacacctgaggctgggtagagccaatgcccctttacatgattcctcagaaatggtggcctcattata  
 ggggtggtccaggcagtcaccagaagtctctgctgtatgctatagcatcttctgtgtgcttgggtgaattaggacatacatccatgaccaccagacac  
 acctgtgaccttgggtggtatcctatgctctggccaagtgaagatgaaaatagttctggaggctgtcctgagcatcctggctagatgctcatgagccca  
 gtcgtgatgtggaacaagctgtgctcccaaatatctgcagaatgccacccacctccacacttcaataaaagaacacccctcctcatgtctcaataaa  
 gaataaaggagctgtatatacg

## SEQ ID NO.41

MHLNSSVQQGAPSEPGAQPFHPQFGLTMLLALSLSNGSGNSSESILEPNSNLDVNTDIYSKVLV  
 TAVYALFVVGTVGNSVTAFTLARKKSLQSLQSTVHYHLGSLALSDDLILLAMPVELYNFIWV  
 HHPWAFGDAGCRGYYFLRDACTYATALNVASLSVERYLACHPFKAKTLMRSRRTKKFISAIWL  
 ASALLAVPMLFTMGLQNRSDGQHPGGLVCTPTVDATVKVVIQVNTFMSFLPMLIISILNTVI  
 ANKLTVMVHQAAEQGRGVCTVGTHTNSLEHSTFNMSIEPGRVQALRHGVLVLRVAVVIAFVVCW  
 LPYHVRRMLFCYISDEQWTTFLDFYHYFYMLTNALFYVSSAINPILYNLSANFRQVFLSTLAC  
 LCPGWRRRRKKRPTFSRKPNSSMSSNHAFSTSATRETLV

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para identificar un compuesto capaz de alterar la respuesta de exposición prolongada de CRH en una célula, comprendiendo dicho método:
  - a) poner en contacto dicha célula con CRH en presencia y ausencia de dicho compuesto;
  - 5 b) determinar la cantidad de al menos una proteína que modula la señalización de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en dicha célula; y
  - c) comparar la cantidad de dicha proteína en presencia y ausencia de dicho compuesto;
 en el cual la proteína que modula la señalización de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) es SEQ ID NO. 20.
- 10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el cual la célula es una célula eucariota tal como la línea de células de adenoma derivada del corticotropo de pituitaria murina AtT-20.
3. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2 en el cual la cantidad de proteína que modula la señalización de CRH está siendo determinada utilizando un anticuerpo que se fija a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 20.
- 15 4. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2 en el cual la cantidad de proteína que modula la señalización de CRH está siendo determinada por evaluación del nivel de transcripción génica de un gen que codifica una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 20.
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, en el cual el nivel de transcripción génica está siendo evaluado utilizando una sonda que se fija a un polinucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 20.
- 20 6. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 4 ó 5 en el cual el nivel de expresión génica se analiza utilizando tecnología de microrredes.
7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en el cual el nivel de transcripción génica se analiza utilizando una red de sondas oligonucleotídicas que se fijan a los polinucleótidos que codifican el grupo de polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 20.
- 25 8. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, en el cual el nivel de transcripción génica se analiza utilizando una red de sondas oligonucleotídicas que se fijan a los polinucleótidos que tienen la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO. 19.
9. Un método para identificación de un compuesto capaz de alterar la respuesta de exposición prolongada a CRH en una célula, comprendiendo dicho método:
  - 30 a) poner en contacto una célula que expresa al menos una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 20, con dicho compuesto de test; y
  - b) comparar la respuesta de CRH de dicha célula en presencia y ausencia de dicho compuesto.
10. Un método de acuerdo con la reivindicación 9, en el cual la célula es una célula hospedadora capaz de expresar al menos una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 20.
- 35 11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, en el cual la célula hospedadora se transfecta con al menos un vector que comprende una secuencia reguladora.
12. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, en el cual la célula hospedadora se transfecta con al menos un vector que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 20.
- 40

Tabla 1

|        | Nombre de Gen | CDS      | SEQ ID |    | Título                                                                                                           | Secuencia Derivada de |
|--------|---------------|----------|--------|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
|        |               |          | NA     | AA |                                                                                                                  |                       |
| abajo  | 1700015E05Rik |          | 1      |    | Gen RIKEN cDNA 1700015E05                                                                                        | A1842377              |
| abajo  | 2300002F08Rik |          | 2      |    | Gen RIKEN cDNA 2300002F06                                                                                        | AW123564              |
| abajo  | 2610008L04Rik |          | 3      |    | Gen RIKEN cDNA 2610008L04                                                                                        | A1845337              |
| abajo  | 2610511G02Rik |          | 4      |    | Gen RIKEN cDNA 2610511G02                                                                                        | AV221664              |
| abajo  | 4931430I01Rik |          | 5      |    | Gen RIKEN cDNA 4931430I01                                                                                        | AI626942              |
| abajo  | AI414047      |          | 6      |    | Secuencia expresada AI414047                                                                                     | AW125649              |
| abajo  | Géneros:47634 |          | 7      |    | ESTs, moderadamente similar a<br>PROTEÍNA 3 SIMILAR A VISININA<br>VIS3 DE RATÓN [M.musculus]                     | C80148                |
| abajo  |               |          | 8      |    | ESTs, moderadamente similar a<br>PROTEÍNA 3 SIMILAR A VISININA<br>VIS3 DE RATÓN [M.musculus]                     | AI643393              |
| abajo  | B-FABP        |          | 9      |    | Gen de la proteína fijadora de ácidos<br>grasos cerebrales                                                       | U04827                |
| abajo  | B-FABP        |          |        | 10 | Proteína fijadora de ácidos grasos<br>cerebrales                                                                 | AAA81904              |
| abajo  | Edg2          | 2141308  | 11     | 12 | Receptor 2 de diferenciación endotelial<br>de la proteína G acoplada a ácido<br>lisofosfatídico                  | U13370                |
| abajo  | Fgfr2         | 1-1038   | 13     | 14 | Receptor 2 del factor de crecimiento de<br>los fibroblastos                                                      | M23362                |
| abajo  | Gab1          | 24-2111  | 15     | 16 | Proteína 1 asociada a la proteína 2<br>fijada al receptor de factores de<br>crecimiento                          | AI046826              |
| abajo  | Hpoal1        | 261-842  | 17     | 18 | Simil-hipocalcina 1                                                                                              | AF085192              |
| abajo  | Hsd11b1       | 128-1006 | 19     | 20 | Hidroxiesteroide 11-beta-<br>deshidrogenasa 1                                                                    | X83202                |
| abajo  | Ntsr2         | 27-1280  | 21     | 22 | Receptor 2 de neurotensina                                                                                       | U51908                |
| abajo  | Ntsr1         | 444-1718 | 40     | 41 | Receptor 1 de neurotensina                                                                                       | NM 01876              |
| abajo  | Ywhaq         | 21-758   | 23     | 24 | Polipéptido theta de la proteína de<br>activación de tirosina 3-<br>monooxigenasa/triptófano 5-<br>monooxigenasa | U56243                |
| arriba | 1110014J22Rik |          | 25     |    | Gen RIKEN cDNA 1110014J22                                                                                        | AI842646              |
| arriba | 1200008D14Rik |          | 26     |    | Gen RIKEN cDNA 1200008D14                                                                                        | AW208938              |
| arriba | 1600023A02Rik |          | 27     |    | Gen RIKEN cDNA 1600023A02                                                                                        | AV019597              |
| arriba | 3110003A17Rik |          | 28     |    | Gen RIKEN cDNA 3110003A17                                                                                        | AA833425              |
| arriba | 3110023F10Rik |          | 29     |    | Gen RIKEN cDNA 3110023F10                                                                                        | AM95392               |
| arriba | AI467657      |          | 30     |    | Secuencia expresada AI467657                                                                                     | AI553024              |
| arriba | AI480570      |          | 31     |    | Secuencia expresada AI480570                                                                                     | AI848545              |
| arriba | Fkbp5         | 220-1590 | 32     | 33 | Proteína de fijación 5 de FK506 (51<br>kDa)                                                                      | U16959                |
| arriba | Pdyn          | 1-747    | 34     | 35 | Prodinorfina                                                                                                     | AV382264              |
| arriba | Perk1         | 297-1106 | 36     | 37 | Preproencefalina 1                                                                                               | M55181                |
| arriba | Sgk           | 69-1364  | 38     | 39 | Quinasa regulada por<br>suero/glucocorticoides                                                                   | AW046181              |

Fig. 1

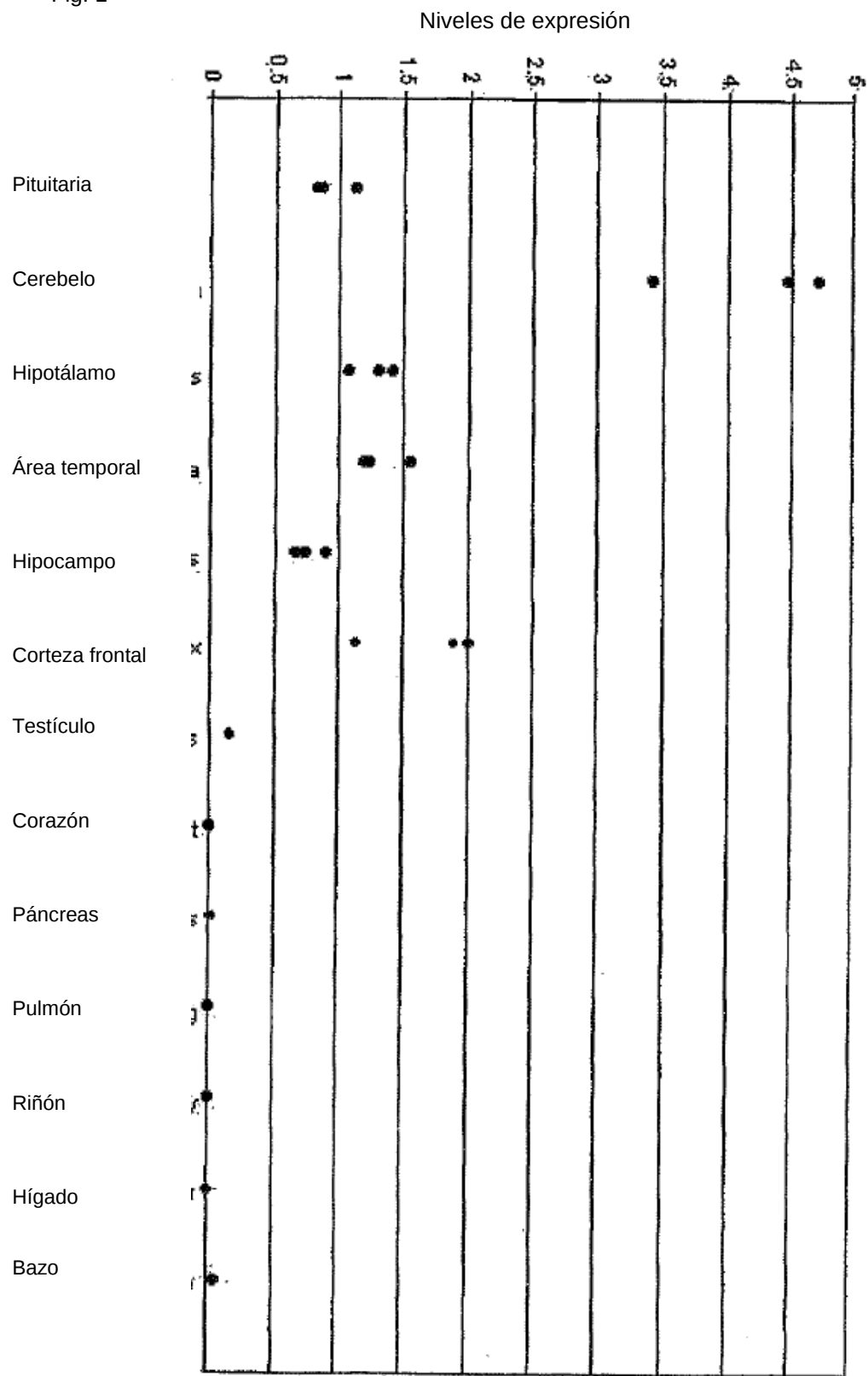
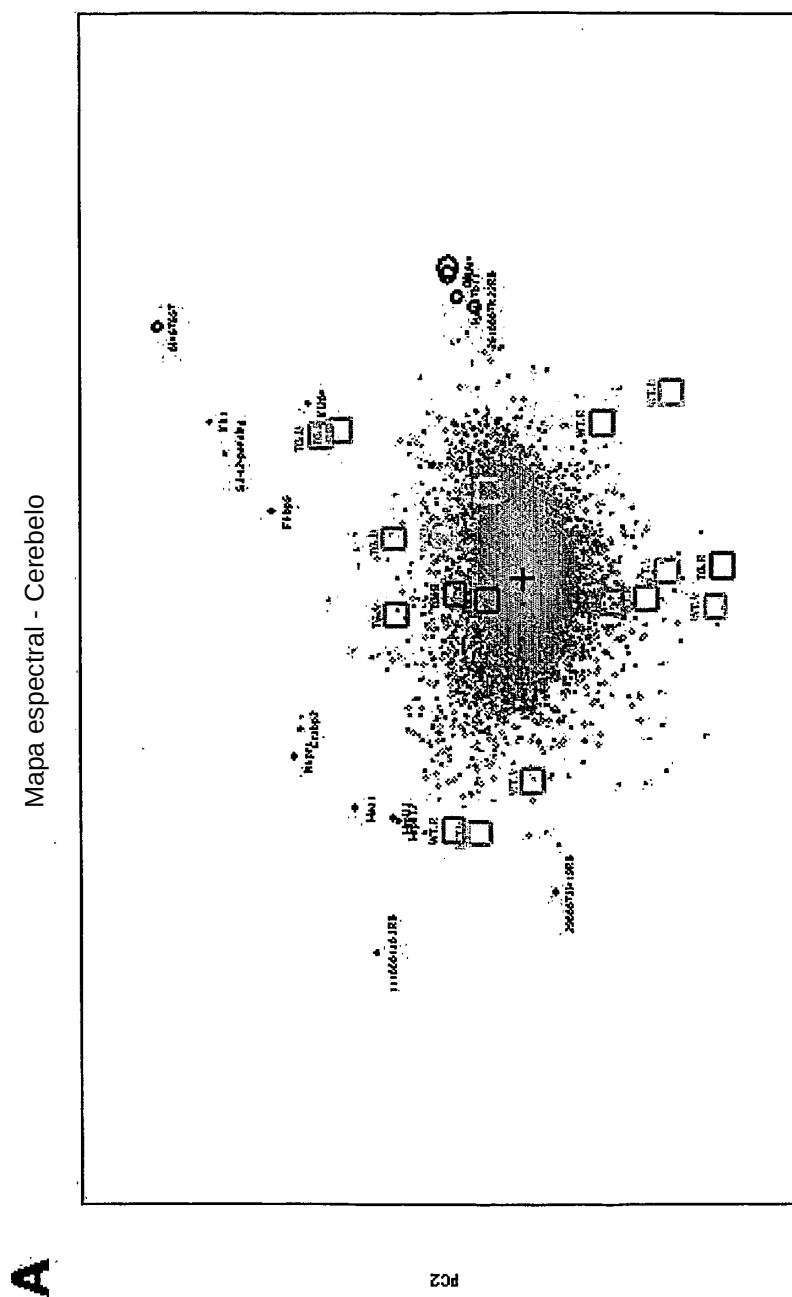


Fig. 2A



Repres. = + 7% + 12% , Cierre = Ninguno, Centro = Doble; Norm = Global, Escala = Uuc, RW = Media, CW = Media

Fig. 2B

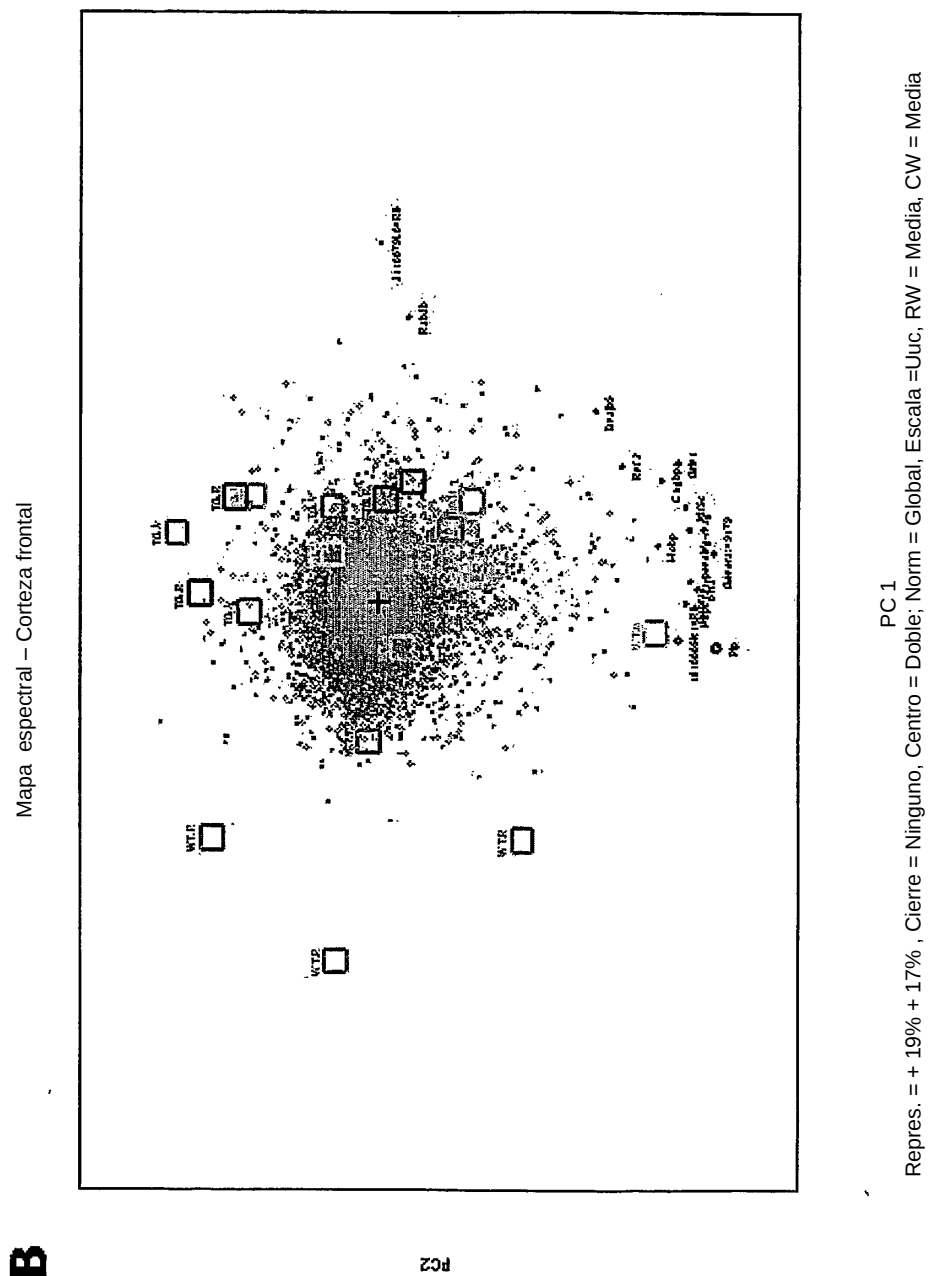


Fig. 2C

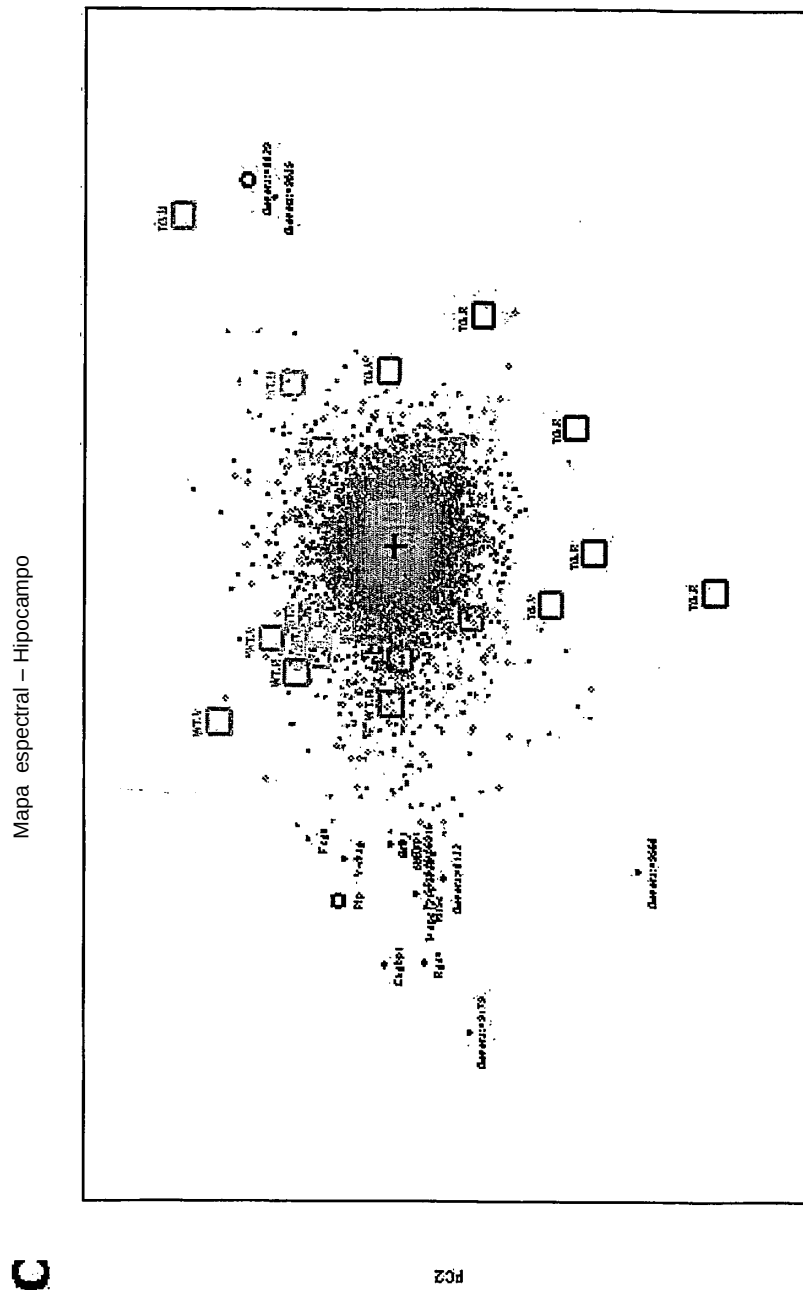


Fig. 2D

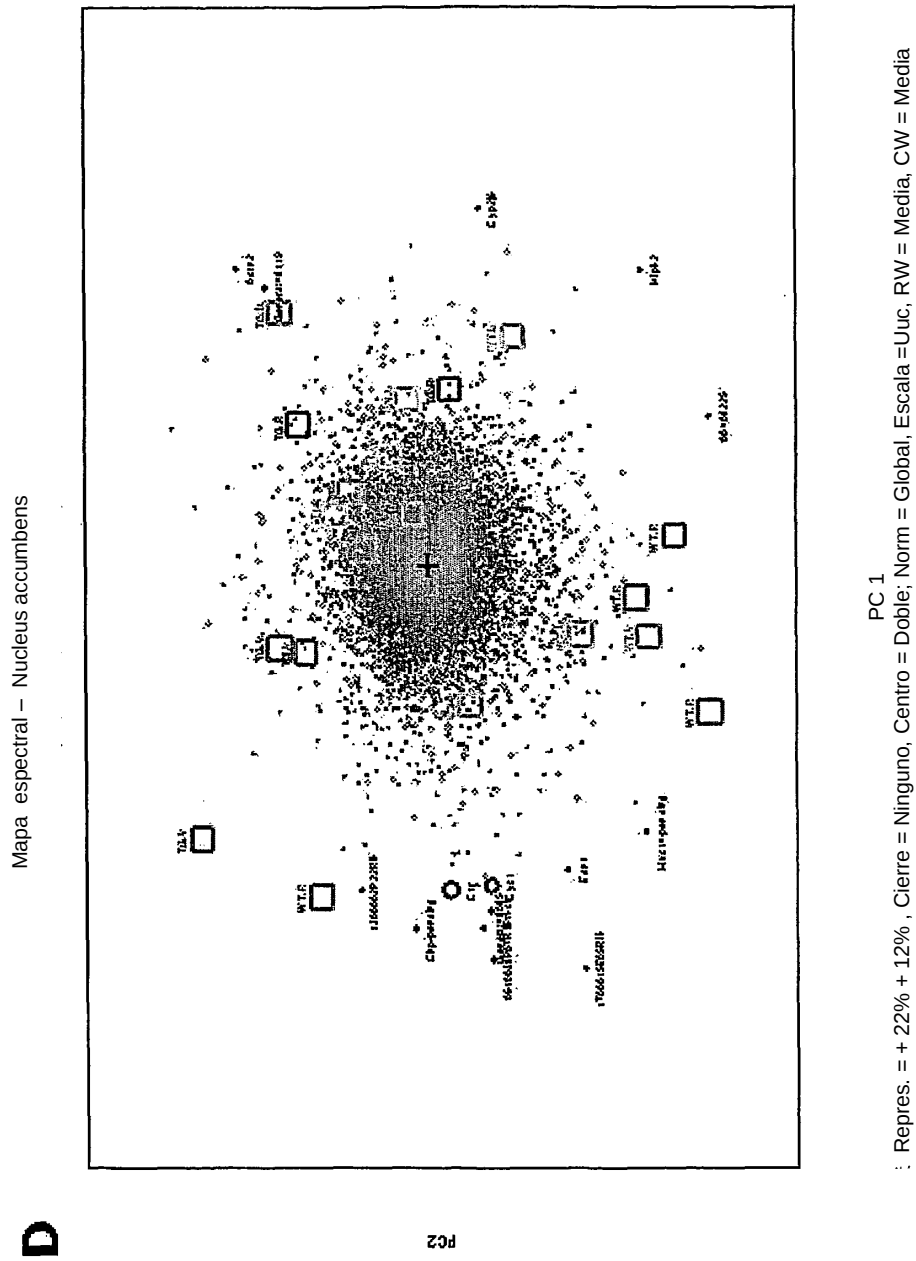


Fig. 2E

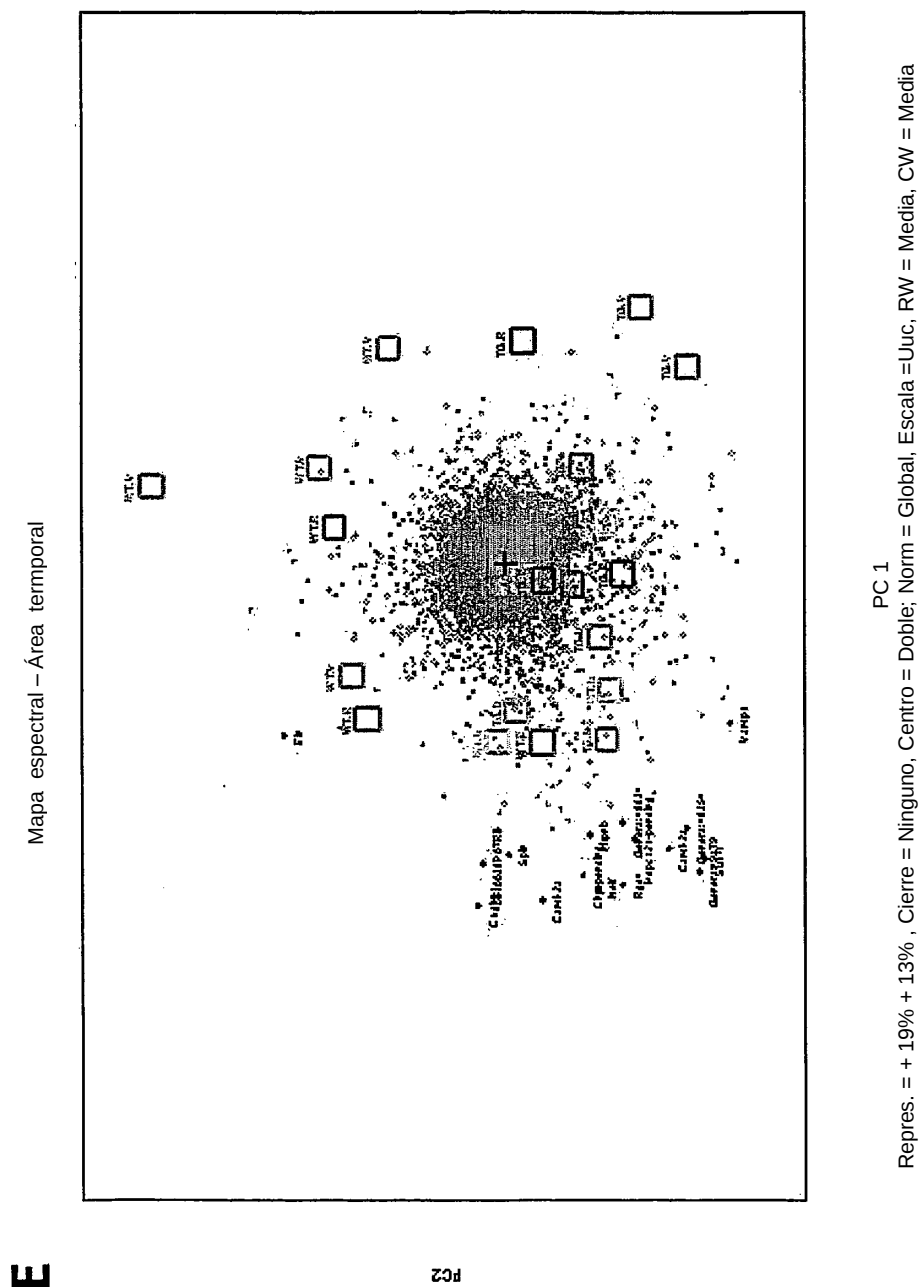


Fig. 2F

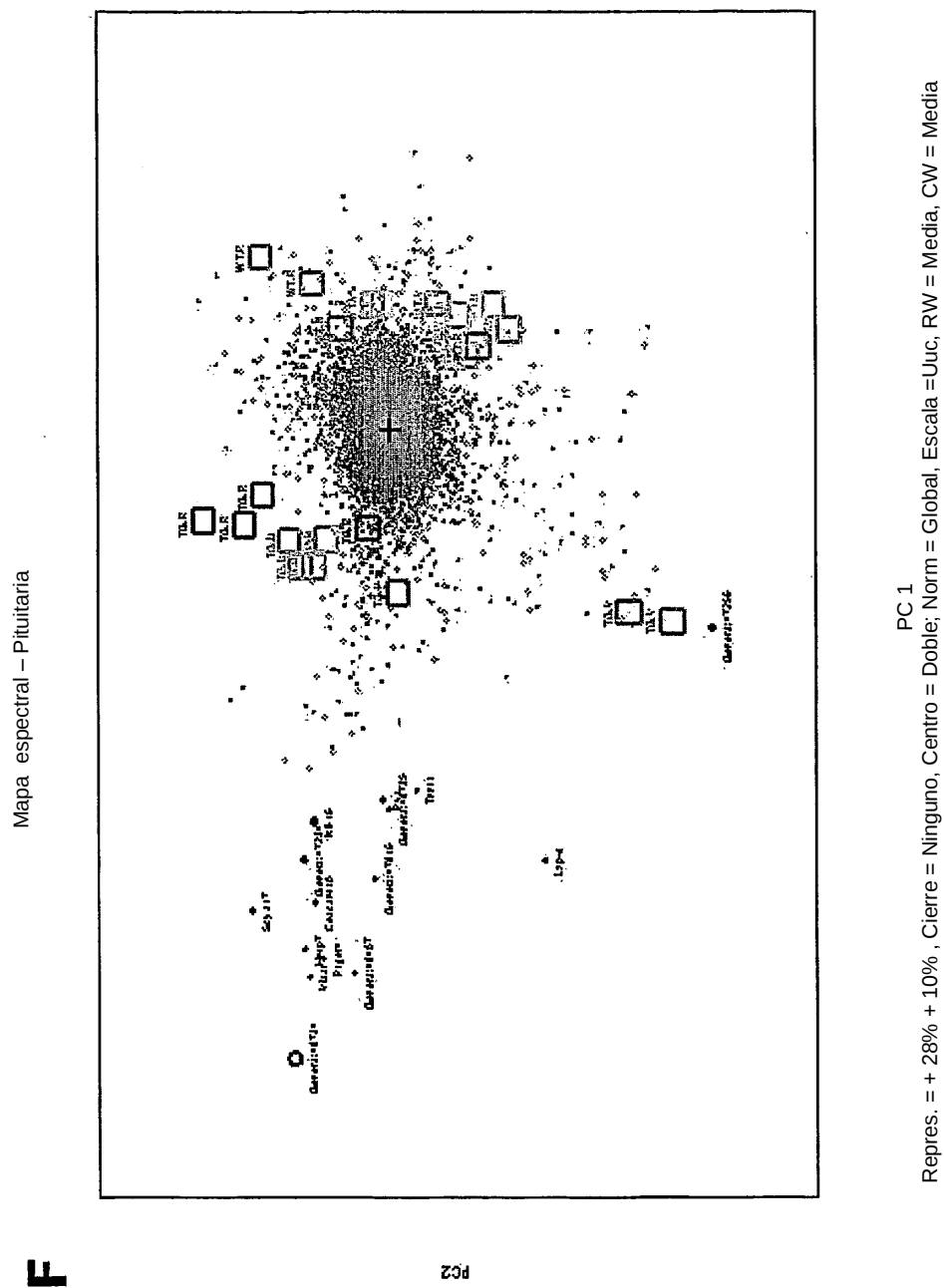


Fig. 3

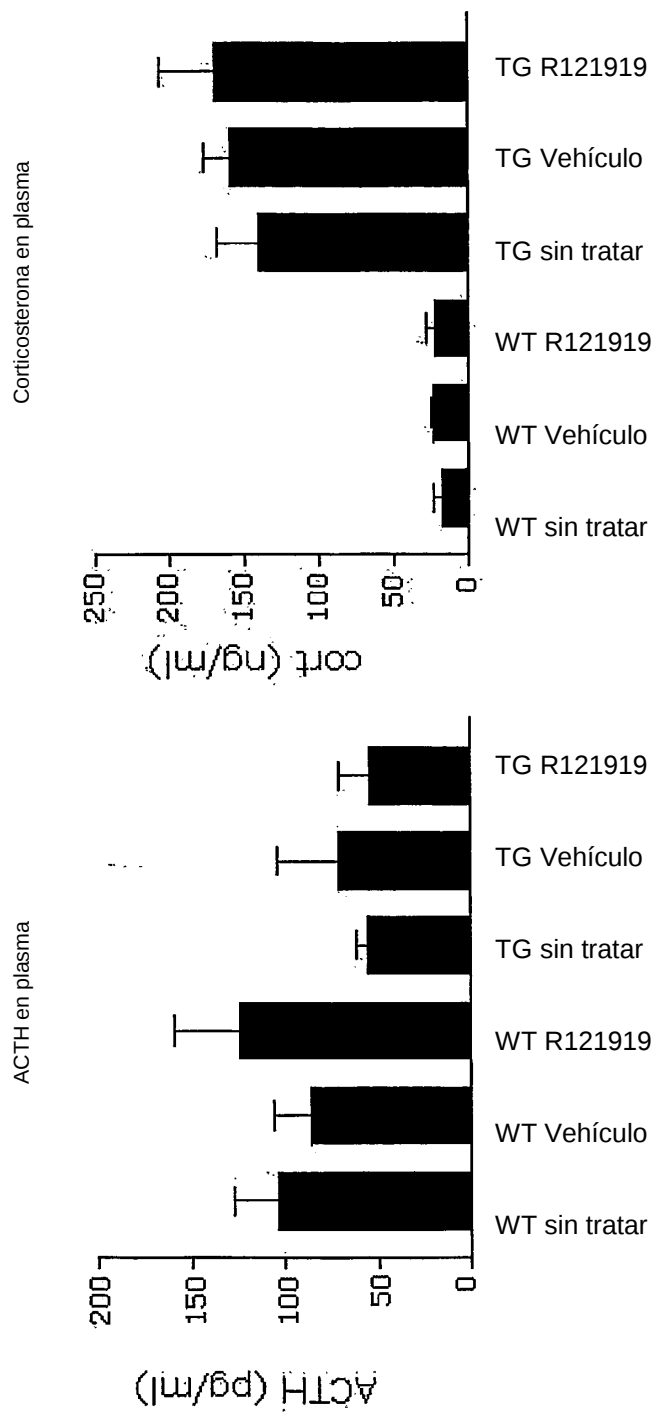


Fig. 4

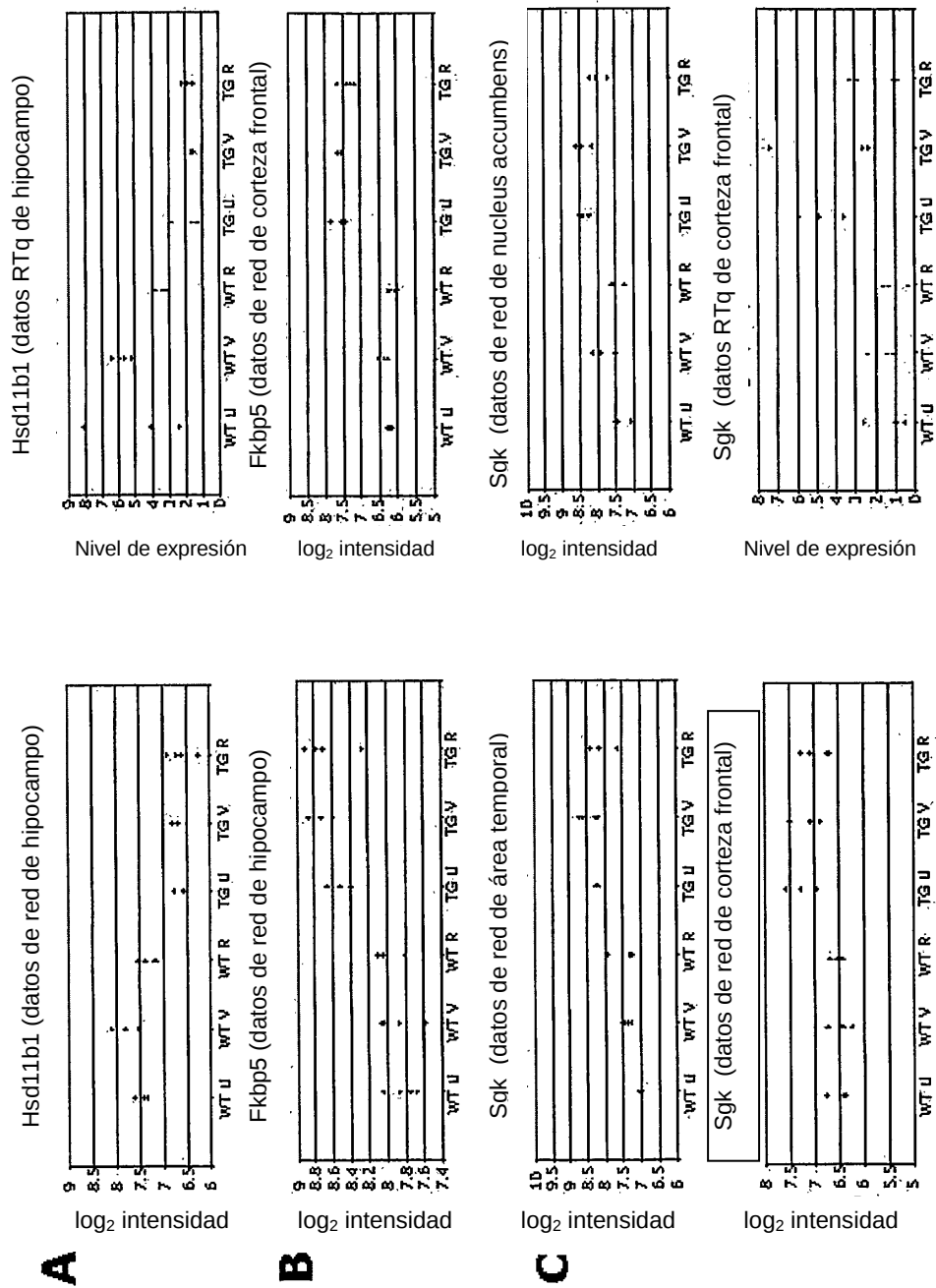


Fig.5

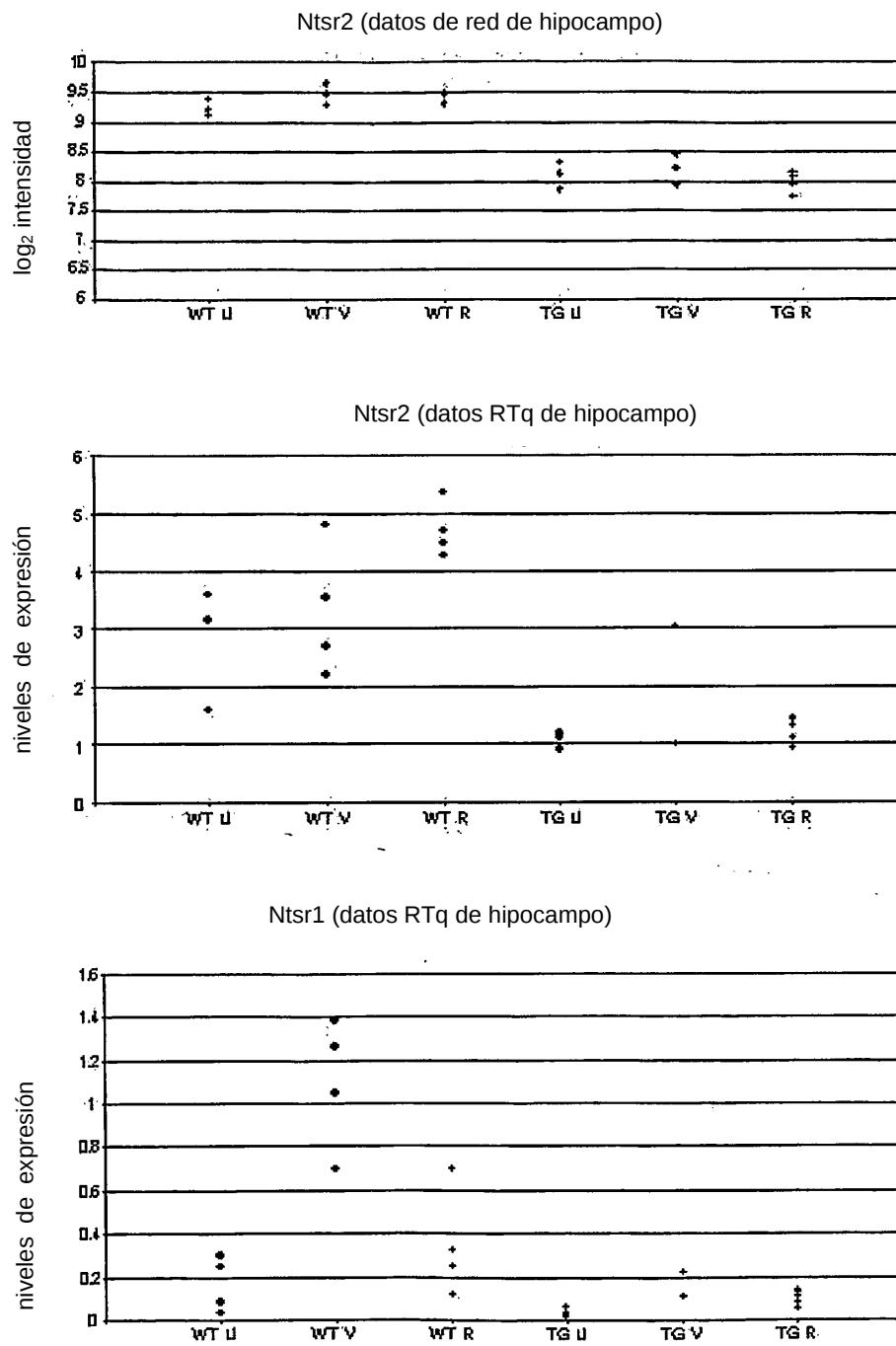


Fig.6

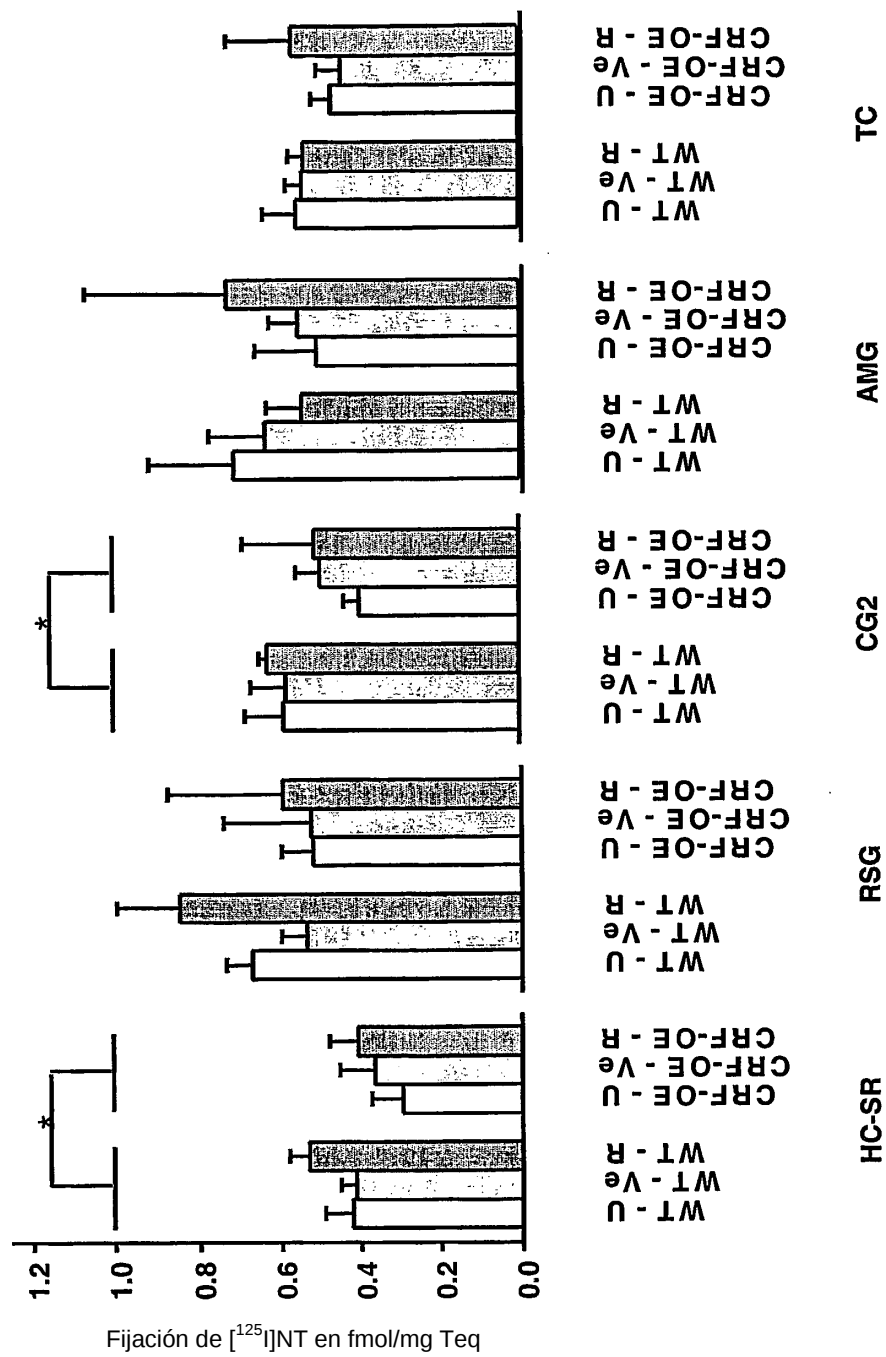


Fig.7

