

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-524024

(P2004-524024A)

(43) 公表日 平成16年8月12日(2004.8.12)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00	Z N A A
<b>A O 1 K 67/027</b>	A O 1 K 67/027	2 G O 4 5
<b>A 6 1 K 45/00</b>	A 6 1 K 45/00	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 48/00</b>	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 3
<b>A 6 1 P 21/00</b>	A 6 1 P 21/00	4 B O 6 5
		4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 163 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-561603 (P2002-561603)	(71) 出願人	597160510
(86) (22) 出願日	平成14年1月30日 (2002. 1. 30)		リジェネロン・ファーマシューティカルズ
(85) 翻訳文提出日	平成15年7月30日 (2003. 7. 30)		・インコーポレイテッド
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/002811		REGENERON PHARMACEU
(87) 国際公開番号	W02002/061046		TICALS, INC.
(87) 国際公開日	平成14年8月8日 (2002. 8. 8)		アメリカ合衆国10591-6707ニュ
(31) 優先権主張番号	60/264, 926		ーヨーク州タリータウン、オールド・ソー
(32) 優先日	平成13年1月30日 (2001. 1. 30)		・ミル・リバー・ロード777番
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	60/311, 697		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成13年8月10日 (2001. 8. 10)	(74) 代理人	100062409
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 安村 高明
(31) 優先権主張番号	60/338, 742	(74) 代理人	100113413
(32) 優先日	平成13年10月22日 (2001. 10. 22)		弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 新規の核酸およびポリペプチド分子

## (57) 【要約】

本発明は、MURF1、MURF3、またはMA-61と命名される新規の哺乳動物分子内シグナル伝達ポリペプチドをコードする核酸配列を提供する。本発明はまた、MURF1遺伝子産物またはMAFBX遺伝子産物を結合する因子を検出および/または測定するのに使用され得るアッセイシステムを提供する。本発明はまた、MURF1もしくはMAFBXと、シグナル伝達を開始するかまたはMURF1もしくはMA-61への結合、MURF1、MURF3、もしくはMA-61のmRNA発現の阻害因子、またはMURF1経路、MURF3経路、もしくはMAFBX経路の阻害を介してユビキチン結合の阻害を開始する因子との間の相互作用に基づく診断方法および治療方法を提供する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

図 7、9 および 17 に示されるようなアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

**【請求項 2】**

MURF1、またはそのフラグメントをコードする単離された核酸分子であって、以下：  
(a) 図 6、8、または 17 に示されるような MURF1 のコード領域を含むヌクレオチド配列；

(b) 相補体が、(a) のヌクレオチド配列にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、該ヌクレオチド配列は、MURF1 の生物学的活性を有する分子をコードする、配列；または

(c) 遺伝コードの縮重がなければ、該(a) のヌクレオチド配列の相補体または該(b) の相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列であり、そして該ヌクレオチド配列は、MURF1 の生物学的活性を有する分子をコードする、配列、  
からなる群から選択される配列を有する、核酸分子。

**【請求項 3】**

哺乳動物ゲノム由来の単離された核酸分子であって、以下：

a) ストリンジェントな条件下で図 6、8、または 16 の核酸分子にハイブリダイズし；  
そして

b) 環状ドメインを含む遺伝子産物をコードする、  
核酸分子。

**【請求項 4】**

MURF1、またはそのフラグメントをコードする単離された核酸分子であって、以下：  
(a) 図 6、8、または 16 に示されるような MURF1 のコード領域を含むヌクレオチド配列；

(b) 相補体が(a) のヌクレオチド配列にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、該ヌクレオチド配列は、MURF1 の生物学的活性を有する分子をコードする、配列；または

遺伝コードの縮重がなければ、(c) 該(a) のヌクレオチド配列の相補体または該(b) の相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列であり、そして該ヌクレオチド配列は、MURF1 の生物学的活性を有する分子をコードする、配列、および

(d) MURF3 (図 21) をコードするヌクレオチド配列を包含しない配列からなる群から選択される配列を有する、核酸分子。

**【請求項 5】**

請求項 1、2、3、または 4 に記載の核酸分子によってコードされる単離されたポリペプチド。

**【請求項 6】**

請求項 1、2、3、または 4 に記載の核酸分子を含むベクター。

**【請求項 7】**

請求項 6 に記載のベクターであって、ここで前記核酸分子は、宿主細胞においてその発現を指向し得る発現制御配列に作動可能に連結される、ベクター。

**【請求項 8】**

MURF1 ポリペプチドの産生のための宿主ベクター系であって、ここで該宿主ベクター系は、請求項 6 のベクターで形質転換された宿主細胞を含む、宿主ベクター系。

**【請求項 9】**

請求項 8 に記載の宿主ベクター系であって、ここで前記宿主細胞が細菌、酵母、昆虫細胞または哺乳動物細胞である、宿主ベクター系。

**【請求項 10】**

請求項 1、2、3、または 4 に記載の核酸を含む導入遺伝子を保有する細胞を有する、トランスジェニック動物。

## 【請求項 1 1】

請求項 1、2、3、または 4 に記載のヌクレオチド配列を含む遺伝子座において不活化される動物。

## 【請求項 1 2】

請求項 5 に記載の MURF 1 ポリペプチドを結合する抗体。

## 【請求項 1 3】

萎縮の阻害、肥大の誘導、ユビキチン結合の減少、ユビキチン経路の妨害、または MURF 1 発現または MURF 1 活性の調節の方法における使用のための MURF 1 アンタゴニスト。

## 【請求項 1 4】

萎縮の阻害、肥大の誘導、ユビキチン結合の減少、ユビキチン経路の妨害、または MURF 1 発現または MURF 1 活性の調節の方法における使用のための MURF 1 経路のアンタゴニスト。

## 【請求項 1 5】

筋肉萎縮の処置または MURF 1 を発現する筋肉細胞と化合物とを接触させる工程を包含する萎縮および関連する疾患および障害の検出、ならびに MURF 1 タンパク質活性またはユビキチン結合における変化の検出のために有用な化合物をスクリーニングする方法。

## 【請求項 1 6】

請求項 1 5 に記載の方法であって、ここで前記変化は、PCR、Taqman PCR、ファージディスプレイ系、ゲル電気泳動、酵母-ツーハイブリッドアッセイ、ノーザン分析もしくはウエスタン分析、免疫組織化学、従来のシンチレーションカメラ、ガンマカメラ、直線スキャナ、PETスキャナ、SPECTスキャナ、MRIスキャナ、NMRスキャナ、または X 線装置によって測定される、方法。

## 【請求項 1 7】

請求項 1 5 に記載の方法であって、ここで MURF 1 タンパク質活性における前記変化は、MURF 1 と 1 つ以上のタンパク質との相互作用における変化の検出によってか、別のタンパク質と環状ドメインとの相互作用における変化の検出によってか、またはユビキチン経路における 1 つ以上のタンパク質のユビキチン結合のレベルにおける変化の検出によって検出される、方法。

## 【請求項 1 8】

1 つ以上のタンパク質のうちの 1 つが MURF 1 の基質である、請求項 1 5 に記載の方法。

## 【請求項 1 9】

前記筋肉細胞が骨格筋起源である、請求項 1 5 に記載の方法。

## 【請求項 2 0】

前記筋肉細胞が、培養された細胞である、請求項 1 5 に記載の方法。

## 【請求項 2 1】

前記筋肉細胞が、トランスジェニック生物由来である、請求項 1 5 に記載の方法。

## 【請求項 2 2】

前記トランスジェニック生物としてはマウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ウシまたは霊長類が挙げられるが、これらに限定されない、請求項 2 1 に記載の方法。

## 【請求項 2 3】

前記筋肉細胞が、トランスジェニック生物内にある、請求項 1 5 に記載の方法。

## 【請求項 2 4】

前記トランスジェニック生物としてはマウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ウシまたは霊長類が挙げられるが、これらに限定されない、請求項 2 3 に記載の方法。

## 【請求項 2 5】

前記 MURF 1 および MURF 1 を検出し得る分子が、核酸である、請求項 1 5 に記載の方法。

## 【請求項 2 6】

10

20

30

40

50

前記 MURF1 および MURF1 を検出し得る分子が、ポリペプチドである、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 27】

前記化合物が、MURF1 のための基質である、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 28】

タンパク質発現における前記変化が、前記ユビキチン経路における 1 つ以上のタンパク質のタンパク質量における変化によって示される、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 29】

患者サンプルにおいて MURF1 を測定する工程を包含する、動物において筋肉萎縮を検出する方法。

10

【請求項 30】

MURF1 もしくはその環状ドメインを調節することによる萎縮の阻害または肥大の誘導をする方法。

【請求項 31】

症状が緩和されるように、MURF1 経路、ユビキチン結合、MURF1 または MURF1 の環状ドメインの発現または活性を調節する化合物を、動物に投与する工程を包含する、筋肉萎縮に関連する疾病、症候群または障害を処置する方法。

【請求項 32】

前記動物が、哺乳動物である、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記哺乳動物が、ヒトである、請求項 31 に記載の方法。

20

【請求項 33】

図 22 に示されるようなアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項 34】

MURF3、またはそのフラグメントをコードする単離された核酸分子であって、以下：

(a) 図 21 に示されるような MURF1 のコード領域を含むヌクレオチド配列；

(b) 相補体が (a) のヌクレオチド配列にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、該ヌクレオチド配列は、MURF3 の生物学的活性を有する分子をコードする、配列；または

30

(c) 遺伝コードの縮重がなければ、該 (a) のヌクレオチド配列の相補体または該 (b) の相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列であり、そして該ヌクレオチド配列は、MURF3 の生物学的活性を有する分子をコードする、配列、

からなる群から選択される配列を有する、核酸分子。

【請求項 35】

哺乳動物ゲノム由来の単離された核酸分子であって、以下：

a) ストリンジェントな条件下で図 21 の核酸分子にハイブリダイズし；そして

b) 環状ドメインを含む遺伝子産物をコードする、核酸分子。

【請求項 36】

40

MURF3、またはそのフラグメントをコードする単離された核酸分子であって、以下：

(a) 配列番号 7 に示されるような MURF1 のコード領域を含むヌクレオチド配列；

(b) 相補体が (a) のヌクレオチド配列にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、該ヌクレオチド配列は、MURF3 の生物学的活性を有する分子をコードする、配列；または

(e) 遺伝コードの縮重がなければ、該 (a) のヌクレオチド配列の相補体または該 (b) の相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列であり、そして該ヌクレオチド配列は、MURF3 の生物学的活性を有する分子をコードする、配列；および

(f) MURF1 (図 6、8、または 16) をコードするヌクレオチド配列を包含しない配列、

50

からなる群から選択される配列を有する、核酸分子。

【請求項 37】

請求項 33、34、35 または 36 に記載の核酸分子によってコードされる、単離されたポリペプチド。

【請求項 38】

請求項 33、34、35、または 36 に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項 39】

請求項 39 に記載のベクターであって、ここで前記核酸分子は、宿主細胞においてその発現を指向し得る発現制御配列に作動可能に連結される、ベクター。

【請求項 40】

請求項 38 に記載のベクターで形質転換される宿主細胞を含む、MURF3 ポリペプチドの産生のための宿主 - ベクター系。

【請求項 41】

前記宿主細胞が、細菌、酵母、昆虫細胞または哺乳動物細胞である、請求項 40 に記載の宿主 - ベクター系。

【請求項 42】

請求項 33、34、35、または 36 に記載の核酸を含む導入遺伝子を保有する細胞を有するトランスジェニック動物。

【請求項 43】

請求項 33、34、35、または 36 に記載のヌクレオチド配列を含む遺伝子座において不活化された動物。

【請求項 44】

請求項 37 に記載の MURF3 ポリペプチドを結合する抗体。

【請求項 45】

萎縮の阻害、肥大の誘導、ユビキチン結合の減少、ユビキチン経路の妨害、または MURF3 発現または MURF3 活性の調節の方法における使用のための MURF3 アンタゴニスト。

【請求項 46】

萎縮の阻害、肥大の誘導、ユビキチン結合の減少、ユビキチン経路の妨害、または MURF3 発現または MURF3 活性の調節の方法における使用のための MURF3 経路のアンタゴニスト。

【請求項 47】

筋肉萎縮の処置または MURF3 を発現する筋肉細胞と化合物とを接触させる工程を含有する萎縮および関連する疾患および障害の検出、ならびに MURF3 タンパク質活性またはユビキチン結合における変化の検出のために有用な化合物をスクリーニングする方法。

【請求項 48】

請求項 47 に記載の方法であって、ここで前記変化は、PCR、Taqman PCR、ファージディスプレイ系、ゲル電気泳動、酵母 - ツーハイブリッドアッセイ、ノーザン分析もしくはウエスタン分析、免疫組織化学、従来のシンチレーションカメラ、ガンマカメラ、直線スキャナ、PET スキャナ、SPECT スキャナ、MRI スキャナ、NMR スキャナ、または X 線装置によって測定される、方法。

【請求項 49】

請求項 47 に記載の方法であって、ここで前記 MURF3 タンパク質活性における変化は、MURF3 と 1 つ以上のタンパク質との相互作用における変化の検出によってか、別のタンパク質と環状ドメインとの相互作用における変化の検出によってか、またはユビキチン経路における 1 つ以上のタンパク質のうちの 1 つのユビキチン結合のレベルにおける変化の検出によって検出される、方法。

【請求項 50】

1 つ以上のタンパク質のうちの 1 つが MURF3 の基質である、請求項 47 に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 5 1】

前記筋肉細胞が骨格筋起源である、請求項 4 7 に記載の方法。

## 【請求項 5 2】

前記筋肉細胞が、培養された細胞である、請求項 4 7 に記載の方法。

## 【請求項 5 3】

前記筋肉細胞が、トランスジェニック生物由来である、請求項 4 7 に記載の方法。

## 【請求項 5 4】

前記トランスジェニック生物としてはマウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ウシまたは霊長類が挙げられるが、これらに限定されない、請求項 5 3 に記載の方法。

## 【請求項 5 5】

前記筋肉細胞が、トランスジェニック生物内にある、請求項 4 7 に記載の方法。

## 【請求項 5 6】

トランスジェニック生物としてはマウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ウシまたは霊長類が挙げられるが、これらに限定されない、請求 5 5 に記載の方法。

## 【請求項 5 7】

前記 M U R F 3 および M U R F 3 を検出し得る分子が、核酸である、請求項 4 7 に記載の方法。

## 【請求項 5 8】

前記 M U R F 3 および M U R F 3 を検出し得る分子が、ポリペプチドである、請求項 4 7 に記載の方法。

## 【請求項 5 9】

前記化合物が、M U R F 3 のための基質である、請求項 4 7 に記載の方法。

## 【請求項 6 0】

タンパク質発現における前記変化が、前記ユビキチン経路における 1 つ以上のタンパク質のタンパク質量における変化によって示される、請求項 4 7 に記載の方法。

## 【請求項 6 1】

患者サンプルにおいて M U R F 3 を測定する工程を包含する、動物において筋肉萎縮を検出する方法。

## 【請求項 6 2】

M U R F 3 もしくはその環状ドメインを調節することにより、萎縮の阻害または肥大の誘導をする方法。

## 【請求項 6 3】

症状が緩和されるように、M U R F 3 経路、ユビキチン結合、M U R F 3 の発現または活性を調節する化合物を、動物に投与する工程を包含する、筋肉萎縮に関連する疾病、症候群または障害を処置する方法。

## 【請求項 6 4】

前記動物が、哺乳動物である、請求項 6 3 に記載の方法。

## 【請求項 6 5】

前記哺乳動物が、ヒトである、請求項 6 3 に記載の方法。

## 【請求項 6 6】

図 1 1、1 3、または 1 9 に示されるようなアミノ酸配列を含むタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子。

## 【請求項 6 7】

M A F B X、またはそのフラグメントをコードする単離された核酸分子であって、以下：

( a ) 図 1 0、1 2、または 1 9 に示されるような M A F B X のコード領域を含むヌクレオチド配列；

( b ) 相補体が ( a ) のヌクレオチド配列にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、該ヌクレオチド配列は、M A F B X の生物学的活性を有する分子をコードする、配列；または

( c ) 遺伝コードの縮重がなければ、該 ( a ) のヌクレオチド配列の相補体または該 ( b

10

20

30

40

50

)の相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列であり、そして該ヌクレオチド配列は、M A F B Xの生物学的活性を有する分子をコードする、配列、からなる群から選択される配列を有する、核酸分子。

【請求項68】

哺乳動物ゲノム由来の単離された核酸分子であって、以下：

- a) ストリンジェントな条件下で図10、12、または18の核酸分子にハイブリダイズし；そして
- b) F - b o xドメインを含む遺伝子産物をコードする、核酸分子。

【請求項69】

哺乳動物ゲノム由来の単離された核酸分子であって、以下：

- a) ストリンジェントな条件下で図10、12、または18の核酸分子にハイブリダイズし；そして
- b) F b x 2 5ドメインを含む遺伝子産物をコードする、核酸分子。

【請求項70】

請求項66、67、68、または69に記載の核酸分子によってコードされる、単離されたポリペプチド。

【請求項71】

請求項66、67、68、または69に記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項72】

請求項71に記載のベクターであって、ここで前記核酸分子は、宿主細胞においてその発現を指向し得る発現制御配列に作動可能に連結される、ベクター。

【請求項73】

請求項6に記載のベクターで形質転換された宿主細胞を含むM A F B Xポリペプチドの産生のための宿主 - ベクター系。

【請求項74】

前記宿主細胞が、細菌、酵母、昆虫細胞または哺乳動物細胞である、請求項73に記載の宿主 - ベクター系。

【請求項75】

請求項66、67、68、または69に記載の核酸を含む導入遺伝子を保有する細胞を有する、トランスジェニック動物。

【請求項76】

請求項66、67、68、または69に記載のヌクレオチド配列を含む遺伝子座において不活化された、動物。

【請求項77】

請求項70に記載のM A F B Xポリペプチドを結合する、抗体。

【請求項78】

萎縮の阻害、肥大の誘導、ユビキチン結合の減少、ユビキチン経路の妨害、またはM A F B X発現またはM A F B X活性の調節の方法における使用のためのM A F B Xアンタゴニスト。

【請求項79】

萎縮の阻害、肥大の誘導、ユビキチン結合の減少、ユビキチン経路の妨害、またはM A F B X発現またはM A F B X活性の調節の方法における使用のためのM A F B X経路のアンタゴニスト。

【請求項80】

筋肉萎縮の処置またはM A F B Xを発現する筋肉細胞と化合物とを接触させる工程を包含する萎縮および関連する疾患および障害の検出、ならびにM A F B Xタンパク質活性またはユビキチン結合における変化の検出のために有用な化合物をスクリーニングする方法。

【請求項81】

10

20

30

40

50

請求項 80 に記載の方法であって、ここで前記変化は、PCR、Taqman PCR、ファージディスプレイ系、ゲル電気泳動、酵母 - ツーハイブリッドアッセイ、ノーザン分析もしくはウエスタン分析、免疫組織化学、従来のシンチレーションカメラ、ガンマカメラ、直線スキャナ、PETスキャナ、SPECTスキャナ、MRIスキャナ、NMRスキャナ、またはX線装置によって測定される、方法。

【請求項 82】

請求項 80 に記載の方法であって、ここで前記MAFBXタンパク質活性における変化は、MAFBXとの1つ以上のタンパク質と相互作用における変化の検出によってか、またはユビキチン経路における1つ以上のタンパク質のユビキチン結合のレベルにおける変化の検出によって検出される、方法。

10

【請求項 83】

1つ以上のタンパク質のうちの1つがMAFBXの基質である、請求項 80 に記載の方法。

【請求項 84】

前記筋肉細胞が骨格起源である、請求項 80 に記載の方法。

【請求項 85】

前記筋肉細胞が、培養された細胞である、請求項 80 に記載の方法。

【請求項 86】

前記筋肉細胞が、トランスジェニック生物由来である、請求項 80 に記載の方法。

【請求項 87】

前記トランスジェニック生物としてはマウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ウシまたは霊長類が挙げられるが、これらに限定されない、請求項 86 に記載の方法。

20

【請求項 88】

前記筋肉細胞が、トランスジェニック生物内にある、請求項 80 に記載の方法。

【請求項 89】

トランスジェニック生物としてはマウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ウシまたは霊長類が挙げられるが、これらに限定されない、請求 88 に記載の方法。

【請求項 90】

前記MAFBXおよびMAFBXを検出し得る分子が、核酸である、請求項 80 に記載の方法。

30

【請求項 91】

前記MAFBXおよびMAFBXを検出し得る分子が、ポリペプチドである、請求項 80 に記載の方法。

【請求項 92】

前記化合物が、MAFBXのための基質である、請求項 80 に記載の方法。

【請求項 93】

タンパク質発現における前記変化が、前記ユビキチン経路における1つ以上のタンパク質のタンパク質量における変化によって示される、請求項 80 に記載の方法。

【請求項 94】

患者サンプルにおいてMAFBXタンパク質またはmRNAを測定する工程を包含する、動物において筋肉萎縮を検出する方法。

40

【請求項 95】

MAFBXまたはそのF-boxを調節することにより萎縮の阻害または肥大の誘導をする方法。

【請求項 96】

症状が緩和されるように、MAFBX経路、ユビキチン結合、MAFBXまたはMAFBXのF-boxの発現または活性を調節する化合物を動物に投与する工程を包含する、筋肉萎縮に関連する疾病、症候群または障害を治療する方法。

【請求項 97】

前記動物が、哺乳動物である、請求項 96 に記載の方法。

50

## 【請求項 98】

前記動物が、ヒトである、請求項 96 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

本出願全体にわたり、種々の刊行物が、参照される。それらの内容におけるこれらの刊行物の開示は、本明細書により、本出願において参考として援用される。本出願は、米国仮出願第 60 / 264 , 926 号 (2001 年 1 月 30 日に提出された)、同第 60 / 311 , 697 号 (2001 年 8 月 10 日に提出された) および同第 60 / 338 , 742 号 (2001 年 10 月 22 日に提出された) に対する優先権を主張する。

## 【0002】

## (序論)

本発明は、新規のヒトヌクレオチド配列に関する。これらの 2 つ (本明細書中で示される、MURF1 および MA-61) は、ユビキチンリガーゼの新規の基質標的サブユニットをコードし、そして筋萎縮症を誘導するか、阻害するかまたは逆転させる (reverse) かのいずれかである状態または薬剤により変調される (modulated)。MURF-1 に対する高い相同性を有するさらなる配列は、基質がシンコイリン (Syncoilin) である、本明細書中に示される分子 MURF-3 をコードする。萎縮症の誘導は、これらの遺伝子の mRNA の発現における増加を引き起こし; 萎縮症の逆転 (reverse) または防止は、これらの遺伝子発現を減少させるかまたはブロックする。本明細書中に記載される MURF1 および MAFBX の cDNA 配列、ならびにさらなる実験は、MURF1 および MAFBX タンパク質分子が、ユビキチン化 (細胞内でのタンパク質分解を開始させる特定の経路) を引き起こすことを立証する。本発明は、MURF1、MURF-3 および / または MA-61 をコードする核酸分子、トランスジェニックマウス、ノックアウトマウス、宿主細胞発現系、ならびに本発明のヌクレオチドによってコードされるタンパク質を含む。本発明はさらに、これらの遺伝子自身およびそれらがコードするタンパク質、ユビキチン化、筋萎縮症ならびに関連する疾患、障害および状態に効果を現すような、強力な治療薬剤を同定するためのスクリーニングアッセイにおけるこれらの核酸の使用に関する。加えて本発明はさらに、関連疾患の処置のための、治療プロトコルおよびユビキチン経路およびその基質を標的化することを示す薬学的組成物を含む。本明細書中に開示される分子は、筋萎縮症を変調するか、または筋肥大を誘導するように機能する。

## 【0003】

## (発明の背景)

筋肉重量 (mass) の減少、または萎縮は、種々の生理学的状態および病理学的状態に関与する。例えば、筋萎縮症は、以下に起因して脱神経から生じ得る: 神経損傷; 変性ニューロパシー、代謝性ニューロパシーまたは炎症性ニューロパシー (例えば、グイリムバール症候群 (Guillain Barre syndrome)); 末梢ニューロパシー; または環境毒または薬物によって引き起こされる神経損傷。筋萎縮症はまた、以下に起因して、脱神経から生じ得る: 運動性ニューロパシー (例えば、成人の運動ニューロン疾患 (例えば、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) またはルー・ゲーリグ病) を含む); 乳児脊髄性筋萎縮および若年性脊髄性筋萎縮; ならびに多数の導体ブロック (conductor block) を伴う自己免疫性運動ニューロパシー。筋萎縮症はまた、例えば、以下に起因する麻痺から生じる慢性疾患から生じ得る: 脳卒中または脊髄損傷; 損傷 (例えば、骨折、捻挫または脱臼) に起因する骨格不動化; あるいは、長期の床上安静 (R. T. Jagoe, A. L. Goldberg, Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care 4, 183 (2001)). 代謝性ストレスまたは栄養性機能不全 (nutritional insufficiency) (また、筋萎縮症を結果として生じ得る) としては、特に、癌の悪液質、AIDS、および他の慢性疾患、飢餓 (fasting)、または横紋筋融解症、および内分泌性障害 (例えば、甲状腺および糖尿病の障害) が挙げられる。筋萎縮症は、筋ジストロフィー症候群 (例えば、デュシェーヌ、ベ

10

20

30

40

50

ツカー型、筋緊張性、顔面肩甲上腕型 (fascioscapulothoracic)、エメリー-ドライフス、眼咽頭、肩甲上腕、四肢帯 (limb girdle)、および先天性型)、ならびに遺伝性遠位型ミオパシーとして知られるジストロフィーに起因し得る。筋萎縮症はまた、先天性ミオパシー (例えば、良性先天性低張 (benign congenital hypotonia)、中心コア病、ネマリンミオパシー (nemaline myopathy)、および筋細管 (中心核) ミオパシー) に起因し得る。筋萎縮症はまた、老化プロセス中に起こる。

#### 【0004】

種々の病理学的状態における筋萎縮症は、蛋白分解の増大および筋タンパク質合成の減少に関連する。筋細胞は、リソソームプロテアーゼおよび細胞質可溶性プロテアーゼを含む。細胞質可溶性プロテアーゼとしては、 $Ca^{2+}$ -活性化中性プロテアーゼ (カルパイン) および ATP 依存性ユビキチン-プロテアソーム蛋白分解系が挙げられる。リソソーム系および細胞質可溶性系は、インビトロで筋タンパク質を分解し得るが、インビボでの筋タンパク質分解におけるそれらの役割については、ほとんど知られていない。いくつかの研究は、プロテアソームインヒビターが、ラットの骨格筋の萎縮における蛋白分解を減少させ (例えば、Tawara (1997) *J. Clin. Invest.* 100:197)、ユビキチン-プロテアソーム経路が、蛋白分解の増大において役割を有するという示唆を導くことを報告している。しかし、筋肉の萎縮における蛋白分解の詳細な機構は、十分に特徴付けられていないままである。蛋白分解のよりよい理解は、萎縮症の予防および処置のための戦略計画および薬剤を与える。

#### 【0005】

タンパク質分解は、タンパク質の存在量を制御するために細胞によって使用される共通のメカニズムである。しかし、全てのタンパク質を単に分解するのではなく、ユビキチン作用が、タンパク質標的選択に対して非常に特異的であるように思われる。このようなユビキチン-タンパク質結合体の形成は、3つの構成成分 (ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、および基質特異性決定構成成分 (E3)) からなるタンパク質複合体を伴って生じる (Skowryaら、1997, *Cell* 91:209-219)。どのタンパク質標的がユビキチン化されるかを調節する、いくつかの別個の分子戦略が存在する。最近発見された機構は、SCF E3 ユビキチンリガーゼ複合体と言われる (複合体の図解表示について図1を参照のこと)。このSCFタンパク質複合体は、いくつかの別個のタンパク質サブユニット (「F-box」と呼ばれるドメインを有するタンパク質を含む) を含む。リン酸化基質の存在下で、このSCF複合体は、その基質に結合し、そしてSCF複合体の一部でもあるE2 ユビキチントランスフェラーゼを用いて、それをユビキチン化する (Pattonら、1998, *Genes & Development* 12:692-705)。この結果は、基質の特異的なタンパク質分解性の分解である。F-boxタンパク質は、以下の3つのサブファミリーに分類され得る大きなファミリーを含む: 1) 複数のTrp-Asp反復 (WD-40反復) によって特徴付けられる、Fbws; 2) ロイシンリッチな反復によって特徴付けられる、Fbls; および 3) 既知のタンパク質相互作用ドメインを欠いている、Fbx (現在既知の哺乳動物のF-boxタンパク質ファミリーメンバーの考察について、Winstonら、1999, *Current Biology* 9:1180-1182を参照のこと)。F-boxタンパク質は、通常、特定のタンパク質基質およびF-boxと呼ばれる、42~48アミノ酸のモチーフと相互作用するさらなる基質結合ドメインを含む (Winston、1999)。hMAFBXの、他のF-boxを含むタンパク質との比較について、図2を参照のこと。

#### 【0006】

ユビキチンの、特定の基質への結合に関する別の機構は、「環状ドメイン」を含むタンパク質に参与する。環状ドメインタンパク質は、独立した単量体のユビキチンリガーゼとして作用し得るか、またはそれらのタンパク質は、SCF複合体の一部として機能し得るかのいずれかである。環状ドメインタンパク質は、F-boxタンパク質を有する場合、

通常、特定の基質に結合する第2のドメインを含む。この環状ドメインは、ユビキチンリガーゼを補強する。最終的な結果は、最終的に蛋白質分解を生じる、基質のユビキチン化である。

#### 【0007】

正常な筋組織の維持に関連する別のタンパク質複合体は、筋細胞の細胞外マトリクスとアクチン細胞骨格との間の連結において不可欠な役割を果たすと考えられる、ジストロフィンタンパク質複合体である。ジストロフィンタンパク質複合体の鍵となる成分は、 $\alpha$ -ジストロブレビン (*dystrobrevin*) (その非存在が、神経筋接合部欠損および筋ジストロフィーを結果的に生じる、ジストロフィン関連タンパク質) である。最近、シンコイリン (*Syncoilin*) と呼ばれる、新規の  $\alpha$ -ジストロブレビン結合パートナーが、同定された (Neweyら、*JBC Papers in Press*、2000年10月25日)。シンコイリンは、中間フィラメントファミリーのメンバーである。これは、骨格筋および心臓において高発現され、そして神経筋接合部に集まる。

10

#### 【0008】

本発明に従って、MURF1 (正式には、MUSCLE ATROPHY - 16またはMA - 16と呼ばれる)、MURF3、およびMUSCLE ATROPHY - 61 (MA - 61) と名付けられた新規のタンパク質分子が、発見されている。MAFBXは、骨格筋および心臓において、そしてそれ程の程度ではないが、脳の特定の領域において特異的に発現される、新規のF-boxタンパク質である (図解表示について図3を参照のこと)。MAFBX mRNAの発現レベルは、骨格筋萎縮症の間に、顕著に増加する。MURF1は、骨格筋および心臓で特異的に発現される、新規の環状ドメインタンパク質 (略図について、図4を参照のこと) である。MURF1 mRNAの発現レベルは、骨格筋萎縮症の間に顕著に増加する。従って、MURF1またはMAFBXのmRNA発現が、筋萎縮症についての独特のマーカーを提供するという本発明と一致して発見されている。MURF3は、新規の環状ドメインタンパク質であり、その基質は、ジストロフィンタンパク質複合体に関与するシンコイリンである。この複合体は、正常な筋組織を維持に関与するので、MURF-3はまた、萎縮症、ならびに筋系の他の疾患および合併症の予防に有用である。本発明の発見は、萎縮症の処置および予防のための薬剤の同定、ならびに萎縮症の処置および予防のための標的薬剤に有用な経路の同定を可能にする。本発明は、特に、SCFタンパク質複合体およびジストロフィン複合体に関する正常な筋肉の機能に一般的識見を提供する。

20

30

#### 【0009】

(発明の要旨)

本発明は、新規の哺乳動物の細胞外シグナル伝達分子 (MURF1、MURF3、およびMUSCLE ATROPHY - 61 (MA - 61) と呼ばれる) のタンパク質および核酸配列、ならびに筋萎縮症もしくは他の関連疾患の処置における治療プロトコルおよびこのような分子を利用した組成物を提供する。本発明は、これらの分子の基質を同定するためのスクリーニングアッセイ、およびこれらの分子を変調するかまたは標的化する薬剤、ユビキチン結合またはユビキチン経路、もしくはジストロフィン複合体の同定に関する。これらのスクリーニングアッセイは、筋萎縮症および関連する障害の処置のための強力な治療薬剤を同定するために使用され得る。

40

#### 【0010】

本発明は、MAFBXのF-boxモチーフまたはMURF1およびMURF3の環状ドメインを含むタンパク質またはポリペプチド、ならびにこのようなモチーフおよび/またはドメインをコードする核酸を提供する。

#### 【0011】

本発明はまた、MURF3核酸とシンコイリン遺伝子との間の共結合 (*co-association*) を記載する。この相互作用は、正常筋細胞の機能、および特に、ジストロフィンタンパク質複合体、中間フィラメントスーパーファミリー、およびユビキチン結合タンパク質複合体の間の相互関係の識見を提供する。

50

## 【0012】

本発明はさらに、MA-61の新規のタンパク質-タンパク質相互作用ドメインを記載する。このドメインは、MAFBXタンパク質を、以前に発見されたF-boxを含むタンパク質(Fbx25)と比較することにより決定された。これら2つのタンパク質は、F-boxドメインと異なる相同な領域を含む。本出願人は、このドメインを、Fbx25相同ドメインと呼ぶ。MAFBXのFbx25との比較に関して、図5A~5Bを参照のこと。

## 【0013】

本発明はさらに、単離されたMURF1、MURF3、またはMAFBXの核酸分子、あるいはMAFBXのF-boxモチーフ、またはMURF1もしくはMURF3の環状ドメインを含むベクターを提供する。このベクターは、MURF1ペプチド、MURF3ペプチドまたはMAFBXペプチド、あるいはMA-61のF-boxモチーフ、あるいはMURF1核酸またはMURF3核酸の環状ドメイン、あるいはMURF1タンパク質、MURF3タンパク質、またはMAFBXタンパク質を、細菌内、酵母内、または哺乳動物細胞内で発現させるために、使用され得る。

## 【0014】

従って、本発明は、以下の核酸配列、このような核酸配列を発現する宿主細胞、ならびに以下のようなヌクレオチド配列の発現産物を含む：(a)MURF1、MURF3、またはMA-61をコードする、ヌクレオチド配列(ヒトホモログおよびラットホモログの両方を含む)、ならびにそれらの遺伝子産物；(b)MURF1分子、MURF3分子、およびMAFBX分子のサブユニットを標的化する新規の基質タンパク質をコードする、ヌクレオチド配列(MA-61のF-boxモチーフ、MURF1またはMURF3の環状ドメイン、MURF3分子のシンコイリン遺伝子と共結合する部分、ならびにMA61のFbx25相同ドメインを含む)；(c)ドメインの全てまたは一部が欠失または変化された、新規分子(MURF1、MURF3、およびMAFBXin)の変異体、ならびにこのようなヌクレオチド配列により特定されるポリペプチド産物をコードする、ヌクレオチド配列；(d)新規のユビキチン経路分子、または別のポリペプチドと融合した、1つのドメインを含む融合タンパク質をコードする、ヌクレオチド配列ドメイン、ならびに新規のジストロフィン複合体タンパク質または別のポリペプチドと融合したそれらのドメインの1つをコードする、ヌクレオチド配列ドメイン、(e)上記に列挙されたヌクレオチド配列のいずれかと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする、ヌクレオチド配列(ストリンジェントな条件としては、例えば、5xSSPE(0.18M NaCl、0.01M NaPO<sub>4</sub>、pH7.7、0.001M EDTA)緩衝液中に30%ホルムアミドを含む緩衝液中で、42の温度でハイブリダイズし、42で、0.2xSSPEによって洗浄された場合に結合を維持する条件；好ましくは、5xSSPE緩衝液中に50%ホルムアミドを含む緩衝液中で、42の温度でハイブリダイズし、42で、0.2xSSPE緩衝液によって洗浄された場合に結合を維持する条件；または、好ましくは、20%SDS、10%BSA、1M NaPO<sub>4</sub>、0.5M EDTA、pH8を含む緩衝液中で、60の温度でハイブリダイズし、65で、0.1%SDSを含む2xSSCによって洗浄された場合に結合を維持する条件)；ならびに(f)少なくとも100塩基対の長さで配列のブロック内で、上記に列挙されるヌクレオチド配列に65%相同である、ヌクレオチド配列。

## 【0015】

本発明はさらに、ユビキチン経路、MURF1核酸もしくはMURF1タンパク質、MURF3核酸もしくはMURF3タンパク質またはMAFBX核酸もしくはMAFBXタンパク質の活性または発現、筋萎縮および/あるいはジストロフィン複合体と相互作用するかまたはこれらを調節する、薬物または因子をスクリーニングする際の、MURF1核酸もしくはMURF1タンパク質、MURF3核酸もしくはMURF3タンパク質またはMAFBX核酸もしくはMAFBXタンパク質、MA-61のF-boxモチーフ、MURF1またはMURF3のリングドメイン、Syncoilin遺伝子と同時結合するMU

10

20

30

40

50

R F 3 分子の部分、および M A - 6 1 の F b x 2 5 相同性ドメインの使用を提供する。従って、本発明は、M U R F 1 核酸もしくは M U R F 1 タンパク質、M U R F 3 核酸もしくは M U R F 3 タンパク質または M A F B X 核酸もしくは M A F B X タンパク質および/あるいはそれらの特定のドメインの使用を提供し、細胞内(特定には、筋細胞であるが、M A F B X 発現はまた、脳の領域で検出されるので、特定の神経細胞も含む)の特定の薬物、因子または分子の相互作用を追跡または調節するための使用を提供する。特定の実施形態において、M A F B X の F - b o x モチーフまたは M U R F 1 もしくは M U R F 3 のリングドメインは、M U R F 1 分子、M U R F 3 分子または M A F B X 分子との相互作用するかあるいはこれらの活性または発現を調節する分子または因子をスクリーニングするために利用される。他の実施形態において、M U R F 1 核酸または M U R F 1 タンパク質、

10

#### 【0016】

本発明はまた、M U R F 1 タンパク質もしくは M U R F 1 ペプチド、M U R F 3 タンパク質もしくは M U R F 3 ペプチドおよび M A F B X タンパク質もしくは M A F B X ペプチドの発現または活性を調節するか、あるいはユビキチン化を阻害するために細胞内で M U R F 1 タンパク質、M U R F 3 タンパク質および M A F B X タンパク質の相互作用をもたらすことによって、ユビキチン化および/または筋萎縮を低下させるための M U R F 1 核酸または M U R F 1 核酸タンパク質、M U R F 3 核酸または M U R F 3 タンパク質および M A

20

#### 【0017】

本発明はさらに、新規の M U R F 1 分子、M U R F 3 分子および M A F B X 分子ならびにそれらのサブユニットの全てのアゴニストおよびアンタゴニスト(低分子、高分子、ネイティブな M U R F 1 結合タンパク質、M U R F 3 結合タンパク質および M A F B X 結合タンパク質と競合する変異体、ならびに抗体を含む)、ならびに、M U R F 1 タンパク質および M U R F 1 ペプチド、M U R F 3 タンパク質および M U R F 3 ペプチドならびに M A F B X タンパク質および M A F B X ペプチドの発現を阻害するために使用され得る(アンチセンス分子およびリボザイム分子ならびに遺伝子調節構築物または遺伝子置換構築物を含む)、または M U R F 1 タンパク質もしくは M U R F 1 ペプチド、M U R F 3 タンパク質もしくは M U R F 3 ペプチドおよび M A F B X タンパク質もしくは M A F B X ペプチドの発現を増強するためのヌクレオチド配列(M U R F 1 遺伝子、M U R F 3 遺伝子または M A F B X 遺伝子を強力なプロモータ配列の制御下に置く発現構築物を含む)、そして、M U R F 1 導入遺伝子、M U R F 3 導入遺伝子もしくは M A F B X 導入遺伝子を発現するトランスジェニック動物または M U R F 1 分子、M U R F 3 分子もしくは M U F B X 分子を発現しないノックアウト動物を包含する。

30

#### 【0018】

本発明はまた、ヒト(h) M U R F 1、げっ歯類(r) M U R F 1、(h) M U R F 3、(r) M U R F 3、(h) M A - 6 1、または(r) M A F B X DNA の配列の範囲内に含まれる配列とハイブリダイズ可能な核酸プローブを提供し、ヒトおよびげっ歯類において M U R F 1 mRNA、M U R F 3 mRNA または M A F B X mRNA を発現する組織の検出のために有用である。

40

#### 【0019】

本発明はさらに、M U R F 1、M U R F 3 および M A F B X の結合サブユニットの誘導体およびアナログ(これらは、筋萎縮ならびに関連する疾患および障害の予防のための潜在的な治療法として分子の活性を調節する)を同定するためのスクリーニング方法を包含する。本発明は、M U R F 1、M U R F 3 および M A - 6 1 またはその誘導体、フラグメントもしくはドメイン(例えば、M A - 6 1 の F - b o x モチーフ、M U R F 1 および M U R F 3 のリングドメイン、S y n c o i l i n 遺伝子と同時結合する M U R F 3 分子の部分、ならびに M A - 6 1 の F b x 2 5 相同性ドメイン)と相互作用するタンパク質をスク

50

リーニングするための方法を提供する。本発明に従って、スクリーニング方法は、タンパク質 - タンパク質相互作用を同定するための既知のアッセイを利用し得、このようなアッセイとして、ファージディスプレイアッセイ、タンパク質に結合する抗体を用いる免疫沈降に続くサイズ分画分析、ウエスタン分析、ゲル電気泳動、酵母 2 ハイブリッドアッセイ系またはこれらの改変が挙げられる。

**【 0 0 2 0 】**

本発明はさらに、MURF 1 タンパク質、MURF 3 タンパク質、もしくはMAFBX タンパク質、またはMAFBX タンパク質のF - boxモチーフ、またはMURF 1 タンパク質もしくはMURF 3 タンパク質のリングドメイン、またはそれらのフラグメントもしくは誘導体に対するモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を含む、抗体を提供する。

10

**【 0 0 2 1 】**

本発明はさらに、診断上および治療上の有用性を有する。このような方法は、診断検査または遺伝子検査のための遺伝子配列および/または遺伝子産物配列を利用し得る。本発明の特定の実施形態において、MURF 1 mRNA、MURF 3 mRNAもしくはMAFBX mRNAの発現の検出方法、または本明細書中に記載されるMURF 1 タンパク質、MURF 3 タンパク質もしくはMAFBX タンパク質の検出方法は、神経筋接合部を冒すものを含む、心臓または骨格の、種々の病気、症候群または障害と関連する骨格筋萎縮の診断において使用され得る。ユビキチン経路を調節または標的化する分子における変異は、検出され得、そして被験体は、筋萎縮に関連する疾患または障害が進行する危険性

20

**【 0 0 2 2 】**

他の実施形態において、MURF 1 mRNA、MURF 3 mRNAまたはMAFBX mRNAの発現の操作、あるいはこれらの遺伝子もしくは遺伝子産物の活性もしくは発現と相互作用するかまたは遺伝子もしくは遺伝子産物を調節する他の因子は、筋萎縮およびジストロフィーに関連する病気、症候群または障害（例えば、骨格筋または心筋の障害）の処置において使用され得る。さらに、MURF 1 核酸もしくはMURF 1 タンパク質、MURF 3 核酸もしくはMURF 3 タンパク質またはMAFBX 核酸もしくはMAFBX タンパク質のレベルまた活性の測定または分析は、他の実施形態において、薬学的因子が萎縮過程を攪乱するか否かを決定するために使用され得；発現の増加は、タンパク質の崩壊における増加と相関するが、発現の減少または妨害は、筋タンパク質の崩壊の効果的な減少または妨害と相関する。さらなる実施形態において、MAFBXのF - boxモチーフまたはMURF 1もしくはMURF 3のリングドメインを、筋萎縮およびジストロフィーと関連する病気、症候群または障害（例えば、骨格筋または心筋の障害）の処置のために操作し得る。

30

**【 0 0 2 3 】**

本発明はさらに、筋細胞における萎縮を阻害する方法を包含し、この方法は、細胞を、MURF 1 タンパク質もしくはMURF 1 核酸、MURF 3 タンパク質もしくはMURF 3 核酸またはMAFBX タンパク質もしくはMAFBX 核酸のインヒビター、MURF 1 経路、MURF 3 経路またはMAFBX 経路のインヒビター、あるいはユビキチン化のインヒビターと接触させる工程を包含する。本発明はさらに、筋細胞における萎縮を阻害する方法を包含し、この方法は、細胞を、筋萎縮のインヒビターと接触させる工程を包含し、MURF 1 核酸もしくはMURF 1 タンパク質、MURF 3 核酸もしくはMURF 3 タンパク質またはMAFBX 核酸もしくはMAFBX タンパク質の発現の減少あるいはMURF 1 ペプチドもしくはMURF 1 タンパク質、MURF 3 ペプチドもしくはMURF 3 タンパク質またはMAFBX ペプチドもしくはMAFBX タンパク質の活性の減少を生じる。この実施形態において、MURF 1 核酸もしくはMURF 1 タンパク質、MURF 3 核酸もしくはMURF 3 タンパク質またはMAFBX 核酸もしくはMAFBX タンパク質の発現、あるいはMURF 1 ペプチドもしくはMURF 1 タンパク質、MURF 3 ペプチドもしくはMURF 3 タンパク質またはMAFBX ペプチドもしくはMAFBX タンパク質

40

50

の活性は、筋萎縮またはそれに関連する疾患を阻害における試験化合物の効率を証明するためのマーカーとして使用される。

【0024】

本発明はさらに、筋萎縮と関連する疾患または障害の処置において有用な因子をスクリーニングするための方法を提供し、この方法は、図7、9、11、13、17、19および22のアミノ酸配列をそれぞれ有するMURF1、MURF3またはMAFBX、あるいはそのフラグメントを発現する細胞およびその基質を化合物と接触させる工程、ならびにMURF1遺伝子産物、MURF3遺伝子産物またはMAFBX遺伝子産物のいずれかの活性の変化を検出する工程を包含する。活性のこのような変化は、MURF1遺伝子産物、MURF3遺伝子産物またはMAFBX遺伝子産物と1つ以上のタンパク質（例えば、そのタンパク質の基質の1つまたはユビキチン経路の構成要素の一つ）との相互作用における変化によってか、あるいはユビキチン化または基質の分解の変化によって、明らかにされ得る。

10

【0025】

本発明はさらに、筋萎縮に関連する疾患または障害の処置において有用な因子をスクリーニングするための方法を提供し、MURF1タンパク質、MURF3タンパク質、またはMAFBXタンパク質を生成する工程、およびこれらのタンパク質のいずれかをインビトロユビキチンリガーゼアッセイにおいて使用する工程を包含する。因子は、インビトロでの遍在性連結（ubiquity ligation）阻害におけるその有効性についてスクリーニングされる。

20

【0026】

本発明はまた、筋萎縮と関連する動物の疾患または障害を処置する方法を提供し、このような疾患または障害の症状が緩和されるように、MURF1経路、MURF3経路またはMAFBX経路、ユビキチン化、あるいはMURF1遺伝子もしくはMURF1遺伝子産物、MURF3遺伝子もしくはMURF3遺伝子産物またはMAFBX遺伝子もしくはMAFBX遺伝子産物の合成、発現または活性を調節する化合物をその動物に投与する工程を包含する。

【0027】

本発明は、筋萎縮と関連する動物の疾患または障害を診断する方法を提供し、この方法は、患者または患者サンプル中のMURF1遺伝子、MURF3遺伝子、またはMAFBX遺伝子の発現を測定する工程を包含する。例えば、本発明は、哺乳動物における筋萎縮を検出するための方法を提供し、この方法は、a)画像化因子と結合されたMURF1核酸もしくはMURF1ポリペプチド、MURF3核酸もしくはMURF3ポリペプチドまたはMAFBX核酸もしくはMAFBXポリペプチドを検出し得る分子を含む組成物を、その哺乳動物に投与する工程；b)その組成物を筋肉中に蓄積可能にする工程；ならびにc)筋萎縮の指標としてMURF1、MURF3またはMA-16の存在を検出するために、この蓄積された組成物を検出する工程。MURF1分子、MURF3分子、またはMAFBX分子に結合または付着し得るこのような分子は、例えば、化学物質、核酸、ポリペプチド、またはペプチドであり得る。さらに、このような診断薬は、転写物の量または発現産物の量を直接的に定量することによって遺伝子の発現を測定し得る。例えば、MURF1、MURF3またはMA-61ならびにこれらにコードされるタンパク質のレベルが、測定され得る。このような測定は、当該分野で公知の標準的技術（限定しないが、PCR、Taqman PCR、ノザン分析、ウエスタン分析または免疫組織化学が挙げられる）の使用を介してなされ得る。

30

40

【0028】

本発明はさらに、上記された方法を提供し、ここで、筋細胞は、トランスジェニック生物から得られるかまたはトランスジェニック生物内に存在し、ここで、このトランスジェニック生物としては、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ウシまたは霊長類が挙げられるが、これらに限定されない。

【0029】

50

本発明はさらに、萎縮が誘導する状態を有する動物において萎縮を阻害する方法を包含し、この方法は、有効量のMURF1タンパク質もしくはMURF1核酸、MURF3タンパク質もしくはMURF3核酸、またはMAFBXタンパク質もしくはMAFBX核酸のインヒビターで哺乳動物を処置する工程、あるいは細胞をMURF1経路、MURF3経路またはMAFBX経路のインヒビターで処理する工程を包含する。本発明はさらに、筋萎縮ならびに関連する疾患および障害の処置に有用な化合物をスクリーニングする方法を包含し、MURF1を発現する筋細胞を化合物と接触させる工程、およびMURF1タンパク質活性、MURF3タンパク質活性またはMAFBXタンパク質活性における変化を検出する工程を包含する。この変化は、PCR、Taqman PCR、ファージディスプレイ系、ゲル電気泳動、酵母2ハイブリッドアッセイ、ノザン分析またはウエスタン分析、免疫組織化学、慣用的なシンチレーションカメラ、ガンマカメラ、直進スキャナ、PETスキャナ、SPECTスキャナ、MRIスキャナ、NMRスキャナ、またはX線装置によって検出され得る。MURF1タンパク質活性、MURF3タンパク質活性またはMAFBXタンパク質活性の変化はまた、MURF1、MURF3またはMAFBXと1つ以上のタンパク質との相互作用の変化を検出することによって検出され得る。この方法は、筋細胞が骨格由来であるか、培養細胞であるか、トランスジェニック生物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ウシまたは霊長類）から得られたものであるか、あるいは、トランスジェニック生物において、使用され得る。タンパク質発現の変化は、ユビキチン経路における1つ以上のタンパク質のタンパク質量の変化によって実証され得る。

10

20

## 【0030】

本発明はさらに、動物における萎縮を阻害する方法を包含し、ここでこの動物は、萎縮が誘導する状態への曝露または発症に先立って処置される。このような、萎縮が誘導する状態は、不動化、脱神経、飢餓、栄養の欠乏、代謝性ストレス、糖尿病、老化、筋ジストロフィーまたはミオパシーを含み得る。好ましい実施形態において、萎縮が誘導する状態は、不動化、老化または床上安静である。好ましい実施形態において、萎縮が誘導する状態は、癌またはAIDSである。

## 【0031】

本発明はさらに、骨格筋細胞において筋の肥大を生じる方法を包含し、この方法は、骨格筋細胞をMURF1タンパク質もしくはMURF1核酸、MURF3タンパク質もしくはMURF3核酸またはMAFBXタンパク質もしくはMURF3核酸のインヒビターで処置する工程、あるいは骨格筋細胞をMURF1経路、MURF3経路またはMAFBX経路のインヒビターで処置する工程を包含する。

30

## 【0032】

化合物検出システムを利用する本発明の実施形態において、任意の検出器が、当該分野で公知であり、例えば、PCR、Taqman PCR、ノザン分析またはウエスタン分析、免疫組織化学、慣用的なシンチレーションカメラ、ガンマカメラ、直進スキャナ、PETスキャナ、SPECTスキャナ、MRIスキャナ、NMRスキャナ、およびX線装置である。さらに、当該分野で公知の任意の画像化因子（例えば、放射性核種またはキレート）が、使用され得る。

## 【0033】

MURF1、MURF3またはMAFBXを検出し得る分子は、核酸およびmRNAまたは合成オリゴヌクレオチドもしくは合成ポリペプチドであり得る。

40

## 【0034】

本発明のさらなる実施形態において、過剰なMURF1、MURF3またはMAFBXを罹患する患者は、MURF1遺伝子コード領域、MURF3遺伝子コード領域またはMAFBX遺伝子コード領域に対応する有効量のアンチセンスRNA、アンチセンスオリゴデオキシリボヌクレオチド、またはRNAiを投与することによって処置され、それによって、MURF1、MURF3および/またはMA-61の発現を減少され得る。

## 【0035】

(発明の詳細な説明)

50

本発明は、本出願人による、分子MURF1、MURF3およびMA-61の発見および特徴付けに基づく。MURF1およびMAFBXは、ラットおよびヒトの成体心臓および成体骨格筋の両方で発現され、そして、これらの発現は、骨格筋萎縮の様々な状態下で増加する。本発明は、ヒト(h)MURF1、ヒト(h)MURF3およびHUMAN MUSCLE ATROPHY-61(hMA-61)と呼ばれる新規ヒト細胞内シグナル伝達分子のタンパク質および核酸、ならびにRAT MURF1、RAT MURF3およびRAT MUSCLE ATROPHY-61(rMA-61)と呼ばれる新規ラット細胞内シグナル伝達分子のタンパク質および核酸を提供する。本説明の全体にわたって、MURF1、MURF3、またはMAFBXのタンパク質および核酸の言及としては、本明細書中で記載されるようなhMURF1、hMURF3、hMA-61、rMURF1、rMURF3またはrMAFBXのタンパク質および核酸の特定の実施形態が挙げられるが、これらに限定されない。MURF1分子およびMURF3分子はリング(ring)ドメインを含み、そしてMAFBXは、F-ボックスモチーフを含む。この分子のこれらのドメインの両方は、この分子と、それらの基質とユビキチンリガーゼ系との間の相互作用を促進する。

#### 【0036】

本発明は、ユビキチン経路に関する新規タンパク質およびその基質に関連する。本発明は、筋成長、筋機能化および筋増殖の障害に關与する新規核酸およびポリペプチドを提供する。これらとしては、このような活性を有する以下のようなMURF1、MURF3またはMAFBXのタンパク質もしくは核酸、またはそれらのドメインが挙げられる：例えば、MA-61のF-ボックスモチーフ、MURF1もしくはMURF3のリングドメイン、Syncollin遺伝子と共同提携(co-associate)するMURF3分子の一部、およびMA-61のFbx25相同ドメイン。

#### 【0037】

本発明は、MURF1、MURF3およびMAFBXの核酸、MURF1、MURF3およびMAFBXのポリペプチド、それらの誘導体およびアナログ、ならびにMURF1、MURF3もしくはMAFBXの核酸またはタンパク質の欠失変異体または種々のアイソフォームを含む。これらは、融合生成物(例えば、非MURF1、MURF3またはMAFBXのポリペプチドおよび核酸との融合生成物)として提供され得る。さらに、MURF1、MURF3およびMAFBXの核酸およびペプチドは、宿主発現系に関連され得る。

#### 【0038】

本発明はさらに、MURF1、MURF3およびMA-61をコードするヌクレオチド、タンパク質、ペプチド、MURF1、MURF3およびMA-61に対する抗体、それらのアゴニストおよびアンタゴニストの使用を提供する。本発明は、MURF1、MURF3およびMAFBXならびに/または分子の基質を同定するように設計されたスクリーニングアッセイに関し、この基質は、新規な分子であるMURF1、MURF3およびMAFBXの活性を、独立してかまたはそれらの基質に関連して調節する。さらに、本発明は、筋萎縮ならびに関連する疾患および障害を阻害、ブロックまたは改善する見込みのある治療薬を同定するために使用されるスクリーニングアッセイの使用に関する。

#### 【0039】

(遺伝子)

本発明は、核酸分子(これは、MURF1、MURF3またはMA-61をコードする)を提供する。本発明は、MURF1遺伝子産物、MURF3遺伝子産物およびMAFBX遺伝子産物(MURF1、MURF3およびMA-61の機能的ドメイン(例えば、MA-61のF-ボックスモチーフ、MURF1もしくはMURF3のリングドメイン、Syncollin遺伝子と共同提携するMURF3分子の一部、およびMA-61のFbx25相同ドメイン)を含む)に対応するポリペプチドまたはペプチドをコードする核酸配列、またはその誘導体、フラグメントもしくはドメイン、それらの変異形態、短縮形態または欠失形態、および前述のいずれかを組み込むかまたは生成する宿主細胞発現系を含む

。

## 【0040】

本発明は、図6、図8(a~c)、図10、図12、図16、図18および図21中のDNA配列；図7、図9、図11、図13、図17および図19のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする任意のDNA配列；ストリンジェント条件下または高ストリンジェント条件下で、図6、図8(a~c)、図10、図12、図16、図18および図21のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の相補鎖にハイブリダイズする任意のヌクレオチド配列、および/または低ストリンジェント条件下で、図7、図9、図11、図13、図17、図19および図22のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列の相補鎖にハイブリダイズする任意のヌクレオチド配列を含む核酸分子を含む。

10

## 【0041】

特定の実施形態において、本発明のヌクレオチド配列は、図10、図12および図18に対して、ストリンジェント条件下でハイブリダイズし、そしてF-ボックスモチーフのいずれかを含む遺伝子産物をコードし、そして、少なくとも47ヌクレオチド長である、哺乳動物ゲノム由来の任意のヌクレオチド配列を含む。

## 【0042】

本発明は、哺乳動物供給源由来の核酸分子およびタンパク質を含む。核酸配列としては、ゲノムDNA、cDNAまたは合成DNAが挙げられ得る。特定のアミノ酸配列をコードする核酸をいう場合、この核酸は、特定のアミノ酸配列をコードするようにプロセシングされたmRNA種が転写されるcDNA配列であり得ることが理解されるべきである。

20

## 【0043】

本発明はまた、開示された配列および/またはそれらの相補鎖のいずれか（これらは、調節エレメントに連結され得る）を含むベクターおよび宿主細胞を含む。このような調節エレメントとしては、以下が挙げられ得るが、これらに限定されない：発現を駆動するかまたは調節するためのプロモーター、エンハンサー、オペレーターおよび当業者に公知の他のエレメント（例えば、CMV、SV40、MCK、HSAおよびアデノプロモーター、lac系、trp系、TRC系、ファージAのプロモーターおよびオペレーター）。

## 【0044】

本発明はさらに、本明細書中に開示された核酸配列、および、開示された配列に対して約50%よりも高いアミノ酸同一性を有するMURF1、MURF3およびMAFBXの遺伝子産物をコードする遺伝子配列のいずれかのフラグメントを含む。

30

## 【0045】

特定の実施形態において、本発明は、MURF1、MURF3およびMAFBXをコードする核酸配列のヌクレオチドフラグメント（図6、図8(a~c)、図10、図12、図16、図18および図21）を提供する。このようなフラグメントは、MURF1、MURF3またはMAFBXの遺伝子配列の少なくとも8つのヌクレオチド（すなわち、ハイブリダイゼーション部分）からなり；他の実施形態において、この核酸は、MURF1配列、MURF3配列またはMAFBX配列の少なくとも25個連続するヌクレオチド、50ヌクレオチド、100ヌクレオチド、150ヌクレオチド、150ヌクレオチドまたは200ヌクレオチドからなる。別の実施形態において、この核酸は、47ヌクレオチド長より短い。本発明はまた、前述の配列に対してハイブリダイズ可能な核酸、または前述の配列の相補鎖に関する。全配列は、1本鎖であるか、2本鎖であり得る。さらに、本発明のヌクレオチド配列としては、図7、図9、図11、図13、図17および図19のMURF1配列、MURF3配列またはMAFBX配列によってコードされるポリペプチドに対して、少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%またはそれより高いアミノ酸配列同一性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列が挙げられ得る。

40

## 【0046】

本発明の1つの実施形態は、本明細書中の図7、図9、図11、図13、図17および図1に記載のアミノ酸配列に対応するMURF1ポリペプチド、MURF3ポリペプチドま

50

たはM A F B Xポリペプチド、またはM U R F 1、M U R F 3もしくはM A - 6 1 特異的活性もしくは特異的発現レベルを有するそれらのフラグメントをコードする組換え核酸である。

【0047】

なお別の実施形態は、ネイティブM U R F 1またはM A F B Xの配列を有する核酸の相補鎖に特異的にハイブリダイズし得る少なくとも18個連続した塩基を有する、本明細書中の図6、図8(a~c)、図10、図12、図16、図18および図21に記載のヌクレオチド配列、またはそれらのフラグメントを含む単離された核酸である。

【0048】

さらに、開示されたM U R F 1核酸、M U R F 3核酸またはM A F B X核酸の配列は、選択された発現系のために最適化され得るか(Hollerら、(1993)Gene 136:323~328; Martinら、(1995)Gene 154:150~166)、または核酸配列をコードする天然のM U R F 1、M U R F 3またはM A F B Xの単離において使用するための縮重オリゴヌクレオチドプライマーおよびプローブを生成するために使用され得る(「GCG」ソフトウェア、Genetics Computer Group, Inc., Madison, WI)。M U R F 1、M U R F 3またはM A F B Xをコードする核酸は、例えば、以下のために、発現ベクターの一部となり得、そして組換え宿主細胞に組み込まれ得る：発現およびスクリーニング、トランスジェニック動物、または、機能的な研究(例えば、M U R F 1またはM A - 6 1 媒介細胞活性、またはM U R F 1、M U R F 3もしくはM A F B XのmRNAおよび/もしくはタンパク質発現に関連する疾患に対する候補薬剤の効果)。発現系は、選択的な翻訳後プロセッシングを介して、M U R F 1ポリペプチド、M U R F 3ポリペプチドまたはM A F B Xポリペプチドの構造改変体および機能的改変体を達成するために、選択および/または変更される。

【0049】

特許請求されたM U R F 1核酸、M U R F 3核酸、またはM A F B X核酸は、単離されていても、純粋でも、かつ/または非天然でもよい。「純粋な」核酸は、所定のサンプル中の全ての核酸の少なくとも約90重量%、好ましくは、少なくとも約99重量%を構成する。「非天然」の核酸は、天然の産物であると考えられないかもしれない程度に操作された核酸である。非天然の核酸の1つの例は、当該分野において公知の組換え技術を介して産生された核酸である。この目的の核酸は、合成されても、組換え技術によって産生されても、細胞から精製されてもよい。本明細書中に開示されるヌクレオチド配列およびそれらのフラグメントを含む核酸は、それが天然の染色体上で結合されている配列以外の配列に直接隣接するか、またはそれが天然の染色体上で結合されている配列以外の配列に直接隣接する10kbより短い(好ましくは2kbより短い)ネイティブの隣接領域に隣接するように配列またはフラグメントを末端に含み得る。この核酸は、通常、RNA配列またはDNA配列であり、他の塩基またはヌクレオチドアナログを含む核酸を用いて、例えば、改変された安定性を提供することは、しばしば有利である。

【0050】

本発明は、以下を含むが、これらに限定されないM U R F 1核酸、M U R F 3核酸、またはM A F B X核酸の広範な種々の適用を提供する：筋萎縮症、ユビキチン化、あるいはM U R F 1核酸、M U R F 3核酸、およびM A F B X核酸またはポリペプチド自体の発現もしくは活性を調節する分子、薬剤および薬物の同定および研究；筋萎縮症またはユビキチン化のマーカーとして；筋萎縮症またはユビキチン化の予防または軽減のためのマーカーとして；筋ジストロフィーを調節する分子、薬剤および薬物の同定および研究；筋ジストロフィーのマーカーとして；筋ジストロフィーの予防または軽減のためのマーカーとして；翻訳可能な転写物、ハイブリダイゼーションプローブ、PCRプライマー、または診断核酸、イメージング剤として；M U R F 1遺伝子、M U R F 3遺伝子、またはM A F B X遺伝子および遺伝子転写物の存在の検出；ならびにさらなるM U R F 1ホモログ、M U R F 3ホモログ、またはM A F B Xホモログおよび構造的アナログをコードする核酸の検出または増幅。

## 【0051】

本明細書中に記載される、MURF1 mRNA、MURF3 mRNA、またはMAFBX mRNAに結合するか、またはその発現を調節する新規薬剤は、MURF1 mRNA、MURF3 mRNA、またはMAFBX mRNAを発現する細胞において筋萎縮症を予防し得る。本明細書中に記載される、MURF1、MURF3、またはMA-61に結合するかまたはそれが媒介するユビキチン化もしくはそれらの活性を調節する新規薬剤は、MURF1タンパク質、MURF3タンパク質、またはMAFBXタンパク質のいずれかを含む細胞において筋萎縮症を予防し得る。MAFBX mRNAの発現もしくはMAFBXタンパク質の活性を阻害するか、またはMA61経路を阻害する薬物または薬剤は、標的タンパク質の、特定のSCF E3ユビキチンリガーゼ媒介ユビキチン化を減少させることが予想される。MURF1 mRNA、MURF3 mRNAの発現、またはMURF1タンパク質もしくはMURF3タンパク質の活性を阻害するか、あるいはMURF1経路もしくはMURF3経路を阻害する薬物または薬剤は、標的タンパク質の、特定の環状ドメイン媒介ユビキチン化を減少させることが予想される。MA61 mRNAの発現またはMAFBxタンパク質の活性を阻害する薬物(rug)または薬剤は、標的タンパク質のF-ボックス媒介ユビキチン化を減少させることが予想される。MURF1、MURF3、またはMAFBXのcDNAまたはゲノムDNAの優性ネガティブな阻害形態は、骨格筋萎縮症をブロックするための遺伝子治療に用いられ得る。MURF1、MURF3、またはMAFBXのcDNAまたはゲノムDNAの優性ネガティブ阻害形態(MA-61のF-ボックスドメインもしくはFbx25ホモロジドメイン、またはMURF1もしくはMURF3の環状ドメインのいずれかが単独で発現される)もまた、骨格筋萎縮症をブロックするための遺伝子治療に用いられ得る。

## 【0052】

本発明は、MURF1遺伝子、MURF3遺伝子、およびMAFBX遺伝子(例えば、転写因子阻害剤、アンチセンスおよびリボザイム分子、ならびに遺伝子または調節配列置換構築物を含む)の発現を阻害するか、あるいはMURF1、MURF3、またはMAFBXの優性ネガティブ形態(例えば、このコード配列が、発現制御エレメントに作動可能に連結される発現構築物を含む)の発現を促進する抗体、アンタゴニスト、アゴニスト、化合物、またはヌクレオチド構築物をさらに包含する。

## 【0053】

本発明は、MURF1、MURF3、およびMA-61をコードする核酸の検出を提供する。これは、MURF1、MURF3、またはMAFBXのcDNA特異的配列を有し、かつ図6、図8(a~c)、図10、図12、図16、図18、および図21との特異的なハイブリダイゼーションをもたらすのに十分な核酸ハイブリダイゼーションプローブおよび複製/増幅プライマーの使用を通じて行われ得る。特異的なハイブリダイゼーションを実証することは、一般的に、ストリンジントな条件(例えば、42の温度で、5xSSPE(0.18M NaCl、0.01M NaPO<sub>4</sub>、pH7.7、0.001M EDTA)緩衝液中に30%ホルムアミドを含む緩衝液中でハイブリダイズし、そして42の温度で、0.2xSSPEを用いる洗浄に供する場合に結合を保持すること;好ましくは42の温度で、5xSSPE緩衝液中に50%のホルムアミドを含む緩衝液中で、ハイブリダイズし、そして42の温度で、0.2xSSPE緩衝液を用いる洗浄に供する場合に結合を保持すること;最も好ましくは、60の温度で、20%SDS、10%BSA、1M NaPO<sub>4</sub>、.5M EDTAを含む緩衝液(pH8)中で、ハイブリダイズし、そして65で、2xSSC、1%SDSを用いる洗浄に供する場合に結合を保持すること)を必要とする。MURF1またはMAFBX cDNA ホモログはまた、アラインメントアルゴリズム(例えば、BLASTX(Altschulら、(1990) Basic Local Alignment Search Tool、J. Mol. Biol. 215:403~410))を用いて夫々区別され得る。

## 【0054】

本明細書中に開示される配列と遺伝子的または物理学的に同じ位置に存在する遺伝子配列

を同定および単離するための、開示される配列の使用もまた包含され、そしてそのような配列は、例えば、標準的配列決定および細菌性人工染色体(BAC)技術を通して得られ得る。ヒトまたは他の種における遺伝子ホモログをクローニングするための、開示される配列の使用もまた、包含される。そのようにするために、この開示される配列は、標識され得、そしてcDNAライブラリーまたはゲノムライブラリーをスクリーニングするために用いられ得る。必要とされるストリンジェンシーのレベルは、用いられるDNAの供給源に依存する。従って、低いストリンジェンシー条件は、特定の環境において適切であり得、そしてそのような技術は、当該分野において周知である(例えば、Sambrookら、1989、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Press, N.Y.を参照のこと)。さらに、MURF1ホモログ、MURF3ホモログ、またはMAFBXホモログは、本明細書中に開示される配列を用いて設計された2つの変性オリゴヌクレオチドプライマーのプールにより、PCRを用いて単離され得る。次いで、この同定されたフラグメントは、さらに、当該分野において公知の種々の技術(cDNAまたはゲノムライブラリーのスクリーニングを含む)を用いて全長のクローンを単離するために用いられ得る。さらに、PCRは、全長cDNA配列を直接的に同定するために用いられ得る(例えば、Sambrookら、前出を参照のこと)。これらの開示される配列はまた、変異体MURF1対立遺伝子、変異体MURF3対立遺伝子、または変異体MAFBX対立遺伝子を同定するために用いられ得る。変異体対立遺伝子は、高スループットの臨床的診断剤のための対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド(ASO)プローブを作製するために用いられる。MURF1対立遺伝子、MURF3対立遺伝子、およびMAFBX対立遺伝子は、当該分野において公知の多数の技術(1本鎖配座多型性(SSCP)変異検出技術、サザンブロッティング、および/またはPCR増幅技術が挙げられるが、これらに限定されない)によって同定され得る。

#### 【0055】

MURF1核酸、MURF3核酸、またはMAFBX核酸はまた、MURF1ポリペプチド、MURF3ポリペプチド、またはMAFBXポリペプチドの細胞性発現または細胞内の濃度もしくはアベイラビリティを調節するために用いられ得る。MURF1阻害性核酸、MURF3阻害性核酸、またはMAFBX阻害性核酸は、代表的に、開示されるMURF1コード配列、MURF3コード配列、またはMAFBXコード配列の相補体を含むアンチセンス1本鎖配列である。所定のMURF1ポリペプチド、MURF3ポリペプチド、またはMAFBXポリペプチドの発現のアンチセンス調節は、遺伝子調節配列に作動可能に連結されたアンチセンス核酸を用い得る。細胞は、プロモーター配列を伴いMURF1配列、MURF3配列、またはMAFBX配列を含むベクターを用いてトランスフェクトされ、このプロモーター配列は、この遺伝子の転写が、内因性MURF1コードmRNA、内因性MURF3コードmRNA、または内因性MAFBXコードmRNAに結合し得るアンチセンスの転写物を産生するように配置されている。このアンチセンス核酸の転写は、構成的でも誘導性でもよく、そしてこのベクターは、安定な染色体外維持または組込みを提供し得る。あるいは、所定のMURF1ポリペプチド、MURF3ポリペプチド、またはMAFBXポリペプチドをコードするゲノムDNAまたはmRNAに結合する1本鎖アンチセンス核酸は、標的化されたポリペプチドの発現の実質的な減少を生じる濃度で、標的細胞に投与され得る。MURF1、MURF3、またはMAFBXの発現または活性の増強は、対応する遺伝子産物の機能的発現を増大させるMURF1核酸、MURF3核酸、またはMAFBX核酸の、標的化された細胞型への導入によってもたらされる。そのような核酸は、MURF1発現ベクター、MURF3発現ベクター、もしくはMAFBX発現ベクター、内因性対立遺伝子の機能的発現をアップレギュレートするベクター、または変異体対立遺伝子の標的とされる修正のための置換ベクターであり得る。生存細胞に核酸を導入するための技術は、当該分野において公知であり、そしてレトロウイルスに基づくトランスフェクションまたはウイルスコートタンパク質-リポソーム媒介トランスフェクションが挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0056】

(タンパク質およびペプチド)

本発明は、MURF1、MURF3、またはMAFBXの遺伝子産物(例えば、MA-61のF-ボックスモチーフ、MURF1もしくはMURF3の環状ドメイン、Syncoilin遺伝子と共に結合されるMURF3分子の部分、そしてMA-61のFbx25ホモロジドメイン、またはそれらの誘導体、フラグメントもしくはドメイン、それらの変異、短縮または欠失形態、それらの融合タンパク質、のようなMURF1、MURF3、およびMA-61の機能性ドメインが挙げられる)に対応するポリペプチドまたはペプチドならびに上記のいずれかを組み込むかまたは産生する宿主細胞発現系を提供する。

## 【0057】

本発明の1つの実施形態は、本明細書中、図7、図9、図17、図11、図13、図19、および図22に示されるとおりのアミノ酸配列を含む単離されたMURF1ポリペプチド、MURF3ポリペプチド、もしくはMAFBXポリペプチド、またはそれらのフラグメントであり、これらは、MURF1、MURF3もしくはMA-61に特異的な活性または発現レベルを有する。

## 【0058】

開示されるMURF1ポリペプチド配列、MURF3ポリペプチド配列、またはMAFBXポリペプチド配列の配列は、MURF1核酸、MURF3核酸、またはMAFBX核酸から推定される。本発明の、MURF1ポリペプチド、MURF3ポリペプチド、またはMAFBXポリペプチドは、単離されていても、純粋でも、および/または非天然でもよい。「単離された」ポリペプチドとは、それがその天然の状態に関連しているいくつかの物質をもはや伴わないポリペプチドであり、所定のサンプルの全てのポリペプチドの、好ましくは少なくとも約0.5重量%、より好ましくは約5重量%を構成する。「純粋な」ポリペプチドは、所定のサンプル中の全てのポリペプチドの少なくとも約90重量%、好ましくは、少なくとも約99重量%を構成する。目的のポリペプチドは、合成されても、組換え技術により産生されても、細胞から精製されてもよい。「非天然」のポリペプチドは、もはや天然の産物であると考えられないかもしれない程度に操作されたポリペプチドである。非天然のポリペプチドの1つの例は、当該分野において公知の組換え技術を介して作製されたポリペプチドである。広範な種々の分子生化学的方法は、目的の組成物の生化学的合成、分子発現および精製により入手可能である(例えば、Molecular Cloning、A Laboratory Manual、Sambrookら、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、NY; Current Protocols in Molecular Biology (Ausubelら、編、Greene Publ. Assoc.、Wiley-Interscience、NY)を参照のこと)。

## 【0059】

本発明はまた、例えば、MA-61のF-ボックスモチーフ、MURF1もしくはMURF3の環状ドメイン、Syncoilin遺伝子と共に結合されるMURF3分子の部分、そしてMA-61のFbx25ホモロジドメイン、またはそれらの誘導体、フラグメントもしくはドメインのような、MURF1、MURF3、およびMA-61の機能性ドメインに対応するポリペプチドまたはペプチド、それらの変異形態、短縮形態または欠失形態、それらの融合タンパク質ならびにスクリーニングのために上記のいずれかを組み込むかまたは産生する宿主細胞発現系、あるいはこれらの分子、筋肉萎縮症ならびに関連する疾患および障害と相互作用するかまたは改変する薬剤の使用を提供する。分子のスクリーニングは、当該分野において公知の任意の数の方法によって達成され得、この方法としては、免疫沈降、サイズフラクション(size fractionization)、ウェスタンブロット、およびゲル電気泳動が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、スクリーニングの方法は、酵母ツーハイブリッドシステム、またはそれらの任意のバリエーションである。本発明は、低分子、高分子、化合物、組換えタンパク質、ペプチド、核酸および抗体をスクリーニングし得るインビトロおよびインビボでの

10

20

30

40

50

試験の両方を含む。

【0060】

MURF1、MURF3、またはMAFBXのポリペプチド、またはペプチドフラグメントの多数の適用が、これらの特性から提唱される。これらは、筋萎縮症、筋ジストロフィー、ユビキチン化、またはMURF1、MURF3、またはMAFBX自体の発現もしくは活性を調節する分子、薬剤、および薬物の同定および研究に有用であり得る。これらは、筋萎縮症、筋ジストロフィー、またはユビキチン化のマーカーとして、および筋萎縮症、筋ジストロフィー、またはユビキチン化の予防もしくは軽減のためのマーカーとして有用であり得る。これらはまた、抗体の作製のためにも用いられ得る。

【0061】

さらに、これらの開示されるポリペプチドおよび核酸は、筋萎縮、筋ジストロフィー、MURF1経路、MURF3経路、およびMAFBX経路、またはユビキチン化の阻害に有用であり得る。さらに、これらは、筋萎縮、筋ジストロフィー、増大されたユビキチン化に関連する状態の処置に有用であり得る。MURF1ポリペプチド、MURF3ポリペプチド、またはMAFBXポリペプチドは、増殖因子、サイトカインおよび/またはホルモンを用いて処置される状態に類似する状態の研究、処置または診断に有用であり得る。機能的に等価なMURF1遺伝子産物、MURF3遺伝子産物、およびMAFBX遺伝子産物は、欠失、付加、および/または置換を含み得る。そのような変化は、この遺伝子産物の機能的変化を全く生じなくてもよく、この遺伝子産物に変化を生じるようにこの遺伝子産物が、操作されてもよい。そのような遺伝子産物は、当該分野において公知の技術を介する組換え技術（例えば、インビトロ組換えDNA技術、合成技術、およびインビボ遺伝子組換え）によって産生され得る（例えば、Sambrookら、前出を参照のこと）。さらに、そのような遺伝子産物をコードするRNAは、当該分野において公知の技術を持ちいて化学合成され得る（例えば、「Oligonucleotide Synthesis」、1984 Gait、編、IRL Press、Oxfordを参照のこと）。

【0062】

（抗体）

本発明はまた、本明細書中に記載されるMURF1ポリペプチド、MURF3ポリペプチド、またはMAFBXポリペプチドに対する抗体も提供し、この抗体は、例えば、診断適用におけるこのポリペプチドの検出に有用である。MURF1ポリペプチド、MURF3ポリペプチド、またはMAFBXポリペプチドに対して指向されるモノクローナル抗体の調製のために、培養における連続的な細胞株による抗体分子の産生を提供する任意の技術が、用いられ得る。例えば、KohlerおよびMilsteinにより最初に開発されたハイブリドーマ技術（1975、Nature 256:495~497）、およびトリオマ（trioma）技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術）Kozborら、1983、Immunology Today 4:72）ならびにヒトモノクローナル抗体を産生するためのEBV-ハイブリドーマ技術（Coleら、1985、in「Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy」、Alan R. Liss、Inc. pp77~96）などは、本発明の範囲内にある。

【0063】

診断的用途または治療的用途のためのモノクローナル抗体は、ヒトモノクローナル抗体またはキメラヒト-マウス（もしくは他の種）モノクローナル抗体であり得る。ヒトモノクローナル抗体は、当該分野において公知の多数の技術のいずれか（例えば、Tengら、1983、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:7308-7312；Kozborら、1983、Immunology Today 4:72-79；Olssonら、1982、Meth. Enzymol. 92:3-16）によって作製され得る。ヒト定常領域と共にマウス抗原結合ドメインを含むキメラ抗体分子が、調製され得る（Morrissonら、1984、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851、Takedaら、1985、Nature 314:452）。

10

20

30

40

50

## 【0064】

当該分野において公知の種々の手順が、本明細書中に記載されるMURF1ポリペプチドに対するポリクローナル抗体、MURF3ポリペプチドに対するポリクローナル抗体またはMAFBXポリペプチドに対するポリクローナル抗体の生成のために使用され得る。抗体の生成のために、種々の宿主動物（ウサギ、マウスおよびラットが挙げられるが、これらに限定されない）が、MURF1ポリペプチド、MURF3ポリペプチドまたはMAFBXポリペプチド、あるいはこれらのフラグメントまたは誘導体を注射することによって免疫化され得る。種々のアジュバントが、宿主の種に依存する免疫応答を増大するために使用され得、アジュバントとしては、フロイント（完全および不完全）、鉍物ゲル（例えば、水酸化アルミニウム）、活面活性剤（例えば、リゾレチシン、プルロニック（pluronic）ポリオール、ポリアニオン、ポリペプチド、油乳濁物、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール）および潜在的に有用なヒトアジュバント（例えば、BCG（カルメット-ゲラン桿菌）およびCorynebacterium parvum）が挙げられるがこれらに限定されない。

10

## 【0065】

選択されたMURF1ポリペプチドエピトープ、MURF3ポリペプチドエピトープまたはMAFBXポリペプチドエピトープに対する抗体の分子クローンは、公知の技術によって調製され得る。組換えDNA方法論（例えば、Maniatisら、1982、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY）が、モノクローナル抗体分子またはその抗原結合領域をコードする核酸配列を構築するために使用され得る。

20

## 【0066】

本発明は、抗体分子およびこのような抗体分子のフラグメントを提供する。この分子のイディオタイプを含む抗体フラグメントは、公知の技術によって作製され得る。例えば、このようなフラグメントとしては、抗体分子のペプシン消化によって生成され得るF(ab')<sub>2</sub>フラグメント、F(ab')<sub>2</sub>フラグメントのジスルフィド架橋を還元することによって生成され得るFab'フラグメント、ならびにパパインおよび還元剤を用いて抗体分子を処理することによって生成され得るFabフラグメントが挙げられるがこれらに限定されない。抗体分子は、公知の技術によって精製され得、公知の技術としては、免疫吸着クロマトグラフィーもしくは免疫親和性クロマトグラフィー、クロマトグラフィー法（例えば、HPLC（高速液体クロマトグラフィー））、またはこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

30

## 【0067】

本発明はまた、単鎖Fvを提供する。単鎖Fv(scFv)は、軽鎖のV領域に合成ペプチドのストレッチによって連結された重鎖のV領域のみを有する、切断されたFabである。例えば、本明細書中で参考として援用されるCambridge Antibody Technologyに譲渡された米国特許第5,565,332号；同第5,733,743号；同第5,837,242号；同第5,858,657号、および同第5,871,907号を参照のこと。

40

## 【0068】

（アッセイ）

本発明のMURF1核酸、MURF3核酸およびMAFBX核酸、MURF1ポリペプチド、MURF3ポリペプチドおよびMAFBXポリペプチド、MURF1ポリペプチド、MURF3ポリペプチドならびにMAFBXポリペプチドに結合する抗体は、広い種々の使用を見出し、この使用としては、免疫原としての使用；スクリーニングアッセイにおける標的としての使用；および筋萎縮症またはユビキチン結合を調節、阻害、検出または測定するための生理活性剤としての使用が挙げられるが、これらに限定されない。前述で列挙される分子は、任意の都合よい方法によって特定の細胞集団に導入され得るか、発現され得るか、または抑制され得、任意の都合よい方法としては、マイクロインジェクション

50

、組換えタンパク質のプロモーター特異的発現または脂質ビヒクルを介する標的化送達が挙げられるが、これらに限定されない。

【0069】

この発明の1つの局面は、MURF1遺伝子、MURF3遺伝子およびMAFBX遺伝子およびMURF1遺伝子産物、MURF3遺伝子産物およびMAFBX遺伝子産物の、基質ならびにそのフラグメント、誘導体およびアナログをアッセイおよびスクリーニングするための方法を提供し、そしてMURF1遺伝子、MURF3遺伝子およびMAFBX遺伝子およびMURF1遺伝子産物、MURF3遺伝子産物およびMAFBX遺伝子産物と相互作用する因子を同定するための方法を提供する。本発明はまた、MURF1遺伝子、MURF3遺伝子およびMAFBX遺伝子およびMURF1遺伝子産物、MURF3遺伝子産物およびMAFBX遺伝子産物とそれらの基質および/またはユビキチンリガーゼ複合体サブユニットとの相互作用を調節または阻害する化合物を同定するためのスクリーニングアッセイを提供する。本発明のスクリーニングアッセイはまた、MURF1遺伝子、MURF3遺伝子およびMAFBX遺伝子、およびMURF1遺伝子産物、MURF3遺伝子産物およびMAFBX遺伝子産物の発現ならびに活性のモジュレーターを同定する高処理スクリーニングアッセイを含む。このようなアッセイは、MURF1遺伝子産物、MURF3遺伝子産物またはMAFBX遺伝子産物のアゴニストまたはアンタゴニストを同定し得る。

10

【0070】

本発明は、MURF1遺伝子、MURF3遺伝子およびMAFBX遺伝子およびMURF1遺伝子産物、MURF3遺伝子産物およびMAFBX遺伝子産物と結合するかまたは直接相互作用する、因子の同定のためのスクリーニング方法を提供する。このようなスクリーニング方法論は、当該分野において周知である（例えば、1996年、10月31日に公開されたPCT国際公開番号WO96/34099を参照のこと）。この因子は、内因性細胞成分および外因性細胞成分の両方を含む。これらのアッセイは、インビトロでか、または培養物におけるインタクトな細胞でか、または動物モデルにおいて実行され得る。

20

【0071】

好ましい実施形態において、酵母ツーハイブリッド系が、MURF1遺伝子、MURF3遺伝子、およびMAFBX遺伝子の基質、ならびにそのフラグメント、誘導体およびアナログを決定するため、ならびにMURF1遺伝子産物、MURF3遺伝子産物、およびMAFBX遺伝子産物と相互作用する因子を同定するために使用される（FieldsおよびSong, 1989, Nature 340: 245~246および米国特許第5,283,173号）。この系は、レポーター遺伝子の発現の検出に基づき、このレポーター遺伝子の転写は、それぞれ転写レギュレーターの半分に融合する2つのタンパク質の相互作用による転写レギュレーターの再構成に依存する。MURF1タンパク質、MURF3タンパク質、およびMAFBXタンパク質またはその誘導体および試験されるべきタンパク質は、DNA結合ドメインおよび転写調節ドメインとの融合タンパク質として発現される。

30

【0072】

本発明は、MURF1特異的結合因子、MURF3特異的結合因子またはMA-61特異的結合因子、このような因子を同定および作製する方法、ならびに診断、治療および医薬の開発におけるその使用を提供する。MURF1特異的結合因子、MURF3特異的結合因子、またはMA-61特異的結合因子としては、MURF1特異的抗体、MURF3特異的抗体、またはMA-61特異的抗体が挙げられ、そしてまたアッセイ（例えば、1-ハイブリッドスクリーニング、2-ハイブリッドスクリーニング、および3-ハイブリッドスクリーニング）で同定される他の結合因子、および以下に記載されるような化学ライブラリーのスクリーニングにおいて同定される非天然の結合因子が挙げられる（例えば、抗体の製造および使用の考察について、HarlowおよびLane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NYを

40

50

参照のこと)。特に目的の因子は、MURF1、MURF3またはMAFBXのmRNAまたはポリペプチドの機能、活性または発現を調節する。

【0073】

本発明は、MURF1、MURF3、またはMAFBXが調節可能な細胞機能またはMURF1、MURF3、またはMAFBXのmRNAまたはポリペプチド発現のレベルで活性な因子、化合物または因子のリード化合物を同定する効率的な方法を提供する。一般に、これらのスクリーニング方法は、MURF1ポリペプチド、MURF3ポリペプチドまたはMAFBXポリペプチドまたはMURF1核酸、MURF3核酸またはMAFBX核酸と天然のMURF1結合標的、MURF3結合標的、またはMAFBX結合標的との相互作用を調節する化合物についてアッセイする工程、あるいはMURF1、MURF3またはMAFBXのmRNAまたはポリペプチドの発現を調節する化合物についてアッセイする工程を包含する。発現を調節する結合因子または因子についての広範な種々のアッセイが提供され、このアッセイとしては、タンパク質-タンパク質結合アッセイ、イムノアッセイ、または細胞に基づくアッセイが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい方法は、リード化合物についての化学ライブラリーの自動化され、費用効率の良い高処理スクリーニングにされ易い。

10

【0074】

インビトロ結合アッセイは、別のペプチドまたはポリペプチド(例えば、検出またはアンカーのためのタグ)との融合産物の一部であり得る、MURF1ポリペプチド、MURF3ポリペプチド、またはMAFBXポリペプチドを含む成分の混合物を用いる。このアッセイ混合物は、天然のMURF1結合標的またはMAFBX結合標的を含む。天然の結合標的が使用され得る一方で、その一部が、アッセイにおいて都合よく測定可能な対象のMURF1、MURF3またはMAFBXに対する結合親和性および結合力を提供する限り、その一部を使用することが頻繁に好まれる。このアッセイ混合物はまた、候補の薬理的因子を含む。候補因子は、多数の化学的クラスを含むが、代表的にこれらは、有機的化合物であり、好ましくは小さい有機化合物であり、そして合成化合物ライブラリーまたは天然化合物ライブラリーを含む広範な種々の供給源から得られる。種々の他の試薬(例えば、塩、緩衝液、天然タンパク質(例えば、アルブミン)、洗剤、プロテアーゼインヒビター、ヌクレアーゼインヒビター、または抗菌剤)もまた、含まれ得る。この混合成分は、必須の結合を提供する、任意の順序で添加され得、そしてインキュベーションが、最適の結合を促進する任意の温度で実行され得る。この混合物は、候補の薬理的因子の存在下でなければ、MURF1ポリペプチド、MURF3ポリペプチド、またはMAFBXポリペプチドが、参照の結合親和性で結合標的、部分またはアナログと特異的に結合する条件下でインキュベートされる。インキュベーション期間は、最適の結合について選択されるが、しかしまた迅速な高処理スクリーニングを容易にするために最短化される。

20

30

【0075】

インキュベーション後、MURF1ポリペプチド、MURF3ポリペプチド、またはMAFBXポリペプチドと1つ以上の結合標的との間のその因子に基づく結合とは、任意の都合よい方法によって検出される。無細胞結合型アッセイについて、分離工程が、しばしば結合していない成分から結合成分を分離するために使用される。分離は、多数の方法によってもたらされ得、この方法としては、沈殿または固定化に続く、例えば、膜ろ過、またはゲルクロマトグラフィーによる洗浄が挙げられるが、これに限定されない。無細胞結合アッセイについて、成分の1つは、通常標識を含むか、または標識に結合される。この標識は、放射活性、蛍光、光学密度または電子密度のような直接的検出、あるいはエピトープタグまたは酵素のような間接的検出を提供し得る。種々の方法が、標識および他のアッセイ成分の性質に依存する標識の検出のために使用され得、この方法としては、光学密度または電子密度、放射活性放射、非放射活性エネルギー転移を介するか、または非制限的な例として抗体結合体を用いる間接的な検出が挙げられるが、これらに限定されない。因子の存在下での結合親和性と比較した因子の非存在下での標的に対するMURF1ポリペプチド、MURF3ポリペプチド、またはMAFBXポリペプチドの結合親和性における

40

50

差異は、この因子が、対応する結合標的に対するMURF1ポリペプチド、MURF3ポリペプチドまたはMAFBXポリペプチドの結合を調節することを示す。本明細書中で使用される場合、差異は、統計学的に有意であり、そして好ましくは、少なくとも50%の差異、より好ましくは少なくとも90%の差異を表す。

#### 【0076】

本発明はさらに、筋萎縮症と関連する疾患または障害の処置において有用な因子についてスクリーニングするための方法を提供し、それぞれ図7、9、17、11、13、19、および22のアミノ酸配列、またはそのフラグメントを発現する細胞とその基質とMURF1、MURF3、またはMAFBXを有する化合物とを接触させる工程、ならびにMURF1遺伝子産物、MURF3遺伝子産物またはMAFBX遺伝子産物のいずれかの活性における変化を検出する工程を包含する。活性におけるこのような変化は、1つ以上のタンパク質（例えば、それらの基質またはユビキチン経路の成分の1つ）とMURF1遺伝子産物、MURF3遺伝子産物、またはMAFBX遺伝子産物との相互作用における変化においてか、または基質のユビキチン結合または分解における変化によって明白になり得る。

#### 【0077】

MURF1、MURF3またはMA-61の比活性、機能または発現は、都合のよいインビトロアッセイ、細胞に基づくアッセイまたはインビボアッセイによって決定され得る。インビトロアッセイまたは細胞に基づくアッセイとしては、結合アッセイおよび細胞培養アッセイおよびユビキチン結合アッセイが挙げられるが、これらに限定されない。インビボアッセイとしては、免疫応答、遺伝子治療およびトランスジェニック動物および萎縮症に罹患した動物が挙げられるが、これらに限定されない。結合アッセイは、MURF1ポリペプチド、MURF3ポリペプチド、またはMAFBXポリペプチドと結合標的との特異的分子相互作用が評価されるか、または、MURF1、MURF3、またはMAFBXのmRNAまたはタンパク質発現レベルまたは活性が、評価されるか、または基質の結合もしくはユビキチン結合が評価される、任意のアッセイを含む。この結合標的は、例えば、リン酸化タンパク質、特異的免疫ポリペプチド（例えば、抗体）、またはMURF1核酸特異的結合因子、MURF3核酸特異的結合因子もしくはMA-61核酸特異的結合因子（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド）であり得る。MURF1核酸、MURF3核酸、およびMAFBX核酸およびMURF1ポリペプチド、MURF3ポリペプチド、およびMAFBXポリペプチドについての潜在的な結合標的としては、SCF E3ユビキチンリガーゼ複合体およびジストロフィンタンパク質複合体の他の公知のメンバーが挙げられる。例えば、他のF-box含有タンパク質が、Cullin-1と呼ばれるタンパク質、またはCullinファミリーのファミリーメンバー（例えば、Cullin-2、Cullin-3、Cullin-4a、Cullin-4b、またはCullin-5）に結合することが公知である（Lisztwan J, Marti A, Suterluty H, Gstaiger M, およびWirbelauer C, Krek W, 1998 EMBO 17(2): 368~83; Lyapina SA, Correll CC, Kipreos ET, Deshaies RJ., 1998 Proc Natl Acad Sci USA 95(13): 7451~6）。それ故、1つの潜在のアッセイは、試験化合物が、Cullinファミリーメンバーに対するMAFBXの結合を破壊し得るか否かを観察することである。また、SCF E3ユビキチンリガーゼ複合体の1部であるF-boxタンパク質は、Skp-1またはSkp-1ファミリーメンバーに結合することが公知である（Skowyraら, 1997, Cell 91: 209~219）。それ故、潜在のアッセイが、試験化合物が、Skp-1またはSkp-1ファミリーメンバーに対するMAFBXの結合を破壊し得る場合、決定され得る。さらに、SCF E3ユビキチンリガーゼ複合体の1部であるF-boxタンパク質は、リン酸化基質に結合し、これは次いでユビキチン結合される（Skowyraら, 1997, Cell 91: 209~219）。そのため、本発明の特徴的実施形態において、潜在的なアッセイが、試験化合物が、リン酸化基質に対するMAFBXタンパク質の

10

20

30

40

50

結合を破壊し得る場合、決定されるか、または試験化合物が、リン酸化基質のMA-61媒介ユビキチン結合を減少し得る場合、決定される。

【0078】

MURF3タンパク質が、ジストロフィン複合体のメンバーと結合するという知見は、MURF3タンパク質またはMURF3核酸の阻害が、その複合体を安定化し得、従って、筋ジストロフィー、およびジストロフィン複合体がユビキチン媒介性分解に供される他の状態の処置を助け得ることを示唆する。従って、本発明の別の実施形態は、MURF1、MURF3もしくはMA-61またはこの経路に関する他の分子、ならびにMURF1、MURF3もしくはMAFBX経路の阻害または筋ジストロフィーおよび神経筋接合部における欠損と関連する症状、状態および疾患の処置における特にそのインヒビターの使用

10

【0079】

MURF1 cDNA、MURF3 cDNA、またはMAFBX cDNA、あるいはMURF1ポリペプチド、MURF3ポリペプチドまたはMAFBXポリペプチドを認識する抗体は、診断の手段として（例えば、そのオリゴヌクレオチドプライマーに類似性を有する配列を増幅する試験におけるプライマーとしてのオリゴヌクレオチドの使用、およびMURF1、MURF3、またはMAFBXのmRNAが、正常および異常（例えば、萎縮症の状態）下で特定の組織またはサンプル中にどの程度存在するかを見出すPCR試験におけるプライマーとしてのオリゴヌクレオチドの使用を介して）か、または抗体を用いる免疫染色、もしくは抗体を用いるELISA試験によるMURF1、MURF3、またはMAFBXタンパク質の上方制御の測定を介して有用であり得る。MURF1、MURF3、またはMAFBXの単離は、これらの分子と相互作用するか、またはこれらの分子もしくはその経路の発現もしくは活性を変更する因子について、その特性を研究する手がかり、およびこの因子についてのアッセイを設計する手がかりを提供する。MURF1、MURF3またはMAFBXの単離はまた、MURF1、MURF3またはMAFBXの発現または活性が中断される状態についての処置を開発する手がかりを提供する。

20

【0080】

本発明はまた、患者サンプル中のMURF1遺伝子、MURF3遺伝子またはMAFBX遺伝子の発現を測定する工程を包含する、筋萎縮に関連する疾患または障害を診断する方法を提供する。例えば、本発明は、哺乳動物における筋萎縮を検出するための方法を包含し、本方法は、以下、a)造影剤に結合されたMURF1、MURF3またはMAFBX核酸またはポリペプチドを検出し得る分子を含む組成物を、哺乳動物に投与する工程；b)この組成物を筋内に蓄積させる工程；およびc)筋萎縮を画像化するために、蓄積された組成物を検出する工程、を包含する。さらに、MURF1、MURF3またはMAFBX核酸またはポリペプチドは、被験体から取得されたmRNAまたはタンパク質を使用して、および標準的方法論（例えば、PCRT、Northern分析、Western分析、ELISAまたは免疫染色）を使用して、検出され得る。

30

【0081】

検出における使用のためのMURF1、MURF3またはMAFBX核酸またはポリペプチドに結合され得る適切な造影剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：磁気共鳴画像法(MRI)で有用な薬剤（例えば、ガドリニウムキレート（例えば、Ladd, DLら、1999、Bioconjug Chem 10:361~370を参照のこと）、共有結合非イオン性、大環状、多量体ランタニドキレート（例えば、Ranganathan, RSら、1998、Invest Radiol 33:779~797を参照のこと）、およびモノクローナル抗体コート化マグネタイト粒子（To, SYら、1992、J Clin Laser Med Surg 10:159~169を参照のこと）。MRIの基本原則に関する総覧としては、Kirsch, JE、1991、Top Magn Reson Imaging 3:1~18およびWallis, FおよびGilbert, FJ、1999、J R Coll Surg Edinb 44:117~125を参照のこと。放射性ヌクレオチドもまた、核医学技術（例えば、陽

40

50

子射出断層撮影法 (PET)、単一陽子射出断層撮影法 (SPECT) およびコンピューター断層撮影 (CAT) スキャン) における使用に適した造影剤である。非限定的な例として、このような薬剤としては、テクネチウム 99m、クエン酸ガリウム 67、ヨウ素 123 およびインジウム 111 が挙げられる (Coleman, RE, 1991, Cancer 67: 1261~1270 を参照のこと)。造影剤として適切な他の放射性ヌクレオチドとしては、<sup>123</sup>I および <sup>111</sup>In-DTPA が挙げられる (Kaltsas, GAら、1998, Clin Endocrinol (Oxf) 49: 685~689 を参照のこと)、放射標識化抗体 (Goldenberg, DM および Nabi, HA、1999, Semin Nucl Med 29: 41~48、および Steffens, MGら、1999, J Nucl Med 40: 829~836 を参照のこと) が挙げられる。放射核医薬技術の基本原則に関する総覧としては、Schiepers, C. および Hoh, CK, 1998, Eur Radiol 8: 1481~1494、および Ferrand, SKら、1999, Surg Oncol Clin N Am 8: 185~204 を参照のこと。例えば、放射ヌクレオチドまたはキレートを含む任意の造影剤が、利用され得る。

#### 【0082】

開示された方法は、インビボまたはインビトロで適用可能であり得、そして、この細胞としては、例えば、培養筋細胞、筋芽細胞、C2C12細胞、分化筋芽細胞または筋管が挙げられ得る。

#### 【0083】

本発明はまた、動物における筋萎縮に関する疾患または障害を処置する方法を提供し、本方法は、この動物に、MURF1、MURF3 または MAFBX 遺伝子または遺伝子産物の合成、発現または活性を調節する化合物を投与し、その結果、このような疾患または障害の症状が緩和される工程を包含する。

#### 【0084】

(本明細書中で記載される本発明の使用のための他のアッセイおよび方法の詳細な説明として、PCT国際公開番号 WO00/12679号(2000年3月9日公開)(本明細書中にその全体が参考として援用される)もまた参照のこと)。

#### 【0085】

本発明はまた、MURF1、MURF3 および MA-61 の機能的ドメイン (例えば、MA-61 の F-ボックスモチーフ、MURF1 または MURF3 の環状ドメイン、Syncollin 遺伝子に同時結合する MURF3 分子、および MA-61 の Fbx25 相同ドメイン、またはその誘導体、フラグメントもしくはドメイン、その変異形態、短縮形態もしくは欠損形態、その融合タンパク質) に一致する MURF1、MURF3 または MAFBX ポリペプチドまたはペプチドを発現するように遺伝子操作された宿主細胞および動物、ならびに上述のいずれかを組み込むかまたは生成する宿主発現系、ならびにこれらを阻害するか、または「ロックアウト」発現するように遺伝子操作された宿主細胞および動物に関する。いずれかの種の動物 (マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ブタ、ヤギ、ヒツジ および 非ヒト霊長類が挙げられるが、これらに限定されない) は、トランスジェニック動物 および その子孫を生成するために使用され得、ここで、「トランスジェニック」は、別の供給源 (例えば、別の種) 由来の遺伝子配列を発現すること、ならびに内因性 MURF1 配列、MURF3 配列 または MAFBX 配列を過剰発現すること、または内因性遺伝子配列の非発現 (ロックアウト) を意味する。当該分野で公知の任意の技術を使用して、MURF1 導入遺伝子 または MAFBX 導入遺伝子を動物に導入し、トランスジェニック動物の創始株を生成し得、この技術は以下を含む: 前核注入 (Hoppe および Wagner, 1989, 米国特許第 4,873,191 号); 生殖細胞系へのレトロウイルス媒介遺伝子移入 (Van der Puttenら、1985, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82, 6148~6152); 胚幹細胞における遺伝子の標的化 (Thompsonら、1989, Cell 56, 313~321); エレクトロポレーションまたは胚 (Lo, 1983, Mol. Cell Biol. 3, 180

3 ~ 1814) ; および精子媒介遺伝子移入 ( Lavitranonら、1989、Cell 57、717 ~ 723 )。さらに、任意の技術は、MURF1導入遺伝子、MURF3導入遺伝子またはMAFBX導入遺伝子を含むトランスジェニック動物クローンを生成するために使用され得る (例えば、休止状態に誘導された培養化胚細胞、胎児細胞または成人細胞由来の核の除核された卵母細胞への核の移入) (Campbellら、1996、Nature 380、64 ~ 66 ; Wilmutら、Nature 385、810 ~ 813)。本発明は、全細胞、ならびにいくつかの細胞のみ (例えば、特定の細胞型) に導入遺伝子を有する動物を提供する。

#### 【0086】

本発明の核酸、ポリペプチド、ならびに本発明の作製方法および使用方法を記載する前に、本発明は、記載された特定の分子または方法のみに限定されないということは理解される。この分子および方法は変化し得、そして、本明細書中で使用される用語は、特定の実施形態を記載する目的である。この用語および定義は、保護の範囲は最終的に特許請求の範囲に依存するので、限定であることが意図されない。

#### 【0087】

(実施例)

(実施例1 : 萎縮についての動物モデル)

骨格筋は、全筋質量の損失、およびその結果としての個体の筋繊維の大きさの減少に関する萎縮、プロセスを起こすことによって、活性および負荷を減少させるように適応される。R. T. Jagoe, A. L. Goldberg, Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care 4、183 (2001)。筋萎縮は、脱神経、損傷関節固定、減量または寝たきり、グルココルチコイド処置、炎症性疾患 (例えば、セプシス、癌および老化) の結果として生じる (C. Rommelら、Nature Cell Biology 3、1009 (2001))。

#### 【0088】

筋萎縮を試験するために、げっ歯類 (マウスまたはラット) の足関節を、90°の屈曲で固定化した。この手順は、足関節 (例えば、ヒラメ筋、内部腓腹筋内側頭および側方腓腹筋内側頭、前脛骨筋) で作用する筋肉の萎縮を、様々な程度まで誘導する。再現性のある量の萎縮を、14日間にわたって後肢筋肉において測定し得る。

#### 【0089】

固定手順は、ギプス包帯することか (マウス) または足関節を固定すること (ラット) のいずれかに関し得る。げっ歯類に、ケタミン/キシラジンで麻酔をかけ、そして、右足関節を固定化する。ラットにおいては、足軸に沿って、かかと領域までわたって、0.5cm切開する。次いで、ネジ (1.2 x 8mm) を、石灰および尾部を介して、脛骨幹に挿入する。創傷は、皮膚膠に近い。マウスにおいて、関節の周りに軽量ギプス包帯物質 (VET-LITE) を用いて、足関節を90°に固定する。この物質を、水中に浸し、次いで、足の周りを包む。この物質は乾燥した場合、強固であるが、軽量である。

#### 【0090】

固定化の7日後および14日後に、動物に麻酔をかけ、そして、脛部脱臼によって屠殺する。前脛骨筋 (TA)、内側腓腹筋 (MG)、およびヒラメ筋 (Sol) を、右後肢 (固定化) および左後肢 (インタクト) から収集し、重量を測定し、そして、液体窒素冷却化イソペンタン中、固定長で凍結する。実験動物と同一の体重および年齢であるコントロール動物の一群をまた屠殺し、そして、筋肉を収集し、重量を測定し、そして凍結する。萎縮量を、固定化した足由来の筋肉の重量と、コントロール動物由来の筋肉の重量を比較することによって、評価する。萎縮のさらなる評価を、筋線維の大きさおよび筋肉緊張力を測定することで行なう。

#### 【0091】

ラットにおける脱神経、固定化 (関節固定による)、および非過重 (unweighting) 化 (後肢の懸吊化による) は全て、類似の内側腓腹筋質量の減少速度を生じ (図1A)、萎縮を誘導する共通の機構があるという見解と少なくとも一致する結果を生じる。

萎縮の普遍マーカーが存在するか否かを決定するために、本発明者らは、最初に、固定化および脱神経での遺伝子発現と、萎縮の間に変化するような、文献から選択された一組の筋肉特異的遺伝子を比較した。さらに、本発明者らは、これらの2つのモデルの間の遺伝子発現パターンが驚くほど類似している事を発見した(図1B、中央のパネルに対して左のパネルを比較する)。しかし、非過重モデル(後肢懸吊)を分析した場合、選択された遺伝子のいずれも、固定化および脱神経と類似の調節をされておらず、これは、これらの遺伝子が萎縮プロセスのための「普遍」マーカーでないことを示した(図1B)。萎縮の潜在的普遍マーカーを同定するために、本発明者らは、最初に、1つの特定のモデル(固定化)で調節される遺伝子の同定を試み、そして、これらの遺伝子がもしあれば、複数の他のモデルにおいても同様に調節されるか否かを決定した(図1C)。

10

## 【0092】

本発明者らは、3つの萎縮モデル(固定化、脱神経および後肢懸吊)に関するラットの筋肉由来のRNAを用いてノーザンプロットを実施した。ノーザンプロットは、muscle creatine kinase(MCK)、myoD、myogeninおよびMyf5の発現に対する萎縮の効果を示す。筋肉を、時間経過(示すような0日、1日、3日、7日、10日または14日のいずれか)とともに、ラットから取得した。各レーンについて、全RNAを、3つのラット内側腓腹筋(MG)からプールした(図24)。

## 【0093】

本発明者らはまた、MuRF1のイムノプロットを実施し、これは、MuRF1タンパク質が足関節固定誘導化萎縮(Imm)後にアップレギュレートされることを実証した。図25Aにおいて、レーン1は、COS細胞中で発現された組換えラットMuRF1のコントロール(登録番号AY059627号)である。溶解物をこれらの細胞から作製し、その結果、MuRF1の予想サイズを確立し得た。レーン2~7について、タンパク質溶解物を、非処置ラット(CON)、固定化後1日目のラット(Imm1)および3日目のラット(Imm3)から選ばれた3つの腓腹筋からプールした。イムノプロットを、全長ラットMuRF1に対して産生した抗体を使用して示す。GST、GST-MAFbxまたはGST-MAFbxDFb(MAFbxアミノ酸216~263のF-ボックス欠損)をコードする哺乳動物発現ベクターを、Cos7細胞へ一過的にトランスフェクトし、そして、1%のNP40、1mMのEDTA、1mMのPMSF、10mg/mlのアプロチニン、10mg/mlのロイペプチン、1mMのオルトバナジン酸ナトリウム、25mMのグリセロホスフェート、100nMのオカダ酸、20nMのミクロシスチンLRおよび5mMのN-エチルマレイミドを含む冷リン酸緩衝化生理食塩水中で、48時間後にこの細胞を溶解した。30μlのグルタチオン-アガロースビーズ(Amersham Pharmacia)を浄化溶解物(500mg)に添加し、そして、4で3時間回転した。ビーズを、溶解緩衝液を用いて遠心分離することで3回洗浄し、還元SDSサンプル緩衝液中で煮沸し、そして、抗Skp1(Transductino Labs)および抗Cullin1(Zymed)を用いるSDS-PAGE/イムノプロット分析に供した。筋肉溶解物(1mg)を免疫沈降し、そして、固定化GSTで予備吸収されたGST-MuRF1に対して産生された抗血清を用いてイムノプロットした。

20

30

## 【0094】

マウスmyoDに対するノーザンプローブはコード配列の571bp~938bp部位にわたり;マウスmyogeninに対するプローブはコード配列の423bp~861bpにわたり、マウスMyf5に対するプローブは、コード配列の406bp~745bpにわたる。コード配列の24bp~612bpにわたるラットMuRF1に対するノーザンプローブをPCRによって作成した。マウスMuRF2について、プローブを、5'PCRオリゴ:GAACACAGGAGGAGAAACTGGAAACATGTCおよび3'PCRオリゴ:CCCGAAATGGCAGTATTTCTGCAG(これは、マウスMuRF2の第5番目のエキソン部位にわたる)を使用して作製した。マウスMuRF3について、プローブは、867bp~1101bpにわたった。ラットMAFbxについて、プローブをPCRによって作製し、そして、コード配列の21bp~563bpにわた

40

50

った。ヒトMAFBxについて、プローブは、205bp~585bpにわたった。MAFBx+/+マウス、MAFBx+/-マウスおよびMAFBx-/-マウスのmRNAのノーザンを、660bp~840bpにわたるコード配列を用いてプローブした。ロードした全RNAの量について制御するために、アガロースゲルを臭化エチジウムで染色し、そして撮影し、リボソームRNAバンドを評価した。5'末端のMAFBx対立遺伝子の欠損を確認するサザンを、マウスMAFBxゲノムプローブを用いて実施し、これは、ATGの上流および示されるEcoRI部位の下流の1.1kb SacIIフラグメントにわたる。MURF1+/+マウス、MURF1+/-マウス、MURF1-/-マウス由来のmRNAのノーザンを、1bp~500bpのラットMURF1(登録AY059627)にわたるコード配列を用いてプローブした。5'末端のMURF1対立遺伝子の欠損を確認するサザンを、マウスMURF1ゲノムプローブを用いて実施し、これは、ATGの上流および示すEcoRI部位の下流の0.5kbのBglIIフラグメントにわたる。

#### 【0095】

(実施例2:ラットMURF1遺伝子、筋肉特異的環ドメイン遺伝子のクローニング)  
この実験を、骨格筋萎縮条件の間に、遺伝子が差示的に発現されることを決定する目的で、実施した。ディファレンシャルディスプレイ分析は、74の転写産物を生じ、これらの転写産物を、MA1-MA74(筋萎縮(Muscle Atrophy)について「MA」と標識した。元来の転写産物および続くRACEd cDNAに対するバイオインフォマティック分析によって、61の転写産物の決定が可能となった。転写解析を、Genetag<sup>TM</sup>法(L.Y.Wongら、Biotechniques 28,776(2000))を使用して実施した(図23)。

#### 【0096】

前出の実施例1において概説したように、ラットを、萎縮を誘導する(atrophy-inducing)モデルの対象とした。手術3日後、筋肉組織を、外科的に処置した動物から収集した。コントロールとして、筋肉組織をまた、未処置の動物から収集した。メッセジャーRNAを、萎縮した筋肉組織およびコントロールの筋肉組織から単離し、そしてディファレンシャルディスプレイアッセイの対象とした。3'のMURF1転写物の未翻訳部分を含有する遺伝子転写物の1つは、萎縮の間にアップレギュレーションされることを見出した。この3'フラグメントを、DNAプローブを作製するために使用し、このDNAプローブを、MURF1のコード配列を含有する全長遺伝子をクローン化するために使用した。rMURF1VRVスプライス形態(splice form)と命名されるより小さな代替的なスプライス形態もまた同定された。この代替的な形態は、3'末端で全長の形態と異なり、全長の形態は、より長い152アミノ酸を有する。この代替的なスプライス形態は、そのカルボキシ末端にアミノ酸配列「VRV」を有し、この「VRV」は、PDZ相互作用ドメインである(Torres R, Firestein BL, Dong H, Staudinger J, Olson EN, Huganir RL, Bredt DS, Gale NW, Yancopoulos GD(1998)Neuron:1453-63)。PDZ相互作用ドメインの存在は、このタンパク質がタンパク質-タンパク質相互作用に関与し得ることを予測させる。対照的に、全長の形態は、他のタンパク質相互作用ドメイン、例えば、アミノ酸配列「DEEEEFTEEEEDQE」を含有する酸性ドメインを有する。このドメインの存在は、この形態もまた他のタンパク質と相互作用し得ることを予測させる。全長rMURF1についてのヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列を、それぞれ以下の図6および図7に添える。rMURF1VRVスプライス形態についてのヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列を、それぞれ以下の図16および図17に添える。

#### 【0097】

(実施例3:ヒトMURF3遺伝子、筋肉特異的リング(ring)ドメイン遺伝子のクローニング)  
ラットMURF1コード配列を、標準的な分子生物学的技術によって、ヒトMURF3を

単離するために使用した。このコード配列は、既に、1999年12月10日に特許寄託記号 (Patent Deposit Designation) #PTA-1049、Stratagene T3/T7ベクターのヒトMA16 C8として、American Type Culture Collection (ATCC (登録商標)) に寄託されている。hMURF3についてのヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列を、それぞれ以下の図8A~8Cおよび図9に添える。ヒトMURF1を、標準的な技術によって、ラットMURF1にハイブリダイズさせるために使用した。

【0098】

(実施例4:ラットMA-61、筋肉特異的F-ボックス遺伝子のクローニング)  
この実験を、骨格筋萎縮の条件の間、どの遺伝子が差示的に発現されるかを決定するという目的で実施した。このような遺伝子を発見するために、前出の実施例1において概説したように、ラットを、萎縮を誘導するモデルの対象とした。手術3日後、筋肉組織を、外科的に処置した動物から収集した。コントロールとして、筋肉組織をまた、未処置の動物から収集した。メッセンジャーRNAを、萎縮した筋肉組織およびコントロールの筋肉組織から単離し、そしてディファレンシャルディスプレイアッセイの対象とした。3'のMAFBX転写物の未翻訳部分を含有する遺伝子転写物の1つは、萎縮の間にアップレギュレーションされることを見出した。この3'フラグメントを、DNAプローブを作製するために使用し、このDNAプローブを、標準的な分子生物学的技術によって、MA-61のコード配列を含有する全長遺伝子をクローン化するために使用した。rMAFBXについてのヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列を、それぞれ以下の図10および図11に添える。

【0099】

(実施例5:ヒトMAFBX遺伝子、筋肉特異的F-ボックス遺伝子のクローニング)  
ラットMAFBXコード配列を、標準的な分子生物学的技術によって、MAFBXD18のヒトホモログを単離するために使用した。この遺伝子の2つの代替的な形態を同定し、hMAFBXD18およびhMAFBXK8と命名した。この遺伝子のD18形態は、タンパク質をコードし、このタンパク質は、K8形態よりもカルボキシ末端で11個のアミノ酸だけより長い。この遺伝子が2つの形態を有することの有意性は未知である。しかし、代替的なスプライス形態が、タンパク質-タンパク質相互作用の調節に貢献することは頻繁な事例である。これらのコード配列は、既に、特許寄託記号#PTA-1048、Stratagene T3/T7ベクターのヒトMAFBXK8および特許寄託記号#PTA-1050、Stratagene T3/T7ベクターのヒトMAFBXD18として、American Type Culture Collection (ATCC (登録商標)) に寄託されている。hMAFBXK8についてのヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列を、それぞれ以下の図12および図13に添える。hMAFBXD18についてのヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列を、それぞれ以下の図18、および図19に添える。

【0100】

ラットおよびヒトのMAFbxタンパク質、およびヒトFbx25の配列を、整列させた (C. Cenciarelliら、Curr. Biol. 9, 1177 (1999))。  
公開された部分的なFbx25配列は、MAFbxのアミノ酸85に示されるロイシン (L) で始まる。F-ボックスの周囲の領域を、2連の核局在化シグナルと同じように示す (図26)。ラットおよびヒトのMAFbxの登録 (accession) 番号は、それぞれAY059628およびAY059629である。

【0101】

(実施例6: MURF1およびMAFBXが筋肉萎縮に対する普遍的なマーカーであることの証明)

ノザンプロット分析によって、MURF1およびMAFBXが、固定化に誘導される筋肉萎縮の間、両方ともにアップレギュレーションされることを確認した後、他のモデルの筋肉萎縮を試験した。筋肉は、筋肉への神経が分断される脱神経; 筋肉負荷を減少させるた

めに肢が物理的に吊られる後肢懸吊；糖質コルチコイド薬物デキサメタゾンを用いる処置を含む、種々のストレス下で萎縮を生じ得る。これらの萎縮性条件のそれぞれの対象とされた筋肉組織から得られたmRNAのノザン分析は、MURF1およびMAFBXが、試験した萎縮のモデルの全てにおいてアップレギュレーションされることを示した。従って、MURF1およびMAFBXの転写性のアップレギュレーションは、筋肉萎縮についての臨床的指標として貢献し得る。

#### 【0102】

本発明者らは、初めて、GeneTag<sup>TM</sup> ディファレンシャルディスプレイアプローチによって、3日間固定化したラット骨格筋（内側の腓腹筋）由来のmRNAをコントロールの筋肉由来のmRNAと比較した。本発明者らは、マーカーと同様に、萎縮過程の潜在的なトリガーとして機能し得る遺伝子を同定するために、より長い時点（例えば、14日）とは対照的に、比較的初期の時点（3日）での分析を選択した。発現が3倍またはそれよりも高く変化した遺伝子のみを、差示的に調節されるとして受容した。次いで、受容可能な転写物を、1～14日の期間、脱神経、固定化または無負荷（unweight）の対象にした筋肉から調製されたmRNAのパネルを使用するノザン分析によって「普遍性」についてアッセイした。経過観察として、糖質コルチコイドまたはIL-1を用いる全身性処置に続いて、萎縮した筋肉由来のmRNAをまた分析した。最終的に、肥大を生じている筋肉から調製されたmRNAのパネルを、これらの遺伝子が、萎縮の間に調節されるかを観察するために試験し、肥大の間に反対方向に調節した。

#### 【0103】

実施されるようなディファレンシャルディスプレイ技術の不都合の1つは、結果として得られたcDNAが、しばしば、3'未翻訳配列に制限され、そして75塩基対の平均長であることであった。従って、十分な配列を入手して遺伝子同定を行うために、引き続くPCRベースの3'および5'のRACE分析を実施することが頻繁に必要であった。ディファレンシャルディスプレイ分析は74個の転写物を生じ、この転写物をMA1～MA74（筋肉萎縮の「MA」）と標識した。初代の転写物および引き続くRACEでcDNAに関するパイオインフォマティクス分析は、61個の転写物での決定を可能にした（図23）。

#### 【0104】

遺伝子のいくつかの主要なクラスは、関節の固定化に誘導される筋肉萎縮に引き続いて調節された。「エネルギー利用経路」に関わる遺伝子は、ダウンレギュレーションされる遺伝子の最大のクラスを構成し、そして乳酸デヒドロゲナーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、およびフルクトース1,6ニリン酸を含む。これらの経路のダウンレギュレーションは、エネルギー経路が、持久力運動の場合に観察されているように転写的に調節され得ることを示す（K. Baar, E. Blough, B. Dineen, K. Esser, *Exercise Sport Sci Rev* 27, 333-379 (1999)）。最大のクラスのアプレギュレーションされた遺伝子は、26sプロテアソーム調節性サブユニットp31、ポリユビキチン、プロテアソームアクチベーターサブユニットpa28、および以下に議論される2つの新規なユビキチンリガーゼを含む、ユビキチン化（ubiquitylation）およびプロテアソーム経路に関する遺伝子であった。標的タンパク質へのユビキチンの添加およびプロテアソームによるそれらの引き続くタンパク質分解を介して、ATP依存性のタンパク質分解は、筋肉萎縮の間増加されることが既に示されているが（R. Medina, S. S. Wing, A. Haas, A. L. Goldberg, *Biomed Biochim Acta* 50, 347-356 (1991)；S. Temparisら、*Cancer Res* 54, 5568-73 (1994)；R. Medina, S. S. Wing, A. L. Goldberg, *Biochem J* 307, 631-637 (1995)）、ユビキチン化に関わる遺伝子のいずれかが、萎縮過程に対するマーカーを構成し得るか、またはこれらの遺伝子のいずれかが、萎縮を誘導するために、実際に要求されるかもしくはまさに十分であるのか、のどちらであるかは明らかでなかった。

10

20

30

40

50

## 【0105】

固定化の間混乱される遺伝子の大多数は、脱神経の間同様に調節される一方で、同様な萎縮の速度が1日と7日との間のこれらのモデルで見られるという事実にも関わらず(図1A)、これらの遺伝子のほとんどは、無負荷のモデルにおいて変更されなかった(データを示さず)。

## 【0106】

ラットの内側の腓腹筋の筋肉損失の時間経過を、3つのインビボのモデルで試験した: 脱神経、固定化および後肢懸吊。250~275 gmの体重のメスのSprague Dawleyラットを、全てのモデルにおいて用いた。脱神経の手順について: 右坐骨神経を、中央の大腿領域で切断し、下部肢筋肉の脱神経をもたらした。固定化の手順について: 右足関節を、踵骨および尾を介して、脛骨幹にねじ(1.2 x 8 mm)を挿入することによって90°の屈曲で固定化した。後肢懸吊の手順について: 後肢を、記載されるような尾-牽引の帯具を用いて、ラットをそれらの尾から吊るすことによって無負荷にした(D. B. Thomason, R. E. Herrick, D. Surdyka, K. M. Baldwin, J. Appl. Physiol. 63, 130 (1987))。示された日に、ラットを殺し、そして後肢筋肉を採取、計量および凍結した。重さの一致した未処置のラットをコントロールとして供した。データは、平均 ± s.e.m.、n = 10のラットである(図28A~28D)。

10

## 【0107】

ノザンプロットをまた、MuRF1転写物およびMAFbx転写物に萎縮の効果を示すように実施した。内側の腓腹筋を、3つの萎縮モデル(足関節固定、脱神経、および後肢懸吊)の時間経過(0日、1日、3日、および7日)を被っているラットから入手した(図28A~28D B)。

20

## 【0108】

これらの知見は、脱神経および固定化が、無負荷から転写的に容易に区別可能であることを示す。おそらくなぜなら、無負荷は、吊られた肢における比較的正常な神経活性および関節運動が存在することに特徴があるからである。しかし、本発明者らは、萎縮の3つのモデルの全てにおいてアップレギュレーションされる2つの遺伝子を同定した; 後にMuRF1として同定されるMA16(筋肉特異的なリングフィンガー(ring finger)タンパク質について)、およびMA61(筋肉萎縮F-ボックスタンパク質について、引き続きMAFbxと呼ばれる)(図2A)。

30

## 【0109】

MuRF1およびMAFbxの発現を、骨格筋萎縮の2つのさらなるモデルにおいて分析した: 悪液質のサイトカイン、インターロイキン-1(IL-1)を用いた処置(R. N. Cooney, S. R. Kimball, T. C. Vary, Shock 7, 1-16 (1997))および糖質コルチコイド、デキサメタゾンを用いた処置(A. L. Goldberg, J. Biol. Chem. 244, 3223-9 (1969))。最初の3つのモデルが、神経活性の変更および/または筋肉が種々の程度に被る外部負荷によって筋肉萎縮を誘導する一方で、これらのさらなるモデルは、これらのパラメーターに直接影響することなしに萎縮を誘導する。ノザンプロットを、MuRF1およびMAFbxの発現に対するデキサメタゾン(DEX)およびインターロイキン-1(IL-1)の効果を示すために実施した。内側の腓腹筋の筋肉を、未処置のラット(CON)、および9日間6 μg/mlの濃度で経口的に送達されるDEXで処置したラット、および3日間0.1 mg/kgの用量で毎日皮下に送達されるIL-1で処置したラットから入手した。図28A~28D(c)。両方の悪液質の薬剤は、MuRF1およびMAFbxのアップレギュレーションを引き起こし、デキサメタゾンは、MuRF1およびMAFbxの発現において10倍よりも大きい増加をもたらした(図2B)。

40

## 【0110】

発現が、萎縮の間アップレギュレーションされ、そして肥大の間ダウンレギュレーションされる遺伝子の同定は、この遺伝子が、萎縮の表現型についてのマーカーであるという主

50

張を非常に強固にし、そして目的の遺伝子が、萎縮過程の直接的なメディエーター (mediator) として機能し得るという相関性の証拠を提供する。従って、本発明者らは、骨格筋肥大の2つのモデルにおける MuRF1 および MAFbx の発現を試験した: 14 日間の無負荷期間に続く後肢の再負荷 (D. B. Thomason, R. E. Herrick, D. Surdyka, K. M. Baldwin, *J Appl Physiol* 63, 130-7 (1987))、ならびに腓腹筋およびヒラメ筋の筋肉を除去し、これらの協力筋の損失を補償するために足底筋を残す代償的な肥大 (G. R. Adams, F. Haddad, *J Appl Physiol* 81, 2509-16 (1996); R. R. Royら、*J Appl Physiol* 83, 280-90 (1997))。これらのモデルの両方において、MuRF1 および MAFbx の発現は、減少し、これらの遺伝子が、萎縮とポジティブに相関があるだけでなく、肥大ともネガティブに相関があることを示す (図 2C)。さらに、ラットの「組織ブロット (tissue blot)」およびヒトの「組織ブロット」の両方に対するノザンブロットは、心筋および骨格筋の両方において (図 2D)、筋肉特異的であるとして、MuRF1 および MAFbx を同定し、これらの組織においてそれらが果たす特定の役割と一致する。

#### 【0111】

ラットおよびヒトの組織 (Clontech) から入手した総 RNA を、示される遺伝子についてのプローブとハイブリダイズさせた (図 28A ~ 28D)。

#### 【0112】

(実施例 7: MuRF1 が、ユビキチンリガーゼ複合体中で機能し得ることの立証) 最近、リングドメインを含む遺伝子が、「単量体ユビキチンリガーゼ」として機能し得ることが示された。特定の条件下で、これらのタンパク質は、同時に基質およびユビキチンリガーゼに結合し、基質のユビキチン化およびプロテアソーム媒介性分解を引き起こす。このプロセスにおいて、リングドメインタンパク質そのものは、ユビキチン化される。ラット MuRF1 遺伝子をコードするベクターを、ユビキチンの HA エピトープタグ化形態をコードするベクターと一緒に、COS 細胞にトランスフェクトした。タンパク質溶解物を COS 細胞から回収した。MuRF1 を、MuRF1 ペプチドに対して惹起された抗体を使用して、溶解物から免疫沈降した。免疫沈降されたタンパク質を、HA タグに対する抗体を使用して、ウエスタンブロット分析にかけた。MuRF1 が、高度にユビキチン化されることが見られた。さらに、コントロールとして、遺伝子のリングドメイン部分を除去した MuRF1 の変異型形態をコードするベクターを、タグ化ユビキチンを用いて COS に同時トランスフェクトした。この場合、ユビキチン化は見られなかった。これらの結果は、MuRF1 が、ユビキチン複合体の一部として機能し、リングドメインが、他のリングドメインタンパク質で見られるように、ユビキチン化に必要であるという仮説と一致する。図 14 は、hMuRF1 と、他のリングフィンガータンパク質との比較である。

#### 【0113】

MuRF1 は、大きな (300 kD) サルコメアのタンパク質タイチンの 30 kD ドメインをコードする構築物を使用した、酵母のツーハイブリッド実験において、相互作用によって、以前にクローン化された (T. Centnerら、*J Mol Biol* 306, 717-726 (2001))。MuRF1 中の「リングフィンガードメイン (K. L. Borden, P. S. Freemont, *Curr Opin Struct Biol* 6, 396-401 (1996); P. S. Freemont, *Ann N Y Acad Sci* 684, 74-192 (1993))」の存在が、以前に注目されたのに対して、MuRF1 が、ユビキチンリガーゼとして機能し得るかどうかを見るための、さらなる分析はなされなかった。本発明者らは、MuRF1 が、リングドメイン含有単量体ユビキチンリガーゼの全ての正準の構造的特徴を含むことに注目し (P. S. Freemont, *Curr Biol* 10, R84-87 (2000); C. A. Joaero, A. M. Wiesman, *Cell* 102, 549-552 (2000))、さらに分解に対して筋肉タンパク質を標的化し得るユビキチンリガーゼが、筋肉萎縮を媒介する強力な候補であることを理由付けた。

## 【0114】

MuRF1タンパク質およびその潜在的なユビキチンリガーゼ活性の特徴づけを開始するために、本発明者らは、まず、mRNAの発現レベルに加えて、MuRF1タンパク質レベルが、MuRF1を認識する抗体で固定に供された動物から得られる筋肉溶解物を免疫ブロッティングすることによって、萎縮の間増加することを示した(図3A)。次に、組換えMuRF1タンパク質が産出され、基質として放射標識されたユビキチンを使用した、インビトロのアッセイにおいて、ユビキチンリガーゼ活性について試験した。MuRF1は、潜在的なユビキチンリガーゼであることが示され(図3B)、そこでは、タンパク質1 $\mu$ gあたりの、放射標識化ユビキチン自己結合体の量によって決定されるように、MuRF1の非存在下では、ユビキチンリガーゼ活性は検出されず(図3B)、このアッセイで試験された他のリングフィンガーユビキチンリガーゼは、MuRF1ほど強力ではない。

10

## 【0115】

MuRF1タンパク質は、ユビキチンリガーゼ活性を有する。精製されたグルタチオンセファロース結合MuRF1タンパク質(GST-MuRF1)を、記載されるように、ユビキチンリガーゼ反応物に加えた。A. Chenら、J. Biol. Chem. 275, 15432(2000)。簡潔には、組換えGST-MuRF1(100ng)を、ATP、E1、および組換えUbc5cの存在下で、<sup>32</sup>P-ユビキチン(3mg)と共にインキュベーションした(図29A~29D(D)、レーン5)。レーン1~4において、指示された成分を、省いた。反応物のアリコートは、12.5%SDS-PAGEによって分析し、<sup>32</sup>P-標識化高分子量ユビキチン結合体を検出した。「ユビキチンポリマー」は、ユビキチン化されたUbc5cおよびMuRF1を含み得る。図29A~29DD。

20

## 【0116】

(実施例8:MAFBXが、「SCF」ユビキチンリガーゼ複合体において機能し得ることの実証)

最近、F-ボックスドメインを含む遺伝子が、「SCF」複合体と呼ばれるユビキチンリガーゼ複合体の一部として機能し得ることが示され、ここで、Sは遺伝子産物SKP1を表し、Cはクリン(Cullin)と呼ばれる遺伝子産物を表し、そして、「F」はFボックスタンパク質を表す。MAFBXが、SCF複合体の一部であるかどうかを決定するために、共免疫沈降アッセイをすることによって、MAFBXが、SKP1またはクリンのいずれに結合するかを決定するために研究した。GST(GST/CON)、GST-MAFBx、またはGST-MAFBxDfb(MAFbxのFボックス欠失体、アミノ酸216~263)をコードするベクターを、Cos7細胞に一時的にトランスフェクトした。クリン1およびSKP1の両方を、グルタチオンアガロースビーズを使用して、GST-MAFBxでトランスフェクトされた細胞の溶解物から同時精製し得た(図29A~29D(A)、レーン3を参照のこと)。Fボックスの検出は、共沈殿されるクリン1およびSkp1の量を、著しく減少した(図29A~29D(A)、レーン4を参照のこと)。

30

## 【0117】

MAFBxの過剰発現は、萎縮を引き起こす。C2C12筋管は、感染されない(CON)か、またはEGFPを発現するアデノウイルスもしくはMycエピトープタグ化ラットMAFBx遺伝子およびEGFP(MAFbx-EGFP)の両方を発現するアデノウイルスのいずれかで、感染されるかのいずれかである。分化後4日で、蛍光筋管を撮影し、筋管の直径を測定した(右)。アデノウイルスを、記載されるように作製した(T. Heら、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 95, 2509(1998))。較正=50mm。図29A~29D(B)。

40

## 【0118】

EGFPウイルスおよびMAFBx-EGFPウイルスが、EGFP遺伝子を含むために、抗EGFP免疫ブロット(I.B.)は、感染レベルの相対的な決定を可能にする。溶

50

解物の免疫プロット ( I . B . ) は、 M A F b x ウイルスで感染された筋管における、 M y c エピトープタグ化 M A F b x タンパク質の存在を確認した。図 2 9 A ~ 2 9 D C。

【 0 1 1 9 】

これらの結果は、 M A F B X が、 S C F ユビキチンリガーゼ複合体の一部として機能し、この複合体の他のメンバーで見られるように、 F ボックスドメインが、結合に必要であるという仮説と一致する。

【 0 1 2 0 】

( 実施例 9 : M U R F 3 の基質が、シンコイリン ( S y n c o i l i n ) 遺伝子である実証 )

M U R F 3 に対する潜在的な基質を決定するために、「酵母ツーハイブリッド」実験を行った。これは、目的のタンパク質と同時結合するタンパク質を検出する標準的な方法である。この実験において、目的の遺伝子をコードするベクターが、同時トランスフェクトされ、そして酵母 L e x A ドメインに融合され、 c D N A をコードするライブラリーは、 G A L 4 ドメインに融合される。ライブラリー中の c D N A が、試験遺伝子と結合する場合、 L e x A ドメインおよび G A L 4 ドメインは、一緒になり、決定的な酵母タンパク質の産出を生じ、酵母が、特定の培地中で生育可能になる。この方法を使用して、本発明者らは、 M U R F 3 に対する基質が、シンコイリンという最近クローン化された遺伝子であることを決定した。

【 0 1 2 1 】

( 実施例 10 : 萎縮をブロックし、 M U R F 1 および M A - 6 1 のアップレギュレーションをブロックする、クレンブテロール ( C l e n b u t e r o l ) 処理 )

M U R F 1 および M A F B X が、筋痙攣プロセスに対するマーカーおよび痙攣をブロックする強力な標的となり得るかどうかをさらに確立するために、クレンブテロールと呼ばれる薬物を、筋痙攣を阻害するために使用し、この阻害が M U R F 1 および M A - 6 1 のアップレギュレーションの減少に関連するかどうかを見た。クレンブテロール、 アドレナリン作用性アゴニストは、筋痙攣のインヒビターとして確立されている ( 例えば、 S n e d d o n A A , D e l d a y M I , M a l t i n C A , ( 2 0 0 0 ) を参照のこと )。クレンブテロールによる脱神経誘導性の痙攣の改善は、増加した P K C - 活性に関連する ( A m J P h y s i o l E n d o c r i n o l M e t a b 2 0 0 0 J u l ; 2 7 9 ( 1 ) : E 1 8 8 - 9 5 )。

【 0 1 2 2 】

ラット四肢の筋肉を、上述の実施例 1 で記載されるように、固定した。ラットを固定すると同時に、これらを、クレンブテロールで処理した ( 3 m g / k g , s . c . )。コントロールの固定された動物は、処理されないままにした。コントロール動物の筋肉組織およびクレンブテロール処理動物の筋肉組織由来のメッセンジャー R N A を、標準的な方法 ( M U R F 1 プローブおよび M A F B X プローブを使用するノーザンハイブリダイゼーション ) によって、 M U R F 1 発現および M A F B X 発現について試験した。痙攣を有意にブロックする、クレンブテロールでの処理によって、 M U R F 1 および M A - 6 1 のアップレギュレーションもまたブロックされたことが見出された。

【 0 1 2 3 】

( 実施例 1 1 : M u R F 2 および M u R F 3 の分析 )

M u R F 1 に密接に関連する 2 つの遺伝子が、クローン化され、 M u R F 2 および M u R F 3 と名づけられた ( T . C e n t n e r ら、 J M o l B i o l 3 0 6 , 7 1 7 - 7 2 6 ( 2 0 0 1 ) , J . A . S p e n c e r , S . E l i a z e r , R . L . I l a r i a , J . A . R i c h a r d s o n , E . N . O l s e n , J . C e l l B i o l . 1 5 0 , 7 7 1 - 7 8 4 ( 2 0 0 0 ) )。ノーザン分析は、 M u R F 2 発現および M u R F 3 発現が、筋肉特異的で、 M u R F 1 に高度に相同であるにも関わらず、骨格筋痙攣の間、一貫してアップレギュレーションされるわけではないことを示した ( 図 4 C ) ( T . C e n t n e r ら、 J M o l B i o l 3 0 6 , 7 1 7 - 7 2 6 ( 2 0 0 1 ) )。筋肉を、 3 つの痙攣モデル：固定、脱神経、および後肢浮遊の時間経過 ( 0 日、 1 日、 3 日

、および7日)を経験するラットから得た。各々のレーンにおいて、全RNAを、3つのラット内側腓腹筋(MG)からプールした。ノーザンハイブリダイゼーションを、示された遺伝子に対するプローブを用いて実行した。マウスmyoDに対するノーザンプローブは、コード配列の塩基対571~938にまたがり、マウスmyogeninは、コード配列の塩基対423~861にまたがり、マウスMyf5は、コード配列の406~745にまたがった。ラットMurF1に対するノーザンプローブを、PCRによって作製し、コード配列の塩基対24~612にまたがった。マウスMurF2に対して、プローブを、5'PCRオリゴ:

【0124】

【化1】

GAACACAGGAGGAGAACTGGAACATGTC

および3'PCRオリゴ:

【0125】

【化2】

CCCGAAATGGCAGTATTTCTGCAG

を使用して作製し、マウスMurF2の5番目のエクソンにまたがった。マウスMurF3に対して、プローブは、コード配列の塩基対867~1101にまたがった。負荷された全RNA量を制御するために、アガロースゲルを、エチジウムブロマイドで染色し、撮影し、リボソームRNAのバンドを評価した。MurF2またはMurF3が、ユビキチンリガーゼとして機能するかどうかは、未知である。

【0126】

(実施例12:ユビキチン化は、筋痙攣の間増加する)

上記に示されるように、MurF1は、ユビキチンリガーゼのリングドメインの一部であり、MAFBXは、「SCF」ユビキチンリガーゼ複合体の一部である。ユビキチン化は、筋痙攣のプロセスに関与することを示すために、ウエスタンブロットを、コントロールの筋組織から、および脱神経または固定誘導痙攣を受ける筋組織から得られるタンパク質を用いて実行した。両痙攣条件下で、ユビキチン化のレベルが痙攣の間増加することが示された。この点はまた、文献中で確立されている(例えば、Solomon V, Baracos V, Sarraf P, Goldberg AL. (1998)を参照のこと)。ユビキチン結合の速度は、主にN末端規則経路の活性化を通して、痙攣と共に増加する。Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Oct 13; 95(21): 12602-7。

【0127】

(実施例13:MAFBXは、MAFBXとSkip1との間の酵母ツーハイブリッド結合によって示されるように、SCF E3ユビキチンリガーゼファミリーのメンバーである)

本発明者らは、この遺伝子について、全長のラットcDNAおよびヒトcDNAをクローニングした。ラットMAFbx cDNA配列およびヒトMAFbx cDNA配列のオープンリーディングフレームによって、90%同一であるタンパク質が予想される(図4A)。このタンパク質の配列は、「Fボックス」ドメインの存在が顕著であり、Fボックスドメインが、「SCFユビキチンリガーゼ複合体」と呼ばれる、特定のE3ユビキチンリガーゼのメンバーであるタンパク質において同定されているので、このFボックスドメインの存在は、興味深い(D. Skowrya, K. L. Craig, M. Tyers, S. J. Elledge, J. W. Harper, Cell 91, 209-19 (1997); J. Lisztwanら、EMBO J 17, 368-83 (1998)。従って、SCF複合体は、それが、以下のタンパク質: Skip1 (Skip1)、クリン1 (Cul1)および多くの「Fボックス」含有タンパク質(Fbp)の1つの間の安定な相互作用に関与するために、名づけられる。38より多くの異なるFbpが、ヒトで同定さ

10

20

30

40

50

れた (J. T. Winston, D. M. Koepf, C. Zhu, S. J. Elledge, J. W. Harper, *Curr Biol* 9, 1180-2 (1999); C. Cenciarelliら、*Curr Biol* 9, 1177-9 (1999))。MAFbxに最も近接な遺伝子は、Fbx25であり、それは、Fボックス含有タンパク質についての大きな検索で、以前にクローン化された遺伝子である(19)。興味深いことに、MAFbx発現が、骨格筋および心臓に限定されるのに対して、Fbx25は、ほとんどの他の組織において発現されるが、骨格筋では発現されない(データは示さず)。本発明者らは、MAFbxが、実際、2つの様式で、SCF型E3ユビキチンリガーゼであることを示した。第1に、「ペイト」として、全長MAFbxを使用する酵母ツーハイブリッドクローニングによって、Skp1の94の独立したクローンを得、全94クローン以外は、相互作用実験から得られた(データは示さず)。第2に、MAFbxでトランスフェクトされた哺乳動物細胞からのMAFbxの免疫沈殿から、Skp1およびCul1の両方の共沈殿を得た(図4B)。この共沈殿は、MAFbx中のFボックスドメインの存在に依存した(図4B、レーン3および4を比較のこと)。Fボックスモチーフは、FbpとSkp1の間の相互作用に必要であることが示された(E. T. Kipreos, M. Pagano, *Genome Biol.* 1(2000))。

10

## 【0128】

(実施例14: MURF1は、ユビキチンリガーゼとして機能する)

MURF1が、ユビキチンリガーゼとして機能するかどうかを決定するために、組換えMURF1タンパク質を、標準的な技術を使用して、E. Coli細菌中で生成した。この組換えタンパク質を、精製し、Chenら、2000, *J Biol Chem*, 275, pg 15432-15439に記載されるように、インビトロのユビキチンリガーゼアッセイで使用した。MURF1は、高度に活性で、この活性は、E2として、E1およびUBC5cの両方に依存することが見出された(E1成分およびE2成分は、リングドメインタンパク質媒介性ユビキチンライゲーションにとって必要である)。ネガティブコントロールタンパク質は、作用しなかった。ポジティブコントロールとしての、他のリングドメイン含有タンパク質もまた、このアッセイで機能したが、ユビキチン結合によって測定した場合、より低い効率であった。MURF1がどのようにしてユビキチンリガーゼとして機能したかの図示に関しては、図15を参照のこと。

20

## 【0129】

(実施例16: ノックアウト動物)

(MAFBXノックアウト動物は、筋痙攣の減少を示す)

MAFbxの機能をさらに解明するために、本発明者らは、マウス中でMAFbxヌル対立遺伝子を遺伝子操作した。ここで、ATGからFボックス領域をコードするエクソンにわたるゲノムDNAが、LacZ/ネオマイシンカセットによって置換され(図5A)、同時にMAFbx機能の破壊、およびMAFbxの発現パターンを決定するための、*-gal*染色を可能にした。MAFbx座の分析は、MAFbx<sup>+/+</sup>動物およびMAFbx<sup>-/-</sup>動物での期待される摂動を示した(図5B)。さらに、MAFbx<sup>-/-</sup>動物は、MAFbx mRNAについてヌルであった(図5C)。MAFbx<sup>-/-</sup>マウスは、生存可能で、受胎能力があり、そして正常に見える。MAFbx欠損マウスは、野生型の同産児に関する正常な成長曲線を有し、そして骨格筋および心臓は、通常の重さおよび形態を有した(データは示さず)。

30

40

## 【0130】

明らかな表現型の非存在を考慮して、本発明者らは、骨格筋の損失を引き起こすことにおけるMAFbxの役割を(もしあれば)決定するために、萎縮モデルにおいてマウスを検証することに決めた。筋萎縮は、坐骨神経を切断することにより誘導され、これは前脛骨筋および腓腹筋の脱神経および不使用を生じた。脱神経は、MAFbx<sup>+/+</sup>マウスの前脛骨筋における*-gal*染色(図6A)により実証されるように、全ての筋線維におけるMAFbx遺伝子座の上方調節を生じた。有意な筋萎縮は、脱神経後の7日目および14日目に、野生型のMAFbx<sup>+/+</sup>マウスの前脛骨筋および腓腹筋で生じた(図6B)

50

。M A F b x 欠乏性 ( M A F b x - / - ) マウスは、7日目および14日目の両方でのM A F b x + / + マウスより顕著に少ない萎縮を有した ( 図 6 B ) 。実際に、M A F b x - / - マウスは、7日目と14日目の間の更なる筋損失がないことを示したのに対して、M A F b x + / + は、質量を失い続けた。14日目の筋質量の保持はまた、平均の線維サイズおよび線維サイズの可変性の保持に反映され ; M A F b x - / - マウスは、M A F b x + / + マウスより顕著に大きな線維を有し、そして非脱神経されていない肢でみられるのと同じ線維サイズの可変性を維持した ( 図 6 C ) 。これらのデータは、M A F b x が、筋萎縮の必要とされる調節因子であり、筋タンパク質の分解における重要な役割を果たし得る強い証拠を提供する。

#### 【 0 1 3 1 】

10

( M u R F - 1 ノックアウト動物は、筋萎縮における減少を示す )

M u R F 1 の機能をさらに解明するために、本発明者らは、マウスにおいて、M u R F 1 ヌル対立遺伝子を遺伝学的に操作し、このマウスにおいて、F - b o x 領域をコードするエキソンを通りA T GにまたがるゲノムD N Aを、L a c Z / ネオマイシンカセットと取り替え、これは、( 図 5 A ) M u R F 1 発現パターンを決定するために、本発明者らがM u R F 1 の機能を乱し、そして同時にb - ガラクトシダーゼ ( b - g a l ) 染色を実施することを可能にする。M u R F 1 座の分析は、M u R F 1 + / - および - / - 動物における予想された混乱を実証した ( 図 5 B ) 。さらに、M u R F 1 - / - 動物は、M u R F 1 のm R N A に対するヌルであった ( 図 5 C ) 。M u R F 1 - / - マウスは、生存可能で、稔性であり、そして正常に思われた。M u R F 1 欠乏性のマウスは、野生型の同腹仔の片方に比例して正常な増殖曲線を有し、骨格筋および心臓は、正常な重さおよび正常な形態学を有した ( データは示されていない ) 。

20

#### 【 0 1 3 2 】

この研究において、本発明者らは、筋特異的であり、そして種々の攪乱により誘導された筋萎縮の間に上方調節される2つの遺伝子を同定した。M u R F 1 とM A F b x の両方は、E 3 ユビキチンリガーゼの異なる型をコードする。骨格筋萎縮の多数のモデルに対するマーカーとして2つのユビキチンリガーゼの発見は、高い不同性の攪乱 ( 脱神経からグルココルチコイド処置までの範囲である ) が、共通の萎縮誘導経路を活性化することを示唆する。さらに、A T P 依存プロテアソームによるタンパク分解のための別個の基質を標的化する、ユビキチンリガーゼの特定の機能は、特定のタンパク質の分解経路が、萎縮の間に上方調節されそしてM A F b x およびM u R F 1 により媒介されることを示唆する。

30

#### 【 0 1 3 3 】

M u R F 1 は、リングフィンガードメインを含み、そしてインビトロにおいてユビキチンリガーゼとして機能することが示され、その結果、これは、単量体のリング - フィンガーリガーゼとして骨格筋において機能し得ることを示唆した。本研究は、基質を同定しなかったが、これまでの研究は、M u R F 1 がサルコメリック ( s a r c o m e r i c ) タンパク質タイチンに結合すると確認し、これはM u R F 1 が、筋節複合体の重要なオーガナイザーである、タイチンに対するユビキチンリガーゼとして機能し得る可能性を生じる ( T . C e n t n e r ら、J M o l B i o l 3 0 6、7 1 7 ~ 7 2 6 ( 2 0 0 1 ) ) 。

40

#### 【 0 1 3 4 】

M A F b x は、F - b o x を含むS C F ファミリーのメンバーである。基質は、これらの研究においてM A F b x について決定されていない ; しかし、インビトロにおける骨格筋管におけるM A F b x の発現は、これらの細胞において萎縮を誘導するのに十分であった。さらに、M A F b x 欠乏性マウスは、脱神経モデルにおける野生型マウスより顕著に少ない萎縮を示した。この発見は、M A F b x が、重大な筋タンパク質の分解の調節を介する可能性が最もありそうな、筋萎縮プロセスの決定的な調節因子であることを実証する。さらなる萎縮および肥大モデルにおけるこれらのM A F b x 欠乏性のマウスの分析は、筋萎縮およびタンパク質の代謝回転におけるM A F b x の役割をさらに解明する。

#### 【 0 1 3 5 】

50

今後の研究は、M A F b x および M u R F 1 の基質の同定そして M A F b x または M U R F 1 のいずれか、M u R F の関連物、ならびに種々の組み合わせを欠如するマウスのさらなる試験に焦点をあてる。M u R F 1 欠乏性のマウスの予備的な分析は、それらが生存可能であり、そして外見および増殖の特徴において正常であることを示す（データは示されない）。現在の研究は、骨格筋萎縮のマーカーとして、および萎縮の臨床的な状況における骨格筋の欠失を妨げる治療的な介入に対する強力な標的として M u R F 1 および M A F b x を同定する。M u R F 1 および M A F b x の両方はまた、心筋で特異的に発現されるので、心臓の再構築および疾患におけるこれらのコピキチンリガーゼの役割を試験することもまた重要である。

#### 【0136】

10

（M A F b x および M u R F 1 座の標的化）

M A F b x 座の標的化。マウスの E S 細胞における相同組換えのためのベクターを標的化する遺伝子を産生するために、B A C ゲノムクローンを、M A F b x 遺伝子の第一のコードエクソンに特異的なプローブを用い、G e n o m e S y s t e m s 1 2 9 S v / J ゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより得た。この B A C は、約 9 5 k b のゲノム D N A の挿入を含み、そして全体の M A F b x 遺伝子を包含した。これは 9 個のコードエクソンからなる（ラットおよびヒトの相同分子種における場合）。M A F b x 遺伝子を乱すために、L a c Z / ネオマイシンカセットを、M A F b x プロモーターにより由来される L a c Z 遺伝子発現を可能にさせるために、A T G 開始コドンに正確に挿入した。L a c Z の挿入では、コードエクソン 1 ~ 7 およびエクソン 8 のほとんどを含む、約 3 5 k b の M A F b x ゲノム配列を同時に取り替えた。この F - b o x は、マウス M A F b x 遺伝子、ラット M A F b x 遺伝子およびヒト M A F b x 遺伝子におけるエクソン 7 および 8 によりコードされる。この標的化ベクターを、N o t 1 を用いる消化により直線化し、そして C J 7 の E S 細胞にエレクトロポレーションした（T . M . D e C h i a r a ら、C e l l 8 5、5 0 1 ( 1 9 9 6 ) ）。G 4 1 8 における選択において生存した E S 細胞クローンを、スクリーニングし、相同組換えされた異型接合 E S 細胞を同定した。3 つの標的化クローンを、4 . 6 % の組換え頻度を生じるスクリーニングされた 6 5 のクローンから同定した。図 2 7 A ~ 2 7 B A を参照のこと。

20

#### 【0137】

M u R F 1 座の標的化。マウスの E S 細胞における相同組換えのためのベクターを標的化する遺伝子を産生するために、B A C ゲノムクローンを、M u R F 1 遺伝子の第一のコードエクソンに特異的なプローブを用い、G e n o m e S y s t e m s 1 2 9 S v / J ゲノムライブラリーをスクリーニングすることにより得た。この B A C は、約 3 3 k b のゲノム D N A の挿入を含み、そして M u R F 1 遺伝子の最初の 5 エクソンを含んだ。M u R F 1 遺伝子を乱すために、L a c Z / ネオマイシンカセットを、M u R F 1 プロモーターにより由来される L a c Z 遺伝子発現を可能にさせるために、A T G 開始コドンに正確に挿入した。L a c Z の挿入では、コードエクソン 1 ~ 4 およびエクソン 5 のほとんどを含む、約 8 k b の M u R F 1 ゲノム配列を同時に取り替えた。この R I N G フィンガーは、マウス M u R F 1 遺伝子、ラット M u R F 1 遺伝子およびヒト M u R F 1 遺伝子におけるエクソン 1 および 2 によりコードされる。この標的化ベクターを、N o t 1 を用いる消化により直線化し、そして C J 7 の E S 細胞にエレクトロポレーションした（T . M . D e C h i a r a ら、C e l l 8 5、5 0 1 ( 1 9 9 6 ) ）。G 4 1 8 における選択において生存した E S 細胞クローンを、スクリーニングし、相同組換えされた異型接合 E S 細胞を同定した。3 つの標的化クローンを、1 4 % の組換え頻度を生じるスクリーニングされた 2 2 のクローンから同定した。図 2 7 A ~ 2 7 B B を参照のこと。

30

40

#### 【0138】

（標的化対立遺伝子の非存在の確認：M A F b x ）

M A F b x 遺伝子の標的化を、E S 細胞および異型接合 M A F b x 変異体マウスおよび同型接合 M A F b x 変異体マウスの両方で、内因性（e n d . 対立遺伝子）3 . 1 k b および標的化（m u t . 対立遺伝子）4 . 9 k b の E c o R 1 フラグメントを検出するために

50

、E c o R 1を用いてゲノムテールDNAを消化することおよび5' 1.1 kb S a c I Iフラグメントを用いてプローブすることにより確認した(図30A~30DA)。

【0139】

M A F b x遺伝子における標的化変異を、M A F b xプローブ(コード配列の660~840bpにまたがる(M A F b x;上パネル))、ならびに挿入されたL a c Z遺伝子のプローブを用いてM A F b x + / +、+ / - および - / - マウスから調製した前脛骨筋(T A)および腓腹筋(G A)の両方からm R N Aをプローブすることにより証明した(図30A~30DB)。

【0140】

(標的化対立遺伝子の非存在の確認: M u R F 1)

M u R F 1遺伝子の標的化を、E S細胞および異型接合M u R F 1変異体マウスおよび同型接合M u R F 1変異体マウスの両方で、内因性(e b d. 対立遺伝子)15kbおよび標的化(m u t. 対立遺伝子)10kbのE c o R 1フラグメントを検出するために、E c o R 1を用いてゲノムテールDNAを消化することおよび5' 0.5 kb B g l I I Iフラグメントを用いてプローブすることにより確認した(図30A~30D(C))。

【0141】

M u R F 1遺伝子における標的化変異を、ラットM u R F 1コード配列の1~500bpにまたがるプローブ(M u R F 1;上パネル)ならびに挿入されたL a c Z遺伝子のプローブを用いて、M u R F 1 + / +、+ / - および - / - マウスから調製した前脛骨筋(T A)および腓腹筋(G A)の両方からm R N Aをプローブすることにより証明した(図30A~30DD)。

【0142】

(M A F b xおよびM u R F 1遺伝子が、脱神経後の筋肉において上方調節されることの確認)

M A F b xおよびM u R F 1遺伝子の調節を、M A F b x + / - およびM u R F 1 + / - マウスにおけるb - g a l染色を使用して、試験した。右側の坐骨神経を、異型接合マウスにおいて切断し、前脛骨(T A)筋の脱神経を生じた。7日後、右および左の前脛骨筋を、切り出し、そして同じ時間、同じ培地中でb - g a l活性について染色した。コントロールの筋肉において、いくつかの(主に深い領域)(しかし全てではない)T Aの筋線維におけるM A F b xの発現の低いレベルがある。比較において、M u R F 1は、M A F b xよりわずかに高いレベルで全ての線維において発現される。脱神経後、M A F b xおよびM u R F 1発現の両方は、全ての筋線維で上方調節される。図31A~31C(A)。

【0143】

欠乏性のM A F b xおよびM u R F 1由来の筋質量を、野生型(+ / +)マウスと比較し、そして野生型(+ / +)マウスと比較した場合、脱神経後にマウスが筋質量を維持することが見出された。成体のマウス(M A F b x + / +および- / -)の右後肢筋を、右坐骨神経を切断することにより脱神経した。各動物の左後肢は、それ自身のコントロールとして役立った。脱神経後7日および14日目に、右および左の腓腹筋複合体(G A)を、除去し、そして重さを量った。筋重量(G A)を、コントロールの%(右/左の筋重量データが、平均値±s . e . m .、n = 5~10匹のマウスとなるように計算される)としてプロットした。図30A~30D(B)。

【0144】

筋線維のサイズおよび可変性は、脱神経後、M A F b x欠乏性マウス由来の筋肉において維持された。前脛骨筋からとられた切断面を、ラミニンに対する抗体(S i g m a)を用いて染色した。図30A~30D(C)において、代表的な切断面は、前脛骨筋から示されている:野生型(+ / +)、コントロールの左側(左上);野生型(+ / +)、脱神経されて14日目の右側(左下);異型接合(- / -)、コントロールの左側(右上);異型接合、脱神経されて14日目の右側。

【0145】

10

20

30

40

50

本明細書中で論じられるような、ノックアウト動物の生成において使用され得る方法論の詳細な説明については、内容が本明細書により参考として援用される、2000年10月31日に出願された米国特許出願第60/244,665号より優先を主張する2000年12月7日に出願された米国特許出願第09/732,234を参照のこと。

【0146】

本願を通して、用語MURF1およびMURF3は、MAFbxであるとして、使用される。本発明者らが以前に出願した優先出願において、用語MA-16およびMAFBXは使用された。用語におけるこの変化は、命名法における変化を表わし、そして分子は、これらの配列によりさらに正確に同定される。

【0147】

(生物材料の寄託)

以下のクローンは、1999年12月10日に、American Type Culture Collection (ATCC (登録商標))、10801 University Boulevard、Manassas、VA 20110-2209に寄託された。

クローン

特許寄託命名

Stratagene T3/T7ベクターの

ヒトMA61K8

PTA-1048

Stratagene T3/T7ベクターの

ヒトMA16C8

PTA-1049

Stratagene T3/T7ベクターの

ヒトMA61D18

PTA-1050

本発明は、本明細書中に記載される特定の実施形態による範囲に限定されない。実際は、本明細書中に記載されるものに加えて本発明の種々の改変は、前述の説明および添付の図から当業者に明白となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、SCF複合体のMAFBXタンパク質に関連する構成成分の概略図を示す。

【図2】

図2は、MA-61のF-ボックスドメインを示す配列比較を示す。

【図3】

図3は、ヒトMAFBXタンパク質の構造ドメインの概略図を示す。

【図4】

図4は、ヒトMURF1タンパク質の構造ドメインの概略図を示す。

【図5A】

図5A~図5Bは、広範な相同性を示すMAFBXとFbx25との間の配列比較を示す。

【図5B】

図5A~図5Bは、広範な相同性を示すMAFBXとFbx25との間の配列比較を示す。

【図6】

図6は、ラットMURF1のヌクレオチド配列を示す。

【図7】

図7は、ラットMURF1の推定アミノ酸配列を示す。

【図8】

図8~8Cは、ヒトMURF1のヌクレオチド配列を示す。

【図9】

図9は、ヒトMURF1の推定アミノ酸配列を示す。

【図10】

図10は、ラットMAFBXのヌクレオチド配列を示す。

10

20

30

40

50

## 【図11】

図11は、ラットMAFBXの推定アミノ酸配列を示す。

## 【図12】

図12は、ヒトMAFBXクローンK8のヌクレオチド配列を示す。

## 【図13】

図13は、ヒトMAFBXクローンK8の推定アミノ酸配列を示す。

## 【図14】

図14は、MURF1のリングドメインを示す配列比較を示す。

## 【図15】

図15は、ユビキチンリガーゼ複合体のMURF1タンパク質に関連する構成成分の概略図を示す。 10

## 【図16】

図16は、ラットMURF1 VRVスプライス形態のヌクレオチド配列を示す。

## 【図17】

図17は、ラットMURF1 VRVスプライス形態の推定アミノ酸配列を示す。

## 【図18】

図18は、ヒトMAFBXクローンD18のヌクレオチド配列を示す。

## 【図19】

図19は、ヒトMAFBXクローンD18の推定アミノ酸配列を示す。

## 【図20】

図20は、hMURF3とrMURF1の配列アライメントを示す。 20

## 【図21】

図21は、ヒトMURF3クローンC8のヌクレオチド配列を示す。

## 【図22】

図22は、ヒトMURF3クローンC8の推定アミノ酸配列を示す。

## 【図23】

図23は、萎縮症に関する遺伝子の差示的表示分析を示す。

## 【図24】

図24は、筋肉クレアチンキナーゼ (muscle creatine kinase) (MCK)、myoD、ミオゲニン (myogenin) およびMyf5の発現に対する萎縮症の効果を示すノーザンプロットを示す。 30

## 【図25】

図25Aは、全長のラットMurF1に対して惹起される抗体を用いての免疫プロットを示す。図25Bは、MurF2およびMurF3のノーザン分析を示す。

## 【図26】

図26は、ラットMAFbxタンパク質およびヒトMAFbxタンパク質、ならびにヒトFbx25の配列アライメントを示す。

## 【図27】

図27A～図27BAは、LacZ/Pgk neoと交換されるMAFbx遺伝子の部分を示す概略図を示す。図27A～図27BBは、LacZ/Pgk neoと交換されるMurF1遺伝子の部分を示す概略図を示す。 40

## 【図28】

図28A～図28DAは、ラットの内側腓腹筋の質量減少の時間経過が、3つのインビボモデルで試験されたことを示す：脱神経、固定化および後肢吊り下げ。図28A～図28DBは、MurF1およびMAFbx転写物に対する萎縮症の効果を示すノーザンプロットを示す。図28A～図28DCは、MurF1およびMAFbxの発現に対するデキサメタゾン (DEX) およびインターロイキン-1 (IL-1) の効果を示すノーザンプロットを示す。

図28A～図28DDは、MurF1およびMAFbxの組織特異的発現を示す。

## 【図29】

図29A～図29DAは、共沈殿を示す：MAFbx、Cullin、Skp-1。図29A～図29DBは、MAFbxの過剰発現によって誘発される萎縮症を示す。図29A～図29DCは、MAFbxウイルスに感染した筋管中における、Myc-エピトープでタグ化MAFbxタンパク質の存在を確認する溶解物の免疫プロット(I.B.)を示す。図29A～図29DDは、<sup>32</sup>P標識高分子量ユビキチン結合体の検出を示す。

【図30】

図30A～図30DAは、標的化された対立遺伝子の決失の確認を示す：MAFbx。図30A～図30DBは、標的化された対立遺伝子の決失の確認を示す：MAFbx。図30A～図30DCは、標的化された対立遺伝子の決失の確認を示す：MuRF1。図30A～図30DDは、標的化された対立遺伝子の決失の確認を示す：MuRF1。

10

【図31】

図31A～図31CAは、マウスの(MAFbx +/- および MuRF1 +/- 組織のB-gal染色を示す。図31A～図31CBは、野生型(+ / +)マウスと比較した場合の脱神経後の筋肉塊を示す。図31A～図31CCは、脱神経後のMAFbx決失マウス由来の筋肉中の筋線維サイズおよび変動性を示す。

【図32】

図32は、MAFbxタンパク質が、MA61と同じタンパク質であることを示す配列アライメントを示し、そして異なる名前は、命名法での変化を示す。

【図33】

図33は、MuRF1タンパク質が、MA16と同じタンパク質であることを示す配列アライメントを示し、そして異なる名前は、命名法での変化を示す。

20

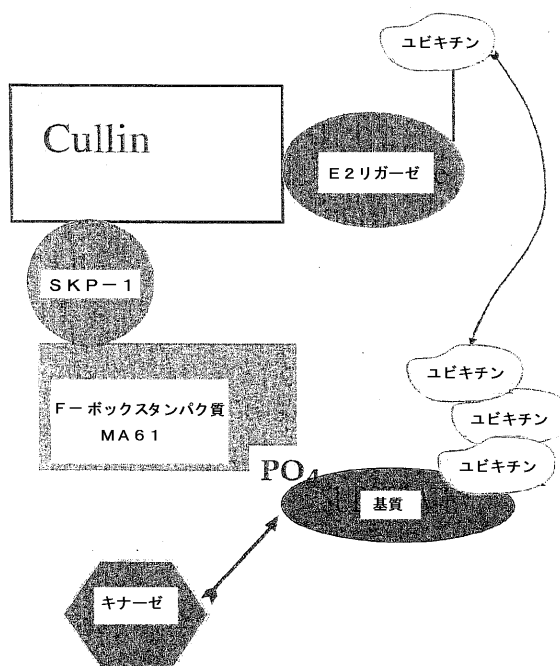
【図34】

図34は、hMURF1とrMA16の配列アライメントを示す。

【図1】

FIGURE 1

MA61- SCF E3ユビキチンリガーゼ複合体の一部



【図2】

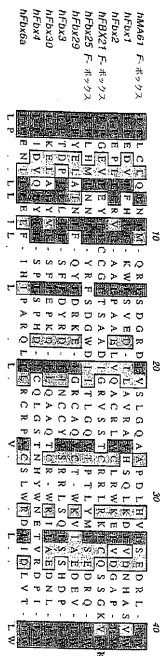
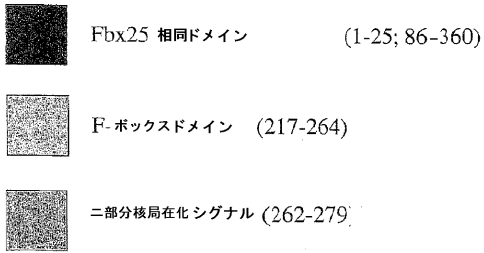
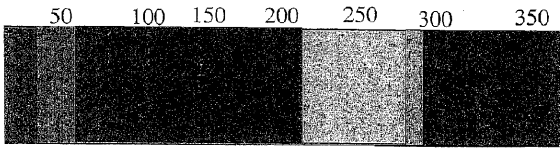


FIGURE 2  
ClustalW 型式化アライメント

【 図 3 】

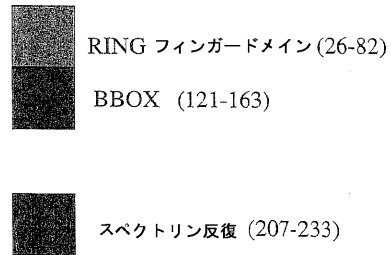
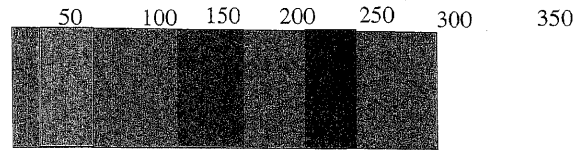
FIGURE 3  
MA 61



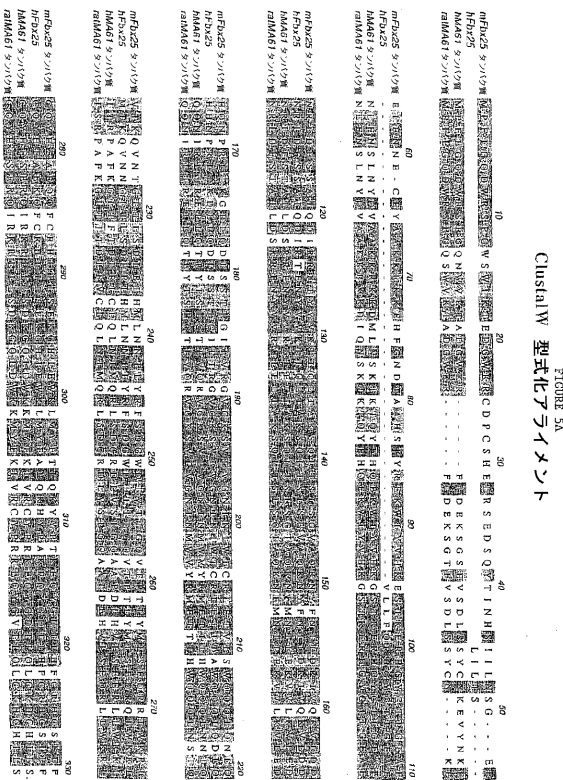
【 図 4 】

FIGURE 4

ヒト MURF 1 概略図



【 図 5 A 】



【 図 5 B 】





【 2 3 】

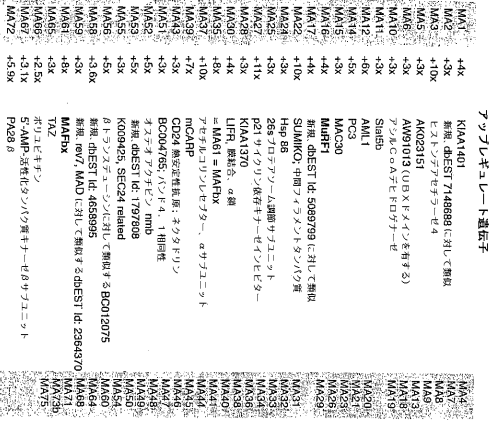


FIGURE 23

表1: Gene Tag™ 発現の表示法によって固定された遺伝子転写物

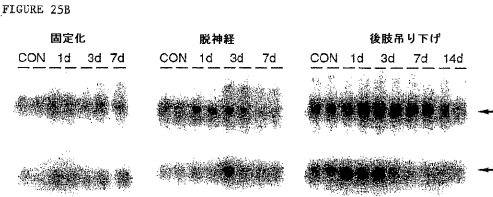
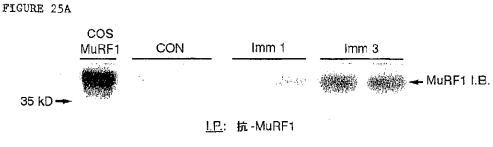
アップレギュレート遺伝子

MA1	+4x	KIAA1401
MA2	+10x	新規 dEST ID: 744889 (新規)
MA3	+3x	新規 dEST ID: 744889 (新規)
MA4	+3x	新規 dEST ID: 744889 (新規)
MA5	+3x	新規 dEST ID: 744889 (新規)
MA6	+3x	新規 dEST ID: 744889 (新規)
MA7	+3x	新規 dEST ID: 744889 (新規)
MA8	+3x	新規 dEST ID: 744889 (新規)
MA9	+3x	新規 dEST ID: 744889 (新規)
MA10	+3x	新規 dEST ID: 744889 (新規)
MA11	+3x	新規 dEST ID: 744889 (新規)
MA12	+3x	新規 dEST ID: 744889 (新規)
MA13	+3x	新規 dEST ID: 744889 (新規)
MA14	+3x	新規 dEST ID: 744889 (新規)
MA15	+3x	新規 dEST ID: 744889 (新規)
MA16	+3x	新規 dEST ID: 744889 (新規)
MA17	+3x	新規 dEST ID: 744889 (新規)
MA18	+3x	新規 dEST ID: 744889 (新規)
MA19	+3x	新規 dEST ID: 744889 (新規)
MA20	+3x	新規 dEST ID: 744889 (新規)
MA21	+3x	新規 dEST ID: 744889 (新規)
MA22	+3x	新規 dEST ID: 744889 (新規)
MA23	+3x	新規 dEST ID: 744889 (新規)
MA24	+3x	新規 dEST ID: 744889 (新規)
MA25	+3x	新規 dEST ID: 744889 (新規)
MA26	+3x	新規 dEST ID: 744889 (新規)
MA27	+3x	新規 dEST ID: 744889 (新規)

ダウンレギュレート遺伝子

MA28	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA29	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA30	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA31	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA32	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA33	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA34	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA35	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA36	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA37	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA38	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA39	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA40	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA41	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA42	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA43	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA44	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA45	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA46	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA47	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA48	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA49	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA50	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA51	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA52	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA53	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA54	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA55	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA56	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA57	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA58	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA59	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA60	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA61	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA62	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA63	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA64	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA65	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA66	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA67	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA68	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA69	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA70	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA71	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA72	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA73	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA74	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA75	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA76	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA77	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA78	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA79	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA80	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA81	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA82	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA83	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA84	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA85	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA86	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA87	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA88	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA89	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA90	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA91	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA92	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA93	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA94	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA95	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA96	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA97	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA98	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA99	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)
MA100	-3x	新規 dEST ID: 598979 (新規)

【 2 5 】



【 2 4 】

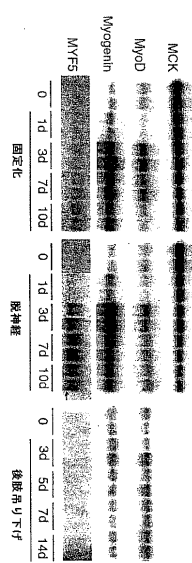


FIGURE 24

【 2 6 】

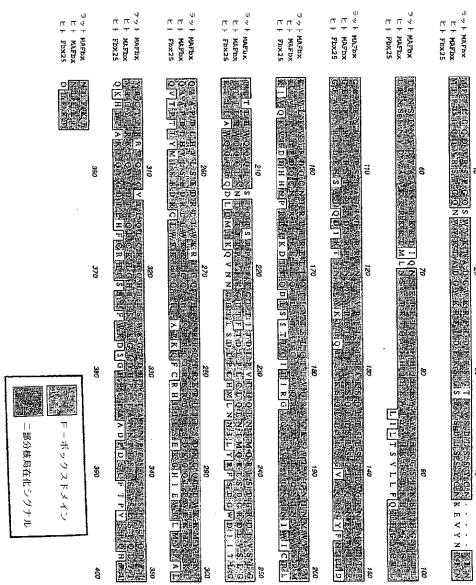


FIGURE 16

【 27 】

FIGURE 27A

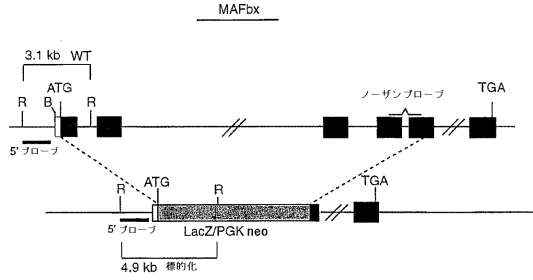
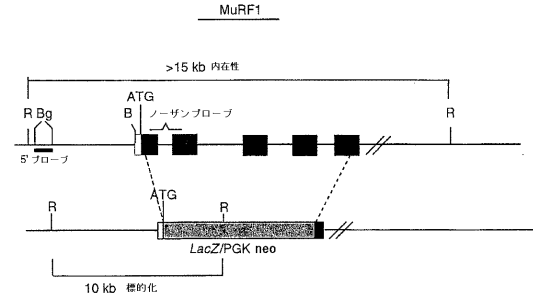


FIGURE 27B



【 28 】

FIGURE 28A

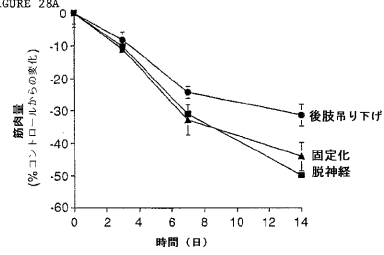


FIGURE 28B

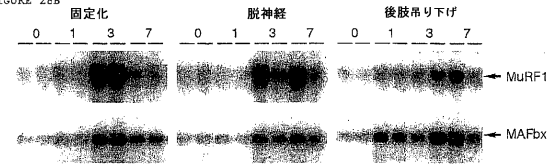


FIGURE 28C

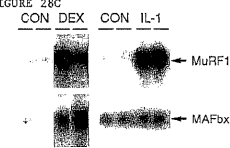
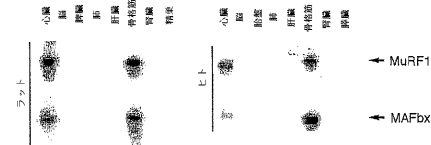
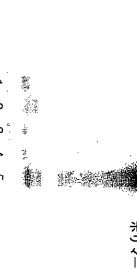
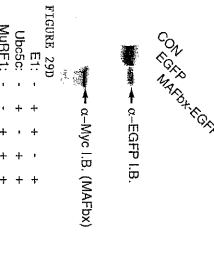
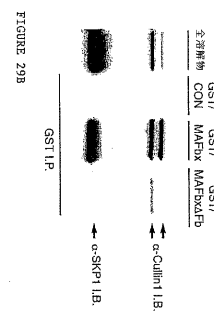
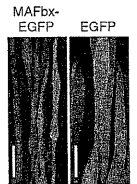


FIGURE 28D



【 29 】



【 30 】

FIGURE 30A

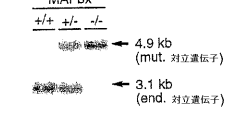


FIGURE 30C

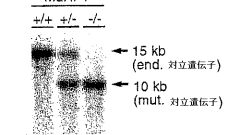


FIGURE 30B

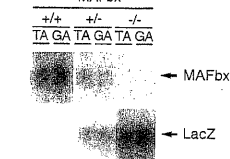
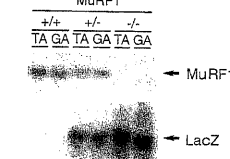
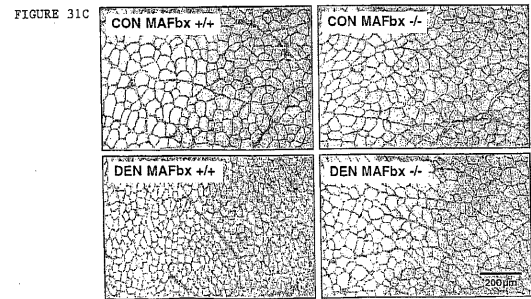
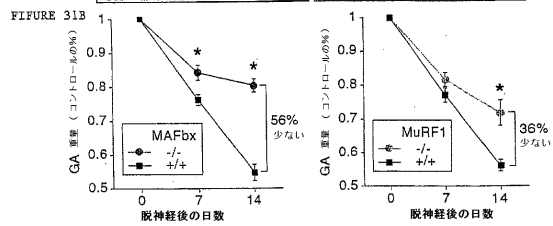
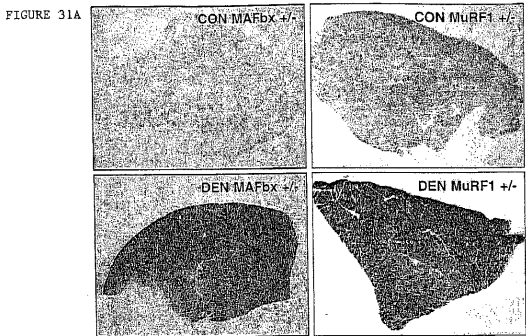


FIGURE 30D



【 3 1 】



【 3 3 】

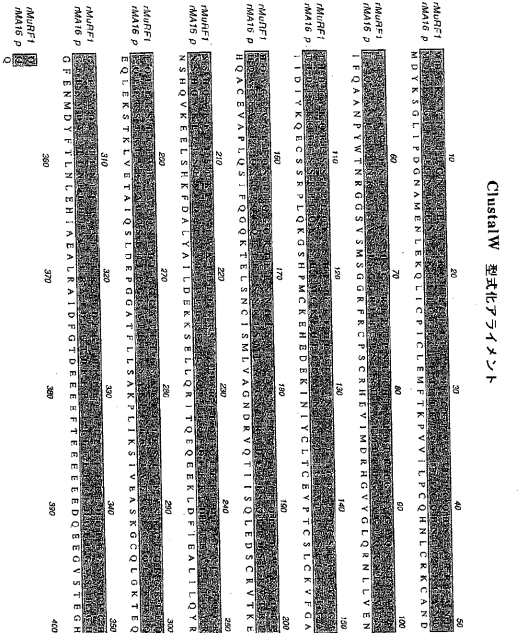


FIGURE 33

【 3 2 】

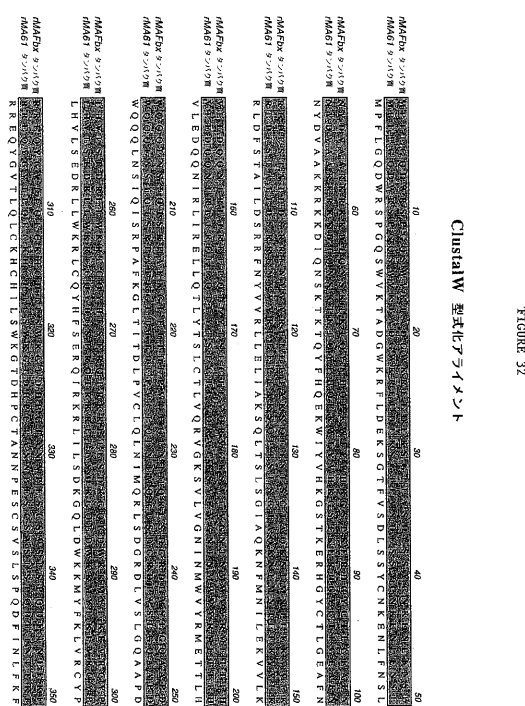


FIGURE 32

【 3 4 】

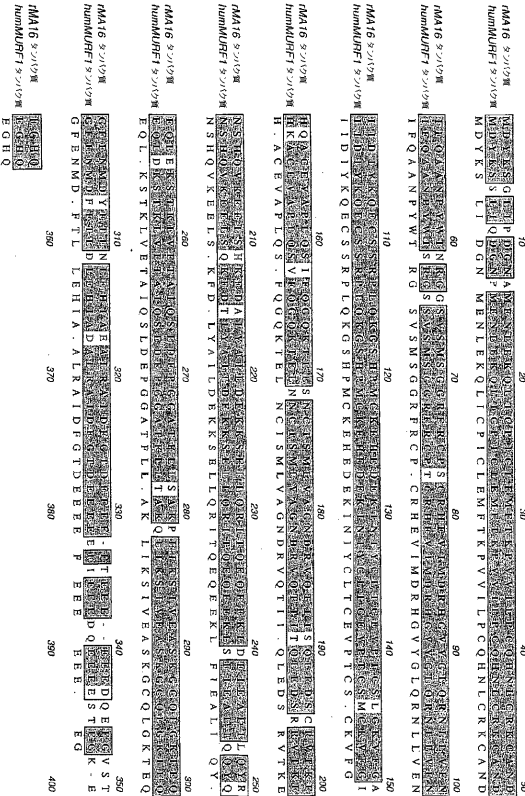


FIGURE 34

## 【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
8 August 2002 (08.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/061046 A2

- (51) International Patent Classification: C12N
- (21) International Application Number: PCT/US02/02811
- (22) International Filing Date: 30 January 2002 (30.01.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
60/266,936 30 January 2001 (30.01.2001) US  
60/311,697 10 August 2001 (10.08.2001) US  
60/338,742 22 October 2001 (22.10.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. (US/US); 777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, NY 10591 (US).
- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): GLASS, David, J. (US/US); 341 Furnace Duck Road, #30, Cortlandt Manor, NY 10567 (US). BODINE, Sue, C. (US/US); 75 Washington Street, West Harrison, NY 10604 (US).
- (74) Agents: FISCHER, Laura, J.; Regeneron Pharmaceuticals, Inc., 777 Old Saw Mill River Road, Tarrytown, NY 10591 et al. (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LL, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HE, IE, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**  
without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 02/061046 A2

(54) Title: NOVEL NUCLEIC ACID AND POLYPEPTIDE MOLECULES

(57) Abstract: The present invention provides for nucleic acid sequences that encode novel mammalian intracellular signaling polypeptides, designated MURF1, MURF3, or MA-61. The invention also provides assay systems that may be used to detect and/or measure agents that bind the MURF1 or MAFBX gene product. The present invention also provides for diagnostic and therapeutic methods based on the interaction between MURF1 or MAFBX and agents that initiate signal transduction or inhibition of ubiquitination through binding to MURF1 or MA-61, inhibiting the mRNA expression of MURF1, MURF3, or MA-61, or inhibiting the MURF1, MURF3, or MAFBX pathway.

WO 02/061046

PCT/US02/02811

**NOVEL NUCLEIC ACID AND POLYPEPTIDE MOLECULES**

Throughout this application, various publications are referenced. The disclosures of  
5 these publications in their entireties are hereby incorporated by reference into this  
application. This application claims priority to provisional applications US  
Application Nos. 60/264,926 filed 1/30/01, 60/311,697 filed 8/10/01, and  
60/338,742 filed 10/22/01.

0

**INTRODUCTION**

This invention relates to novel human nucleotide sequences. Two of these, herein  
designated MURF1 and MA-61, encode novel substrate-targeting subunits of  
5 ubiquitin ligases and are modulated by conditions or agents that either induce,  
prevent or reverse muscle atrophy. An additional sequence that is highly  
homologous to MuRF-1 encodes a molecule herein designated MuRF-3 whose  
substrate is Syncoilin. Induction of atrophy causes an increase in mRNA expression  
of these genes; reversal or prevention of atrophy decreases or blocks expression of  
0 these genes. The MURF1 and MAFBXcDNA sequences, and additional experiments  
described herein, demonstrate that the MURF1 and MAFBX protein molecules are  
involved in ubiquitination, a specific pathway of initiating protein breakdown in the  
cell. The invention encompasses the nucleic acid molecules which encode MURF1,  
MURF-3 and/or MA-61, transgenic mice, knock-out mice, host cell expression  
5 systems and proteins encoded by the nucleotides of the present invention. The  
invention further relates to the use of these nucleic acids in screening assays to  
identify potential therapeutic agents which affect these genes themselves and the  
proteins they encode, ubiquitination, muscle atrophy and associated diseases,  
disorders and conditions. In addition, the invention further encompasses therapeutic  
0 protocols and pharmaceutical compositions designed to target the ubiquitin pathway  
and the substrates thereof for the treatment of associated diseases. The molecules  
disclosed herein function to modulate muscle atrophy or induce muscle  
hypertrophy.

WO 02/061046

PCT/US02/02811

**BACKGROUND OF THE INVENTION**

A decrease in muscle mass, or atrophy, is associated with various physiological and pathological states. For example, muscle atrophy can result from denervation due to nerve trauma; degenerative, metabolic or inflammatory neuropathy, e.g. Guillian-Barré syndrome; peripheral neuropathy; or nerve damage caused by environmental toxins or drugs. Muscle atrophy may also result from denervation due to a motor neuropathy including, for example, adult motor neuron disease, such as Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS or Lou Gehrig's disease); infantile and juvenile spinal muscular atrophies; and autoimmune motor neuropathy with multifocal conductor block. Muscle atrophy may also result from chronic disease resulting from, for example, paralysis due to stroke or spinal cord injury; skeletal immobilization due to trauma, such as, for example, fracture, sprain or dislocation; or prolonged bed rest (R. T. Jagoe, A. L. Goldberg, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 4, 183 (2001)). Metabolic stress or nutritional insufficiency, which may also result in muscle atrophy, include *inter alia* the cachexia of cancer, AIDS, and other chronic illnesses, fasting or rhabdomyolysis, and endocrine disorders such as disorders of the thyroid gland and diabetes. Muscle atrophy may also be due to a muscular dystrophy syndrome such as Duchenne, Becker, myotonic, fascioscapulohumeral, Emery-Dreifuss, oculopharyngeal, scapulohumeral, limb girdle, and congenital types, as well as the dystrophy known as Hereditary Distal Myopathy. Muscle atrophy may also be due to a congenital myopathy, such as benign congenital hypotonia, central core disease, nemaline myopathy, and myotubular (centronuclear) myopathy. Muscle atrophy also occurs during the aging process.

Muscle atrophy in various pathological states is associated with enhanced proteolysis and decreased synthesis of muscle proteins. Muscle cells contain lysosomal proteases and cytosolic proteases. The cytosolic proteases include Ca<sup>2+</sup>-activated neutral proteases (calpains) and an ATP-dependent ubiquitin-proteasome proteolytic system. The lysosomal and cytosolic systems are capable of degrading muscle proteins *in vitro*, but less is known about their roles in the proteolysis of muscle proteins *in vivo*. Some studies have reported that proteasome inhibitors reduce proteolysis in atrophying rat skeletal muscle (e.g. Tawa et al. (1997) *J. Clin. Invest* 100:197), leading to suggestions that the ubiquitin-proteasome pathway has a role in

WO 02/061046

PCT/US02/02811

the enhanced proteolysis. However, the precise mechanisms of proteolysis in atrophying muscle remain poorly characterized. A better understanding of proteolysis would allow the design of strategies and agents for the prevention and treatment of atrophy.

5

Protein degradation is a common mechanism used by cells to control protein abundance. However, rather than simply degrading all proteins, ubiquitination seems to be very specific in terms of protein target selection. The formation of such ubiquitin-protein conjugates involves a protein complex consisting of three

0

components: a ubiquitin activating enzyme (E1), a ubiquitin conjugating enzyme (E2), and a substrate specificity determining component (E3) (Skowyra, et al, 1997, Cell 91:209-219). There are several distinct molecular strategies that regulate which protein targets become ubiquitinated. A recently discovered mechanism is referred to as the SCF E3 ubiquitin ligase complex (see Figure 1 for a schematic

5

representation of the complex). The SCF protein complex comprises several distinct protein subunits, including a protein which has a domain referred to as an "F-box."

In the presence of a phosphorylated substrate, the SCF complex binds to the substrate, and ubiquitinates it, using an E2 ubiquitin transferase which is also part of the SCF complex (Patton, et al, 1998, Genes & Development 12:692-705). The result is

0

the specific proteolytic degradation of the substrate. F-box proteins comprise a large family that can be divided into three subfamilies: 1) Fbws, which are characterized by multiple Trp-Asp repeats (WD-40 repeats); 2) Fbls, which are characterized by leucine-rich repeat; and 3) Fbxs, which lack known protein interaction domains (see Winston, et al, 1999, Current Biology 9:1180-1182 for a discussion of the currently

5

known mammalian F-box protein family members). F-box proteins usually contain an additional substrate-binding domain that interacts with specific protein substrates and a 42-48 amino acid motif termed the F-box (Winston, 1999). See Figure 2 for a comparison of hMAFBX with other F-box-containing proteins.

0

Another mechanism for ligation of ubiquitin to specific substrates involves proteins which contain a "ring-domain." Ring-domain proteins can either act as independent monomeric ubiquitin ligases, or they can function as part of an SCF complex. As with F-box proteins, ring-domain proteins usually contain a second domain which binds specific substrates. The ring-domain recruits the ubiquitin ligase. The net

WO 02/061046

PCT/US02/02811

result is the ubiquitination of the substrate, resulting in proteolysis.

Another protein complex involved in the maintenance of normal muscle tissue is the dystrophin protein complex, which is thought to play an integral role in the link  
5 between the extracellular matrix of the muscle cell and the actin cytoskeleton. A key component of the dystrophin protein complex is a-dystrobrevin, a dystrophin-associated protein whose absence results in neuromuscular junction defects and muscular dystrophy. Recently a novel a-dystrobrevin-binding partner called Syncoilin has been identified. (Newey, et al, JBC Papers in Press, 10/25/00).  
0 Syncoilin is a member of the intermediate filament family. It is highly expressed in skeletal and cardiac muscle, and is concentrated at the neuromuscular junction.

In accordance with the present invention, novel protein molecules termed MURF1 (formerly called MUSCLE ATROPHY-16 or MA-16), MURF3, and MUSCLE  
5 ATROPHY-61 (MA-61), have been discovered. MAFBX is a novel F-box protein (see Figure 3 for a schematic representation) that is specifically expressed in skeletal muscle and heart, and, to a lesser degree, certain areas of the brain. The level of expression of MAFBX mRNA increases significantly during skeletal muscle atrophy. MURF1 is a novel ring domain protein (see Figure 4 for a schematic representation)  
0 that is specifically expressed in skeletal muscle and heart. The level of expression of MURF1 mRNA increases significantly during skeletal muscle atrophy. Therefore, it has been discovered in accordance with the present invention that mRNA expression of MURF1 or MAFBX provide unique markers for muscle atrophy. MURF3 is a  
5 novel ring domain protein, whose substrate is Syncoilin which is involved in the dystrophin protein complex. Because this complex is involved in the maintenance of normal muscle tissue, MURF-3 may also be useful in the prevention of atrophy, as well as other diseases and complications of the musculature. The present discovery allows for the identification of agents for the treatment and prevention of atrophy as well as identification of a pathway useful for targeting agents for the treatment and  
0 prevention of atrophy. The present invention provides general insight into normal muscle functioning, particularly with regards to the SCF protein complex and the dystrophin complex.

WO 02/061046

PCT/US02/02811

**SUMMARY OF THE INVENTION**

The present invention provides for the protein and nucleic acid sequences of novel mammalian intracellular signaling molecules, termed MURF1, MURF 3, and  
5 MUSCLE ATROPHY-61 (MA-61), and the therapeutic protocols and compositions utilizing such molecules in the treatment of muscle atrophy and other related conditions. The present invention relates to screening assays to identify substrates of these molecules and to the identification of agents which modulate or target these  
0 molecules, ubiquitination or the ubiquitin pathway, or the dystrophin complex. These screening assays may be used to identify potential therapeutic agents for the treatment of muscle atrophy and related disorders.

The present invention provides for the protein or polypeptide that comprises the F-box motif of MAFBX or the ring domain of MURF1 and MURF3 and the nucleic acids  
5 which encode such motifs and/or domains.

The invention also describes a co-association between MURF3 nucleic acids and the Syncoilin gene. This interaction provides insight into the functioning of normal muscle cells and in particular the relationship between the dystrophin protein  
0 complex, the intermediate filament superfamily, and the ubiquitination protein complex.

The invention additionally describes a novel protein-protein interaction domain of MA-61. This domain was determined by comparing the MAFBX protein to a  
5 previously discovered F-box-containing protein, Fbx25. These two proteins contain an area of homology distinct from the F-box domain. Applicant calls this domain the Fbx25 homology domain. See Figures 5A-5B for the comparison of MAFBX with Fbx25.

0 The invention further provides for vectors comprising an isolated nucleic acid molecule of MURF1, MURF3, or MAFBX or the F-box motif of MAFBX or the ring domain of MURF1 or MURF3, which can be used to express MURF1, MURF3 or MAFBX peptides, or the F-box motif of MA-61, or the ring domain of MURF1 or MURF3 nucleic acids, or MURF1, MURF3, or MAFBX proteins in bacteria, yeast,

WO 02/061046

PCT/US02/02811

insect or mammalian cells.

- Thus the present invention encompasses the following nucleic acid sequences, host cells expressing such nucleic acid sequences and the expression products of such nucleotide sequences: (a) nucleotide sequences that encode MURF1, MURF3, or MA-61, including both the human and rat homologues, and their gene products; (b) nucleotide sequences that encode the portions of the novel substrate targeting subunits of the MURF1, MURF3, and MAFBX molecules, including the F-box motif of MA-61, the ring domain of MURF1 or MURF3, the portion of the MURF3 molecule that co-associates with the Syncoilin gene, and the Fbx25 homology domain of MA-61; (c) nucleotide sequences that encode mutants of the novel molecules MURF1, MURF3, and MAFBX in which all or part of the domain is deleted or altered, and the polypeptide products specified by such nucleotide sequences; (d) nucleotide sequence domains that encode fusion proteins containing the novel ubiquitin pathway molecules or one of the domains fused to another polypeptide, and those encoding novel dystrophin complex proteins or one of those domains fused to another polypeptide, (e) nucleotide sequences that hybridize with any of the above enumerated nucleotide sequences under stringent conditions, (stringent conditions may include, for example, hybridizing in a buffer comprising 30% formamide in 5 x SSPE (0.18 M NaCl, 0.01 M NaPO<sub>4</sub>, pH 7.7, 0.001 M EDTA) buffer at a temperature of 42°C and remaining bound when subject to washing at 42°C with 0.2 x SSPE; preferably hybridizing in a buffer comprising 50% formamide in 5 x SSPE buffer at a temperature of 42°C and remaining bound when subject to washing at 42°C with 0.2 x SSPE buffer at 42°C; or preferably hybridizing in a buffer comprising 20% SDS, 10% BSA, 1M NaPO<sub>4</sub>, .5M EDTA, pH 8 at a temperature of 60°C and remaining bound when subject to washing at 65°C with 2x SSC, .1% SDS); and (f) nucleotide sequences that are 65% homologous to the above enumerated nucleotide sequences within block of sequence at least 100 base pair in length.
- The present invention further provides for use of the MURF1, MURF3, or MAFBX nucleic acids or proteins, the F-box motif of MA-61, the ring domain of MURF1 or MURF3, the portion of the MURF3 molecule that co-associates with the Syncoilin gene, and the Fbx25 homology domain of MA-61, in screening for drugs

WO 02/061046

PCT/US02/02811

or agents that interact with or modulate the ubiquitin pathway, the activity or expression of MURF1, MURF3, or MAFBX nucleic acids or proteins, muscle atrophy, and/or the dystrophin complex. Therefore the present invention provides for the use of MURF1, MURF3, and MAFBX nucleic acids or proteins and/or particular domains thereof to follow or modulate interactions of particular drugs, agents, or molecules in the cell, particularly the muscle cell, but also certain neuronal cells, since MAFBX expression is also detected in regions of the brain. In particular embodiments, the F-box motif of MAFBX or the ring domain of MURF1 or MURF3 is utilized to screen molecules or agents for interaction with or modulation of the activity or expression of the MURF1, MURF3, or MAFBX molecules. In other embodiments, MURF1, MURF3, and MAFBX nucleic acids or proteins are used as markers during assay experiments to find drugs which block or prevent muscle atrophy.

The present invention also provides for the use of MURF1, MURF3, or MAFBX nucleic acids or proteins to decrease ubiquitination and/or muscle atrophy by modulating MURF1, MURF3, or MAFBX protein or peptide expression or activity, or by effecting MURF1, MURF3, or MAFBX protein interactions in the cell so as to inhibit ubiquitination.

The invention further encompasses all agonists and antagonists of the novel MURF1, MURF3, and MAFBX molecules and their subunits, including small molecules, large molecules, mutants that compete with the native MURF1, MURF3, and MAFBX binding proteins, and antibodies, as well as nucleotide sequences that can be used to inhibit MURF1, MURF3, and MAFBX protein and peptide expression, including antisense and ribozyme molecules and gene regulatory or replacement constructs, or to enhance MURF1, MURF3, and MAFBX protein or peptide expression, including expression constructs that place the MURF1, MURF3, or MAFBX gene under the control of a strong promoter sequence, and transgenic animals that express a MURF1, MURF3, or MAFBX transgene or knock-out animals that do not express the MURF1, MURF3, or MAFBX molecule.

The invention also provides for (a) nucleic acid probe(s) capable of hybridizing with a sequence included within the sequences of human (h)MURF1, rodent (r)MURF1,

WO 02/061046

PCT/US02/02811

(h) MURF 3, (r)MURF 3, (h)MA-61, or (r)MAFBXDNA, useful for the detection of MURF1, MURF3, or MAFBXmRNA - expressing tissue in humans and rodents.

5 The invention further encompasses screening methods to identify derivatives and analogues of the binding subunits of MURF1, MURF3, and MAFBX which modulate the activity of the molecules as potential therapeutics for the prevention of muscle atrophy and related diseases and disorders. The invention provides for methods of screening for proteins that interact with the MURF1, MURF3, and MA-61, or derivatives, fragments, or domains thereof, such as the F-box motif of MA-61, the ring domain of MURF1 and MURF3, the portion of the MURF3 molecule that co-associates with the Syncoilin gene, and the Fbx25 homology domain of MA-61. In accordance with the invention, the screening methods may utilize known assays to identify protein-protein interactions including phage display assays, immunoprecipitation with an antibody that binds to the protein followed by size fractionation analysis, Western analysis, gel electrophoresis, the yeast-two hybrid assay system or variations thereof.

0 The invention further provides for antibodies, including monoclonal and polyclonal antibodies, directed against MURF1 protein, MURF3 protein, or MAFBX protein, or the F-box motif of MAFBX protein, or the ring domain of MURF1 or MURF 3 protein, or a fragment or derivative thereof.

5 The present invention also has diagnostic and therapeutic utilities. Such methods may utilize the gene sequences and/or the gene product sequences for diagnostic or genetic testing. In particular embodiments of the invention, methods of detecting the expression of MURF1, MURF3, or MAFBXmRNA or methods of detecting MURF1, MURF3, or MAFBX proteins described herein may be used in the diagnosis of skeletal muscle atrophy in association with a variety of illnesses, syndromes or disorders, cardiac or skeletal, including those affecting the neuromuscular junction. Mutations in molecules modulating or targeting the ubiquitin pathway may be detected and a subject may be evaluated for risk of developing a muscle atrophy related disease or disorder.

WO 02/061046

PCT/US02/02811

In other embodiments, manipulation of MURF1, MURF3, or MAFBXmRNA expression, or other agents which interact with or modulate the activity or expression of these genes or gene-products, may be employed in the treatment of illnesses, syndromes or disorders associated with muscle atrophy and dystrophy, for example, skeletal or cardiac muscle disorders. Further, the measurement or analysis of MURF1, MURF3, or MAFBXnucleic acids or proteins levels or activity could be used in other embodiments to determine whether pharmacological agents perturb the atrophy process; an increase in expression would correlate to an increase in protein breakdown, whereas a decrease or blockage of expression would correlate to effective decrease or blockade of muscle protein breakdown. In further embodiments, the F-box motif of MAFBXor the ring domain of MURF1 or MURF3 may be manipulated for the treatment of illnesses, syndromes or disorders associated with muscle atrophy and dystrophy, for example, skeletal or cardiac muscle disorders.

The invention further comprises a method of inhibiting atrophy in muscle cells comprising contacting the cells with an inhibitor of MURF1, MURF3, or MAFBXproteins or nucleic acids, an inhibitor of a MURF1, MURF3, or MAFBXpathway, or an inhibitor of ubiquitination. The invention further comprises a method of inhibiting atrophy in muscle cells comprising contacting the cells with an inhibitor of muscle atrophy, resulting in a decrease in expression of MURF1, MURF3, or MAFBXnucleic acids or proteins or activity of MURF1, MURF3, or MAFBXpeptides or proteins. In this embodiment, expression of MURF1, MURF3, or MAFBXnucleic acids or proteins or activity of MURF1, MURF3, or MAFBXpeptides or proteins would be used as a marker to verify the efficacy of the test compound in inhibiting muscle atrophy or the diseases associated therewith.

The invention further provides for a method for screening for agents useful in the treatment of a disease or disorder associated with muscle atrophy comprising contacting a cell expressing MURF1, MURF3 or MAFBXhaving the amino acid sequence of Figures 7, 9, 11, 13, 17, 19, and 22, respectively, or a fragment thereof, and its substrate, with a compound and detecting a change in the activity of either MURF1, MURF3, or MAFBXgene products. Such change in activity may be manifest by a change in the interaction of MURF1, MURF3, or MAFBXgene products with

WO 02/061046

PCT/US02/02811

one or more proteins, such as one of their substrates or a component of the ubiquitin pathway, or by a change in the ubiquitination or degradation of the substrate.

5 The invention further provides for a method for screening for agents useful in the treatment of a disease or disorder associated with muscle atrophy comprising producing MURF1, MURF3, or MAFBX protein, and using either of these proteins in *in vitro* ubiquitin ligase assays. Agents would be screened for their effectiveness in inhibiting ubiquity ligation *in vitro*.

0 The invention also provides for a method of treating a disease or disorder in an animal associated with muscle atrophy comprising administering to the animal a compound that modulates the MURF1, MURF3, or MAFBX pathway, ubiquitination, or the synthesis, expression or activity of the MURF1, MURF3, or MAFBX gene or  
5 gene product so that symptoms of such disease or disorder are alleviated.

The invention provides for a method of diagnosing a disease or disorder associated with muscle atrophy comprising measuring MURF1, MURF3, or MAFBX gene expression in a patient or patient sample. For example, the invention comprises a  
0 method for detecting muscle atrophy in a mammal comprising a) administering to the mammal a composition which comprises a molecule capable of detecting MURF1, MURF3, or MAFBX nucleic acid or polypeptide coupled to an imaging agent; b) allowing the composition to accumulate in the muscle; and c) detecting the accumulated composition so as to detect the presence of MURF1, MURF3, or MA-16  
5 as an indication of muscle atrophy. Such molecules capable of binding or attaching to MURF1, MURF3, or MAFBX molecules may be, for example, chemicals, nucleic acids, polypeptides, or peptides. In addition, such diagnostics may measure gene expression by directly quantifying the amount of transcript or the amount of expression product. For example, the levels MURF1, MURF3, or MA-61, as well as  
0 the proteins encoded there for, may be measured. Such measurements may be made through the use of standard techniques known in the art including but not limited to PCR, Taqman PCR, Northern analysis, Western analysis, or immunohistochemistry.

WO 02/061046

PCT/US02/02811

The invention further comprises the methods described *supra* wherein the muscle cells are obtained from a transgenic organism or are within a transgenic organism, wherein the transgenic organism includes, but is not limited to, a mouse, rat, rabbit, sheep, cow or primate.

5

The invention further comprises a method of inhibiting atrophy in an animal having an atrophy-inducing condition comprising treating the mammal with an effective amount of an inhibitor of MURF1, MURF3, or MAFBX proteins or nucleic acids or treating the cells with an inhibitor of the MURF1, MURF3, or MAFBX pathway.

0

The invention additionally comprises a method of screening compounds useful for the treatment of muscle atrophy and related diseases and disorders comprising contacting a muscle cell expressing MURF1 with a compound and detecting a change in the MURF1, MURF3 OR MAFBX protein activity. The change may be measured by PCR, Taqman PCR, phage display systems, gel electrophoresis, yeast-two hybrid assay, Northern or Western analysis, immunohistochemistry, a conventional scintillation camera, a gamma camera, a rectilinear scanner, a PET scanner, a SPECT scanner, a MRI scanner, a NMR scanner, or an X-ray machine. The change in the MURF1, MURF3 OR MAFBX protein activity may also be detected by detecting a change in the interaction of the MURF1, MURF3 OR MAFBX with one or more proteins. This method may be used where the muscle cell is of skeletal origin, is a cultured cell, is obtained from or is within a transgenic organism such as for example a mouse, rat, rabbit, sheep, cow or primate. The change in protein expression may be demonstrated by a change in amount of protein of one or more of the proteins in the ubiquitin pathway.

5

The invention further comprises a method of inhibiting atrophy in an animal wherein the animal is treated prior to exposure to or onset of the atrophy-inducing condition. Such atrophy-inducing conditions may include immobilization, denervation, starvation, nutritional deficiency, metabolic stress, diabetes, aging, muscular dystrophy, or myopathy. In a preferred embodiment the atrophy inducing condition is immobilization, aging or bed rest. In a preferred embodiment, the atrophy inducing condition is cancer or AIDS.

0

WO 02/061046

PCT/US02/02811

The invention further comprises a method of causing muscle hypertrophy in skeletal muscle cells comprising treating the cells with an inhibitor of MURF1, MURF3, or MAFBX proteins or nucleic acids or treating the cells with an inhibitor of the MURF1, MURF3, or MAFBX pathway.

5

In embodiments of the invention that utilize a compound detection system, any detector known in the art, for example, PCR, Taqman PCR, Northern or Western analysis, immunohistochemistry, a conventional scintillation camera, a gamma camera, a rectilinear scanner, a PET scanner, a SPECT scanner, a MRI scanner, a NMR scanner, and an X-ray machine. In addition, any imaging agent known in the art may be employed, for example, a radionucleotide or a chelate.

0

The molecules capable of detecting MURF1, MURF3, or MAFBX may be nucleic acids and mRNA or a synthetic oligonucleotide or a synthetic polypeptide.

5

In a further embodiment of the invention, patients that suffer from an excess of MURF1, MURF3, or MAFBX may be treated by administering an effective amount of anti-sense RNA, anti-sense oligodeoxyribonucleotides, or RNAi, corresponding to MURF1, MURF3, or MAFBX gene coding region, thereby decreasing expression of MURF1, MURF3, and/or MA-61.

0

#### **BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES**

5 Figure 1: Schematic of MAFBX protein's association with components of the SCF complex.

Figure 2: Sequence comparison demonstrating F-box domain of MA-61.

0 Figure 3: Schematic of the human MAFBX protein structural domains.

Figure 4: Schematic of the human MURF1 protein structural domains.

WO 02/061046

PCT/US02/02811

Figures 5A-5B: Sequence comparison between MAFBX and Fbx25 showing broad homology.

Figure 6: Nucleotide sequence of rat MURF1.

5

Figure 7: Deduced amino acid sequence of rat MURF1.

Figure 8-8C: Nucleotide sequence of human MURF1.

0 Figure 9: Deduced amino acid sequence of human MURF1.

Figure 10: Nucleotide sequence of rat MAFBX.

Figure 11: Deduced amino acid sequence of rat MAFBX.

5

Figure 12: Nucleotide sequence of human MAFBX clone K8.

Figure 13: Deduced amino acid sequence of human MAFBX clone K8.

0 Figure 14: Sequence comparison demonstrating ring domain of MURF1.

Figure 15: Schematic of MURF1 protein's association with components of the ubiquitin ligase complex.

5 Figure 16: Nucleotide sequence of rat MURF1 VRV splice form.

Figure 17: Deduced amino acid sequence of rat MURF1 VRV splice form.

Figure 18: Nucleotide sequence of human MAFBX clone D18.

0

Figure 19: Deduced amino acid sequence of human MAFBX clone D18.

Figure 20: Sequence alignment of rMURF1 with hMURF3.

WO 02/061046

PCT/US02/02811

Figure 21: Nucleotide sequence of human MURF3 clone C8.

Figure 22: Deduced amino acid sequence of human MURF3 clone C8.

5 Figure 23: The differential display analysis of genes associated with atrophy.

Figure 24: Northern blots showing the effect of atrophy on expression of *muscle creatine kinase* (MCK), *myoD*, *myogenin* and *Myf5*.

0 Figures 25:A-25B (Figure 25A) An immunoblot using antibody raised against full-length rat MuRF1. (Figure 25B) Northern analysis of MuRF2 and MuRF3

Figure 26: Sequence alignment of rat and human MAFbx protein, and human Fbx25.

5 Figures 27A-27B: (Figures 27A-27BA) Schematic showing the portion of the MAFbx gene to be replaced with the LacZ/PGK neo. (Figures 27A-27BB) Schematic showing the portion of the MuRF1 gene to be replaced with the LacZ/PGK neo.

0 Figures 28A-28D (Figures 28A-28DA) A time course of rat medial gastrocnemius muscle mass loss was examined in three *in vivo* models: Denervation, Immobilization and Hindlimb Suspension.

(Figures 28A-28DB) Northern blots showing the effect of atrophy on *MuRF1* and *MAFbx* transcripts.

5 (Figures 28A-28DC) Northern blots showing the effect of dexamethasone (DEX) and Interleukin-1 (IL-1) on expression of *MuRF1* and *MAFbx*.

(Figures 28A-28DD) Tissue specific expression of *MuRF1* and *MAFbx*.

0 Figures 29A-29D: (Figures 29A-29DA) Co-precipitation: MAFbx, Cullin, Skp-1 (Figures 29A-29DB) Atrophy induced by over-expression of MAFbx. (Figures 29A-29DC) An immunoblot (I.B.) of lysates confirmed the presence of Myc-epitope tagged MAFbx protein in the myotubes infected with the MAFbx virus. (Figures 29A-29DD) Detection of <sup>32</sup>P-labelled high molecular weight ubiquitin conjugates.

WO 02/061046

PCT/US02/02811

- Figures 30A-30D: (Figures 30A-30DA) Confirmation of absence of targeted allele: MAFbx  
 (Figures 30A-30DB) Confirmation of absence of targeted allele: MAFbx  
 (Figures 30A-30DC) Confirmation of absence of targeted allele: MuRF1  
 5 (Figures 30A-30DD) Confirmation of absence of targeted allele: MuRF1
- Figures 31A-31C: (Figures 31A-31CA) B-gal staining of (*MAFbx* +/- and *MuRF1* +/- tissue in mice.  
 (Figures 31A-31CB) Muscle mass after denervation, as compared to wild type (+/+)  
 0 mice.  
 (Figures 31A-31CC) Muscle fiber size and variability in muscles from *MAFbx* deficient mice after denervation.
- Figure 32: Sequence alignment demonstrating that MAFbx protein is the same  
 5 protein as MA61, and the different names demonstrate a change in nomenclature.
- Figure 33: Sequence alignment demonstrating that MuRF1 protein is the same  
 protein as MA16, and the different names demonstrate a change in nomenclature.
- 0 Figure 34: Sequence alignment of rMA16 with hMURF1.

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

- The invention is based on the Applicant's discovery and characterization of the  
 5 molecules MURF1, MURF 3, and MA-61. MURF 1 AND MAFBX are expressed in both  
 rat and human adult heart and adult skeletal muscle and their expression is increased  
 under varying conditions of skeletal muscle atrophy. The present invention  
 provides for proteins and nucleic acids of novel human intracellular signaling  
 molecules termed human (h)MURF 1, human (h)MURF 3, and HUMAN MUSCLE  
 0 ATROPHY-61 (hMA-61) and proteins and nucleic acids of novel rat intracellular  
 signaling molecules termed RAT MURF1, RAT MURF 3, and RAT MUSCLE  
 ATROPHY-61 (rMA-61). Throughout this description, reference to MURF1, MURF 3,  
 or MAFBX proteins and nucleic acids includes, but is not limited to, the specific  
 embodiments of hMURF1, hMURF 3, hMA-61, rMURF1, rMURF 3 or

WO 02/061046

PCT/US02/02811

rMAFBXproteins and nucleic acids as described herein. The MURF1 and MURF 3 molecules contain a ring domain and MAFBXcontains an F-box motif. Both of these domains of the molecules facilitate interaction between the molecules, their substrate, and the ubiquitin ligase system.

5

The present invention relates to novel proteins involved in the ubiquitin pathway and the substrates thereof. The invention provides for novel nucleic acids and polypeptides that are involved in disorders of muscle growth, functioning and proliferation. These include MURF1, MURF 3, or MAFBXproteins or nucleic acids, or domains thereof, having such activity, for example, such as the F-box motif of MA-61, the ring domain of MURF1 or MURF 3, the portion of the MURF3 molecule that co-associates with the Syncoilin gene, and the Fbx25 homology domain of MA-61.

0

The invention includes MURF1, MURF3, and MAFBXnucleic acids, MURF1, MURF3 and MAFBXpolypeptides, derivatives and analogs thereof, as well as deletion mutants or various isoforms of the MURF1, MURF3, or MAFBXproteins or nucleic acids. They may be provided as fusion products, for example, with non-MURF1, MURF3, or MAFBXpolypeptides and nucleic acids. In addition, the MURF1, MURF3, and MAFBXnucleic acids and peptides may be associated with a host expression system.

5

0

The invention further provides for the use of the nucleotides encoding MURF1, MURF3, and MA-61, the proteins, peptides, antibodies to MURF1, MURF3, and MA-61, agonists and antagonists thereof. The invention relates to screening assays designed to identify the substrates of MURF1, MURF3, and MAFBXand/or molecules, which modulate the activity of the novel molecules MURF1, MURF3, and MAFBXindependently or in relation to the substrates thereof. In addition, the invention relates to the use of screening assays used to identify potential therapeutic agents which inhibit, block or ameliorate muscle atrophy and related diseases and disorders.

5

0

WO 02/061046

PCT/US02/02811

**Genes**

The invention provides for the nucleic acid molecules, which encode MURF1, MURF3, or MA-61. The invention includes the nucleic acid sequences encoding polypeptides or peptides which correspond to MURF1, MURF3 and MAFBX gene products, including the functional domains of MURF1, MURF3 and MA-61, such as for example the F-box motif of MA-61, the ring domain of MURF1 or MURF3, the portion of the MURF3 molecule that co-associates with the Syncoilin gene, and the Fbx25 homology domain of MA-61, or derivatives, fragments, or domains thereof, mutated, truncated or deletion forms thereof, and host cell expression systems incorporating or producing any of the aforementioned.

The invention includes the nucleic acid molecules containing the DNA sequences in Figures 6, 8(a-c), 10, 12, 16, 18, and 21; any DNA sequence that encodes a polypeptide containing the amino acid sequence of Figures 7, 9, 11, 13, 17, and 19; any nucleotide sequence that hybridizes to the complement of the nucleotide sequences that encode the amino acid sequence of Figures 6, 8(a-c), 10, 12, 16, 18, and 21 under stringent or highly stringent conditions, and/or any nucleotide sequence that hybridizes to the complement of the nucleotide sequence that encodes the amino acid sequence of Figures 7, 9, 11, 13, 17, 19, and 22 under less stringent conditions.

In a specific embodiment, the nucleotide sequences of the present invention encompass any nucleotide sequence derived from a mammalian genome which hybridizes under stringent conditions to Figures 10, 12, and 18 and encodes a gene product which contains either an F-box motif and is at least 47 nucleotides in length.

The invention includes nucleic acid molecules and proteins derived from mammalian sources. The nucleic acid sequences may include genomic DNA, cDNA, or a synthetic DNA. When referring to a nucleic acid that encodes a particular amino acid sequence, it should be understood that the nucleic acid may be a cDNA sequence from which an mRNA species is transcribed that is processed to encode a particular amino acid sequence.

WO 02/061046

PCT/US02/02811

The invention also includes vectors and host cells that contain any of the disclosed sequences and/or their complements, which may be linked to regulatory elements. Such regulatory elements may include but are not limited to promoters, enhancers, operators and other elements known to those skilled in the art to drive or regulate expression, for example CMV, SV40, MCK, HSA, and adeno promoters, the lac system, the trp system, the TRC system, promoters and operators of phage A.

The invention further includes fragments of any of the nucleic acid sequences disclosed herein and the gene sequences encoding MURF1, MURF3, and MAFBX gene products that have greater than about 50% amino acid identity with the disclosed sequences.

In specific embodiments, the invention provides for nucleotide fragments of the nucleic sequences encoding MURF1, MURF3, and MAFBX (Figures 6, 8(a-c), 10, 12, 16, 18, and 21). Such fragments consist of at least 8 nucleotides (i.e. hybridization portion) of an MURF1, MURF3, or MAFBX gene sequence; in other embodiments, the nucleic acids consists of at least 25 continuous nucleotides, 50 nucleotides, 100 nucleotides, 150 nucleotides, 150 nucleotides, or 200 nucleotides of an MURF1, MURF3, or MAFBX sequence. In another embodiment the nucleic acids are smaller than 47 nucleotides in length. The invention also relates to nucleic acids hybridizable or complementary to the foregoing sequences. All sequences may be single or double stranded. In addition, the nucleotide sequences of the invention may include nucleotide sequences that encode polypeptides having at least 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, or higher amino acid sequence identity to the polypeptides encoded by the MURF1, MURF3, or MAFBX sequences of Figures 7, 9, 11, 13, 17, and 19.

One embodiment of the invention is a recombinant nucleic acid encoding MURF1, MURF3, or MAFBX polypeptide which corresponds to the amino acid sequence as set forth herein in Figures 7, 9, 11, 13, 17, and 19 or a fragment thereof having MURF1, MURF3, or MA-61-specific activity or expression level.

Still another embodiment is an isolated nucleic acid comprising a nucleotide sequence as set forth herein in Figures 6, 8(a-c), 10, 12, 16, 18, and 21 or a fragment thereof

WO 02/061046

PCT/US02/02811

having at least 18 consecutive bases and which can specifically hybridize with the complement of a nucleic acid having the sequence of native MURF1 or MAFBX.

Further, the sequence of the disclosed MURF1, MURF3, or MAFBX nucleic acids may be optimized for selected expression systems (Holler, et al., (1993) Gene 136:323-328; Martin, et al., (1995) Gene 154:150-166) or used to generate degenerate oligonucleotide primers and probes for use in the isolation of natural MURF1, MURF3, or MAFBX encoding nucleic acid sequences ("GCG" software, Genetics Computer Group, Inc., Madison, WI). MURF1, MURF3, or MAFBX encoding nucleic acids may be part of expression vectors and may be incorporated into recombinant host cells, e.g., for expression and screening, for transgenic animals, or for functional studies such as the efficacy of candidate drugs for diseases associated with MURF1 or MA-61-mediated cellular activity or MURF1, MURF3, or MAFBX mRNA and/or protein expression. Expression systems are selected and/or tailored to effect MURF1, MURF3, or MAFBX polypeptide structural and functional variants through alternative post-translational processing.

The claimed MURF1, MURF3, or MAFBX nucleic acids may be isolated or pure, and/or are non-natural. A "pure" nucleic acid constitutes at least about 90%, and preferably at least about 99% by weight of the total nucleic acid in a given sample. A "non-natural" nucleic acid is one that has been manipulated to such an extent that it may not be considered a product of nature. One example of a non-natural nucleic acid is one produced through recombinant techniques known in the art. The subject nucleic acids may be synthesized, produced by recombinant technology, or purified from cells. Nucleic acids comprising the nucleotide sequence disclosed herein and fragments thereof, may contain such sequences or fragments at a terminus, immediately flanked by a sequence other than that to which it is joined on a natural chromosome, or flanked by a native flanking region fewer than 10 kb, preferably fewer than 2 kb, which is immediately flanked by a sequence other than that to which it is joined on a natural chromosome. While the nucleic acids are usually the RNA or DNA sequences, it is often advantageous to use nucleic acids comprising other bases or nucleotide analogs to provide, example, modified stability.

WO 02/061046

PCT/US02/02811

The invention provides a wide variety of applications for MURF1, MURF3, or MAFBXnucleic acids including but not limited to identifying and studying molecules, agents and drugs that modulate muscle atrophy, ubiquitination, or the expression or activity of MURF1, MURF3, and MAFBXnucleic acids or polypeptides themselves; as  
5 markers of muscle atrophy or ubiquitination; as markers for the prevention or reduction of muscle atrophy or ubiquitination; identifying and studying molecules, agents and drugs that modulate muscle dystrophy; as markers of muscle dystrophy; as markers for the prevention or reduction of muscle dystrophy; as translatable  
0 transcripts, hybridization probes, PCR primers, or diagnostic nucleic acids, imaging agents; detecting the presence of MURF1, MURF3, or MAFBXgenes and gene transcripts; and detecting or amplifying nucleic acids encoding additional MURF1, MURF3, or MAFBXhomologs and structural analogs.

Novel agents that bind to or modulate the expression of MURF1, MURF3, or  
5 MAFBXmRNA described herein may prevent muscle atrophy in cells expressing MURF1, MURF3, or MAFBXmRNA. Novel agents that bind to or modulate the activity of MURF1, MURF3, or MA-61-mediated ubiquitination described herein may prevent muscle atrophy in cells containing either the MURF1, MURF3, or  
0 MAFBXproteins. Drugs or agents which inhibit the expression of MAFBXmRNA,, or the activity of MAFBXproteins, or inhibit the MA61 pathway, are predicted to decrease specific SCF E3 ubiquitin ligase-mediated ubiquitination of protein targets. Drugs or agents which inhibit the expression of MURF1, MURF3, mRNA,, or the activity of MURF1 or MURF3 proteins, or inhibit the MURF1 or MuRF3 pathway,  
5 are predicted to decrease specific ring-domain-mediated ubiquitination of protein targets. Rugs or agents which inhibit the expression of MA61 mRNA or the activity of MAFbx proteins are predicted to decrease F-box mediated ubiquitination of protein targets. Dominant negative, inhibitory forms of MURF1, MURF3, or MAFBXcDNA or genomic DNA may be used in gene therapy to block skeletal muscle atrophy. Dominant negative inhibitory forms of MURF1, MURF3, or  
0 MAFBXcDNA or genomic DNA, in which either the F-box domain or the Fbx25 homology domain of MA-61, or the ring domain of MURF1 or MURF3 are expressed alone, may also be used in gene therapy to block skeletal muscle atrophy.

WO 02/061046

PCT/US02/02811

The invention additionally encompasses antibodies, antagonists, agonists, compounds, or nucleotide constructs that inhibit expression of the MURF1, MURF3, and MAFBX genes (including for example transcription factor inhibitors, antisense and ribozyme molecules, and gene or regulatory sequence replacement constructs) or that promote expression of dominant-negative forms of MURF1, MURF3, or MAFBX (including for example expression constructs in which the coding sequences are operatively linked with expression control elements).

The invention provides for the detection of nucleic acids encoding MURF1, MURF3, and MA-61. This may be done through the use of nucleic acid hybridization probes and replication/amplification primers having a MURF1, MURF3, or MAFBXcDNA-specific sequence and sufficient to effect specific hybridization with Figures 6, 8(a-c), 10, 12, 16, 18, and 21. Demonstrating specific hybridization generally requires stringent conditions, for example, hybridizing in a buffer comprising 30% formamide in 5 x SSPE (0.18 M NaCl, 0.01 M NaPO<sub>4</sub>, pH 7.7, 0.001 M EDTA) buffer at a temperature of 42°C and remaining bound when subject to washing at 42°C with 0.2 x SSPE; preferably hybridizing in a buffer comprising 50% formamide in 5 x SSPE buffer at a temperature of 42°C and remaining bound when subject to washing at 42°C with 0.2 x SSPE buffer at 42°C., or most preferably hybridizing in a buffer comprising 20% SDS, 10% BSA, 1M NaPO<sub>4</sub>, .5M EDTA, pH 8 at a temperature of 60°C and remaining bound when subject to washing at 65°C with 2x SSC, .1% SDS. MURF1 or MAFBXcDNA homologs can also be distinguished from one another using alignment algorithms, such as BLASTX (Altschul, et al., (1990) Basic Local Alignment Search Tool, J. Mol. Biol. 215:403-410).

Also encompassed is the use of the disclosed sequences to identify and isolate gene sequences present at the same genetic or physical location as the sequences herein disclosed, and such sequences can, for example, be obtained through standard sequencing and bacterial artificial chromosome (BAC) technologies. Also encompassed is the use of the disclosed sequences to clone gene homologues in human or other species. To do so, the disclosed sequences may be labeled and used to screen a cDNA or genomic library. The level of stringency required will depend on the source of the DNA used. Thus low stringency conditions may be appropriate

WO 02/061046

PCT/US02/02811

in certain circumstances, and such techniques are well known in the art. (See e.g. Sambrook, et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Press, N.Y.) In addition, a MURF1, MURF3, or MAFBXhomologue may be isolated with PCR by using two degenerate  
5 oligonucleotide primer pools designed using the sequences disclosed herein. The identified fragment may then be further used to isolate a full length clone by various techniques known in the art, including the screening of a cDNA or genomic library. In addition, PCR may be used to directly identify full length cDNA sequences (see e.g. Sambrook et al, *supra*). The disclosed sequences may also be used to identify  
0 mutant MURF1, MURF3, and MAFBXalleles. Mutant alleles are used to generate allele-specific oligonucleotide (ASO) probes for high-throughput clinical diagnoses. MURF1, MURF3, and MAFBXalleles may be identified by a number of techniques known in the art including but not limited to single strand conformation polymorphism (SSCP) mutation detection techniques, Southern blotting, and/or  
5 PCR amplification techniques.

MURF1, MURF3, or MAFBXnucleic acids are also used to modulate cellular expression or intracellular concentration or availability of MURF1, MURF3, or MAFBXpolypeptides. MURF1, MURF3, or MAFBXinhibitory nucleic acids are  
0 typically antisense - single stranded sequences comprising complements of the disclosed MURF1, MURF3, or MAFBXcoding sequences. Antisense modulation of the expression of a given MURF1, MURF3, or MAFBXpolypeptide may employ antisense nucleic acids operably linked to gene regulatory sequences. Cells are transfected with a vector comprising a MURF1, MURF3, or MAFBXsequence with a  
5 promoter sequence oriented such that transcription of the gene yields an antisense transcript capable of binding to endogenous MURF1, MURF3, or MAFBXencoding mRNA. Transcription of the antisense nucleic acid may be constitutive or inducible and the vector may provide for stable extrachromosomal maintenance or integration. Alternatively, single-stranded antisense nucleic acids that bind to  
0 genomic DNA or mRNA encoding a given MURF1, MURF3, or MAFBXpolypeptide may be administered to the target cell at a concentration that results in a substantial reduction in expression of the targeted polypeptide. An enhancement in MURF1, MURF3, or MAFBXexpression or activity is effected by introducing into the targeted cell type MURF1, MURF3, or MAFBXnucleic acids which increase the functional

WO 02/061046

PCT/US02/02811

expression of the corresponding gene products. Such nucleic acids may be MURF1, MURF3, or MAFBX expression vectors, vectors which upregulate the functional expression of an endogenous allele, or replacement vectors for targeted correction of mutant alleles. Techniques for introducing the nucleic acids into viable cells are known in the art and include, but are not limited to, retroviral-based transfection or viral coat protein-liposome mediated transfection.

#### Proteins and peptides

The invention provides for polypeptides or peptides which correspond to MURF1, MURF3, and MAFBX gene products, including the functional domains of MURF1, MURF3, and MA-61, such as for example the F-box motif of MA-61, the ring domain of MURF1 or MURF3, the portion of the MURF3 molecule that co-associates with the Syncoilin gene, and the Fbx25 homology domain of MA-61, or derivatives, fragments, or domains thereof, mutated, truncated or deletion forms thereof, fusion proteins thereof, and host cell expression systems incorporating or producing any of the aforementioned.

One embodiment of the invention is an isolated MURF1, MURF3 or MAFBX polypeptide comprising the amino acid sequence as set forth herein in Figures 7, 9, 17, 11, 13, 19, and 22, or a fragment thereof having MURF1, MURF3 or MA-61-specific activity or expression levels.

The sequences of the disclosed MURF1, MURF3, or MAFBX polypeptide sequences are deduced from the MURF1, MURF3, or MAFBX nucleic acids. The claimed MURF1, MURF3, or MAFBX polypeptides may be isolated or pure, and /or are non-natural. An "isolated" polypeptide is one that is no longer accompanied by some of the material with which it is associated in its natural state, and that preferably constitutes at least about 0.5%, and more preferably at least about 5% by weight of the total polypeptide in a given sample. A "pure" polypeptide constitutes at least about 90%, and preferably at least about 99% by weight of the total polypeptide in a given sample. The subject polypeptides may be synthesized, produced by recombinant technology, or purified from cells. A "non-natural" polypeptide is one that has been manipulated to such an extent that it may no longer be considered a

WO 02/061046

PCT/US02/02811

product of nature. One example of a non-natural polypeptide is one produced through recombinant techniques known in the art. A wide variety of molecular and biochemical methods are available for biochemical synthesis, molecular expression and purification of the subject compositions (see e.g., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY; *Current Protocols in Molecular Biology* (Eds. Ausubel, et al., Greene Publ. Assoc., Wiley-Interscience, NY).

The invention also provides for the use of polypeptides or peptides which correspond to functional domains of MURF1, MURF3, and MA-61, such as for example the F-box motif of MA-61, the ring domain of MURF1 or MURF3, the portion of the MURF3 molecule that co-associates with the Syncoilin gene, and the Fbx25 homology domain of MA-61, or derivatives, fragments, or domains thereof, mutated, truncated or deletion forms thereof, fusion proteins thereof, and host cell expression systems incorporating or producing any of the aforementioned to screen or agents that interact with or modify any of these molecules, muscle atrophy and related disorders and diseases. The screening of molecules may be accomplished by any number of methods known in the art including but are not limited to immunoprecipitation, size fractionization, Western blot, and gel electrophoresis. Preferably the method of screening is a yeast two-hybrid system, or any variation thereof. The invention encompasses both in vitro and in vivo tests, which may screen small molecules, large molecules, compounds, recombinant proteins, peptides, nucleic acids and antibodies.

A number of applications for MURF1, MURF3 or MAFBX polypeptides, or peptide fragments, are suggested from their properties. They may be useful for identifying and studying molecules, agents and drugs that modulate muscle atrophy, muscle dystrophy, ubiquitination, or the expression or activity of MURF1, MURF3 and MAFBX themselves. They may be useful as markers of muscle atrophy, muscle dystrophy, or ubiquitination, and as markers for the prevention or reduction of muscle atrophy, muscle dystrophy, or ubiquitination. They may be used for the generation of antibodies as well.

WO 02/061046

PCT/US02/02811

In addition, these disclosed polypeptides and nucleic acids may be useful in inhibiting muscle atrophy, muscle dystrophy, the MURF1, MURF3, and MAFBX pathway, or ubiquitination. In addition, they may be useful in treating conditions associated with muscle atrophy, muscle dystrophy, or increased ubiquitination. MURF1, MURF3 or MAFBX polypeptides may be useful in the study, treatment or diagnosis of conditions similar to those which are treated using growth factors, cytokines and/or hormones. Functionally equivalent MURF1, MURF3 and MAFBX gene products may contain deletions, additions, and/or substitutions. Such changes may result in no functional change in the gene product, or the gene product may be engineered to product alterations in the gene product. Such gene products may be produced by recombinant technology through techniques known in the art, such as in vitro recombinant DNA techniques, synthetic techniques, and in vivo genetic recombination (see e.g. Sambrook, et al., *supra*). In addition, RNA which encodes such gene products may be synthesized chemical using techniques known in the art (see, e.g. "Oligonucleotide Synthesis", 1984 Gait, ed., IRL Press, Oxford.)

#### Antibodies

The present invention also provides for antibodies to the MURF1, MURF3 or MAFBX polypeptides described herein which are useful for detection of the polypeptides in, for example, diagnostic applications. For preparation of monoclonal antibodies directed toward MURF1, MURF3 or MAFBX polypeptides, any technique which provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture may be used. For example, the hybridoma technique originally developed by Kohler and Milstein (1975, *Nature* 256:495-497), as well as the trioma technique, the human B-cell hybridoma technique (Kozbor et al., 1983, *Immunology Today* 4:72), and the EBV-hybridoma technique to produce human monoclonal antibodies (Cole et al., 1985, in "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96) and the like are within the scope of the present invention.

The monoclonal antibodies for diagnostic or therapeutic use may be human monoclonal antibodies or chimeric human-mouse (or other species) monoclonal antibodies. Human monoclonal antibodies may be made by any of numerous techniques known in the art (e.g., Teng et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*

WO 02/061046

PCT/US02/02811

80:7308-7312; Kozbor et al., 1983, Immunology Today 4:72-79; Olsson et al., 1982, Meth. Enzymol. 92:3-16). Chimeric antibody molecules may be prepared containing a mouse antigen-binding domain with human constant regions (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81:6851, Takeda et al., 1985, Nature 314:452).

5 Various procedures known in the art may be used for the production of polyclonal antibodies to the MURF1, MURF3 or MAFBX polypeptides described herein. For the production of antibody, various host animals can be immunized by injection with the MURF1, MURF3, or MAFBX polypeptides, or fragments or derivatives thereof, including but not limited to rabbits, mice and rats. Various adjuvants may be used to increase the immunological response, depending on the host species, including but not limited to Freund's (complete and incomplete), mineral gels such as aluminum hydroxide, surface active substances such as lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, polypeptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanins, dinitrophenol, and potentially useful human adjuvants such as BCG (Bacille Calmette-Guerin) and Corynebacterium parvum.

0 A molecular clone of an antibody to a selected MURF1, MURF3, or MAFBX polypeptide epitope can be prepared by known techniques. Recombinant DNA methodology (see e.g., Maniatis et al., 1982, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) may be used to construct nucleic acid sequences which encode a monoclonal antibody molecule, or antigen binding region thereof.

5 The present invention provides for antibody molecules as well as fragments of such antibody molecules. Antibody fragments which contain the idiotype of the molecule can be generated by known techniques. For example, such fragments include, but are not limited to, the F(ab')<sub>2</sub> fragment which can be produced by pepsin digestion of the antibody molecule; the Fab' fragments which can be generated by reducing the disulfide bridges of the F(ab')<sub>2</sub> fragment, and the Fab fragments which can be generated by treating the antibody molecule with papain and a reducing agent. Antibody molecules may be purified by known techniques including, but not limited to, immunoabsorption or immunoaffinity chromatography, chromatographic

WO 02/061046

PCT/US02/02811

methods such as HPLC (high performance liquid chromatography), or a combination thereof.

5 The invention also provides for single chain Fvs. A single chain Fv (scFv) is a truncated Fab having only the V region of a heavy chain linked by a stretch of synthetic peptide to a V region of a light chain. See, for example, US Patent Nos. 5,565,332; 5,733,743; 5,837,242; 5,858,657; and 5,871,907 assigned to Cambridge Antibody Technology Limited incorporated by reference herein.

0 **Assays**

The subject MURF1, MURF3 and MAFBXnucleic acids, polypeptides, and antibodies which bind MURF1, MURF3, and MAFBXpolypeptides find a wide variety of uses including but not limited to use as immunogens; targets in screening assays; and bioactive reagents for modulating, preventing, detecting or measuring muscle atrophy or ubiquitination. The molecules listed *supra* may be introduced, expressed, or repressed in specific populations of cells by any convenient way, including but not limited to, microinjection, promoter-specific expression of recombinant protein or targeted delivery via lipid vesicles.

0 One aspect of this invention provides methods for assaying and screening for substrates, and fragments, derivatives and analogs thereof, of MURF1, MURF3 and MAFBXgenes and gene products and to identify agents that interact with MURF1, MURF3, and MAFBXgenes and gene products. The invention also provides screening assays to identify compounds that modulate or inhibit the interaction of MURF1, MURF3 and MAFBXgenes and gene products with their substrates and/or subunits of the ubiquitin ligase complex. The screening assays of the present invention also encompass high-throughput screening assays to identify modulators of MURF1, MURF3, and MAFBXgene and gene product expression and activity.

5

0 Such assays may identify agonists or antagonists of the MURF1, MURF3 or MAFBXgene products.

The invention provides screening methods for identification of agents that bind to or directly interact with MURF1, MURF3, and MAFBXgenes and gene products. Such

WO 02/061046

PCT/US02/02811

screening methodologies are well known in the art (see, e.g. PCT International Publication No. WO 96/34099, published October 31, 1996). The agents include both endogenous and exogenous cellular components. These assays may be performed in vitro, or in intact cells in culture or in animal models.

5

In a preferred embodiment, a yeast two hybrid assay system is used to determine substrates, and fragments, derivatives and analogs thereof, of MURF1, MURF3, and MAFBX genes and to identify agents that interact with MURF1, MURF3 and MAFBX gene products (Fields and Song, 1989, Nature 340:245-246 and U.S. Patent No. 5,283,173). The system is based on the detection of expression of a reporter gene, the transcription of which is dependent on the reconstitution of a transcriptional regulator by the interaction of two proteins, each fused to one half of the transcriptional regulator. MURF1, MURF3, and MAFBX proteins or derivatives thereof and the proteins to be tested are expressed as fusion proteins to a DNA binding domain, and to a transcriptional regulatory domain.

5

The invention provides MURF1, MURF3 or MA-61-specific binding agents, methods of identifying and making such agents, and their use in diagnosis, therapy and pharmaceutical development. MURF1, MURF3, or MA-61-specific binding agents include MURF1, MURF3 or MA-61-specific antibodies and also includes other binding agents identified with assays such as one-, two- and three-hybrid screens, and non-natural binding agents identified in screens of chemical libraries such as described below (see, e.g., Harlow and Lane (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, for a discussion of manufacturing and using antibodies). Agents of particular interest modulate MURF1, MURF3 or MAFBX mRNA or polypeptide function, activity or expression.

5

The invention provides efficient methods of identifying agents, compounds or lead compounds for agents active at the level of MURF1, MURF3 or MAFBX modulatable cellular function or mRNA or polypeptide expression. Generally, these screening methods involve assaying for compounds which modulate the interaction of MURF1, MURF3 or MAFBX polypeptide or nucleic acid with a natural MURF1, MURF3 or MAFBX binding target or assaying for compounds which modulate the expression of MURF1, MURF3 or MAFBX mRNA or polypeptide. A wide variety of

0

WO 02/061046

PCT/US02/02811

assays for binding agents or agents that modulate expression are provided including, but not limited to, protein-protein binding assays, immunoassays, or cell based assays. Preferred methods are amenable to automated, cost-effective, high throughput screening of chemical libraries for lead compounds.

5 In vitro binding assays employ a mixture of components including a MURF1, MURF3, or MAFBX polypeptide, which may be part of a fusion product with another peptide or polypeptide, e.g. a tag for detection or anchoring. The assay mixtures  
0 comprise a natural MURF1 or MAFBX binding target. While native binding targets may be used, it is frequently preferred to use portions thereof as long as the portion provides binding affinity and avidity to the subject MURF1, MURF3 or MAFBX conveniently measurable in the assay. The assay mixture also comprises a candidate pharmacological agent. Candidate agents encompass numerous chemical classes, though typically they are organic compounds, preferably small organic  
5 compounds, and are obtained from a wide variety of sources including libraries of synthetic or natural compounds. A variety of other reagents such as salts, buffers, neutral proteins, (e.g., albumin,) detergents, protease inhibitors, nuclease inhibitors, or antimicrobial agents may also be included. The mixture components can be added in any order that provides for the requisite bindings and incubations may be  
0 performed at any temperature which facilitates optimal binding. The mixture is incubated under conditions whereby, but for the presence of the candidate pharmacological agent, the MURF1, MURF3 or MAFBX polypeptide specifically binds the binding target, portion or analog with a reference binding affinity. Incubation periods are chosen for optimal binding but are also minimized to facilitate rapid,  
5 high throughput screening.

After incubation, the agent-based binding between the MURF1, MURF3 or MAFBX polypeptide and one or more binding targets is detected by any convenient way. For cell-free binding type assays, a separation step is often used to separate  
0 bound from unbound components. Separation may be effected by any number of methods that include, but are not limited to, precipitation or immobilization followed by washing by, e.g., membrane filtration or gel chromatography. For cell-free binding assays, one of the components usually comprises or is coupled to a label. The label may provide for direct detection as radioactivity, luminescence,

WO 02/061046

PCT/US02/02811

optical or electron density, or indirect detection such as an epitope tag or an enzyme. A variety of methods may be used to detect the label depending on the nature of the label and other assay components, including but not limited to, through optical or electron density, radiative emissions, nonradiative energy transfers, or indirectly detected with, as a nonlimiting example, antibody conjugates. A difference in the binding affinity of the MURF1, MURF3 or MAFBX polypeptide to the target in the absence of the agent as compared with the binding affinity in the presence of the agent indicates that the agent modulates the binding of the MURF1, MURF3 or MAFBX polypeptide to the corresponding binding target. A difference, as used herein, is statistically significant and preferably represents at least a 50%, more preferably at least a 90% difference.

The invention further provides for a method for screening for agents useful in the treatment of a disease or disorder associated with muscle atrophy comprising contacting a cell expressing MURF1, MURF3 or MAFBX having the amino acid sequence of Figures 7, 9, 17, 11, 13, 19, and 22, respectively, or a fragment thereof, and its substrate, with a compound and detecting a change in the activity of either MURF1, MURF3 or MAFBX gene products. Such change in activity may be manifest by a change in the interaction of MURF1, MURF3 or MAFBX gene products with one or more proteins, such as one of their substrates or a component of the ubiquitin pathway, or by a change in the ubiquitination or degradation of the substrate.

MURF1, MURF3 or MA-61-specific activity, function or expression may be determined by convenient *in vitro*, cell based or *in vivo* assays. *In vitro* or cell based assays include but are not limited to binding assays and cell culture assays and ubiquitination assays. *In vivo* assays include but are not limited to immune response, gene therapy and transgenic animals and animals undergoing atrophy. Binding assays encompass any assay where the specific molecular interaction of MURF1, MURF3 or MAFBX polypeptide with a binding target is evaluated or where the mRNA or protein expression level or activity of MURF1, MURF3, or MAFBX is evaluated or the binding or ubiquitination of a substrate is evaluated. The binding target may be, for example, a phosphorylated protein, a specific immune polypeptide such as an antibody, or a MURF1, MURF3 or MA-61-nucleic acid-specific binding agent, such as, for example, and anti-sense oligonucleotide. Potential

WO 02/061046

PCT/US02/02811

binding targets for MURF1, MURF3 and MAFBX nucleic acids and polypeptides include other known members of the SCF E3 ubiquitin ligase complex and the dystrophin protein complex. For example, it is known that other F-box containing proteins bind to a protein called Cullin-1, or a family member of the Cullin family, such as Cullin-2, Cullin-3, Cullin-4a, Cullin-4b or Cullin-5 (Lisztwan J, Marti A, Sutterluty H, Gstaiger M, and Wirbelauer C, Krek W, 1998 EMBO 17(2):368-83; Lyapina SA, Correll CC, Kipreos ET, Deshaies RJ., 1998 Proc Natl Acad Sci USA 95(13):7451-6.) Therefore, one potential assay would be to see if a test compound could disrupt binding of MAFBX to a Cullin family member. Also, F-box proteins which are part of SCF E3 ubiquitin ligase complexes are known to bind Skp-1, or Skp-1 family members (Skowyra, et al, 1997, Cell 91:209-219). Therefore, a potential assay would be to determine if a test compound could disrupt binding of MAFBX to Skp-1 or a Skp-1 family member. Further, F-box proteins which are part of SCF E3 ubiquitin ligase complex bind phosphorylated substrates, which are then ubiquitinated. (Skowyra, et al, 1997, Cell 91:209-219). So, in a featured embodiment of this invention, a potential assay would be to determine if a test compound could disrupt binding of MAFBX protein to a phosphorylated substrate, or to determine if a test compound could decrease MA-61-mediated ubiquitination of a phosphorylated substrate.

The finding that MURF3 protein associates with a member of the dystrophin complex suggests that inhibition of MURF3 protein or nucleic acids could stabilize the complex, thus helping to treat muscular dystrophy, and other conditions in which the dystrophin complex is subjected to ubiquitin-mediated degradation. Thus another embodiment of this invention is the use of MURF1, MURF3 or MA-61 or other molecules involved in their pathways, and especially inhibitors thereof, in the inhibition of the MURF1, MURF3, or MAFBX pathway or treatment of muscular dystrophy and symptoms, conditions and diseases associated with defects in the neuromuscular junction.

The MURF1, MURF3 or MAFBX cDNAs, or antibodies which recognize MURF1, MURF3 or MAFBX polypeptides, may be useful as diagnostic tools, such as through the use of oligonucleotides as primers in a PCR test to amplify those sequences having similarities to the oligonucleotide primer, and to see how much MURF1,

WO 02/061046

PCT/US02/02811

MURF3 or MAFBXmRNA is present in a particular tissue or sample under normal and non-normal, for example, atrophying conditions, or determination of up-regulation of MURF1, MURF3 or MAFBXproteins, by immunostaining with antibodies, or by an ELISA test with antibodies. The isolation of MURF1, MURF3 or MAFBXprovides the key to studying their properties and designing assays for agents that interact with or alter the expression or activity of these molecules, or their pathway. The isolation of MURF1, MURF3 or MAFBXalso provides the key to developing treatments for conditions in which MURF1, MURF3 or MAFBXexpression or activity is disrupted.

The invention also provides for a method of diagnosing a disease or disorder associated with muscle atrophy comprising measuring MURF1, MURF3, or MAFBXgene expression in a patient sample. For example, the invention comprises a method for detecting muscle atrophy in a mammal comprising a) administering to the mammal a composition which comprises a molecule capable of detecting MURF1, MURF3 or MAFBXnucleic acid or polypeptide coupled to an imaging agent; b) allowing the composition to accumulate in the muscle; and c) detecting the accumulated composition so as to image the muscle atrophy. In addition, MURF1, MURF3, and MAFBXcould be detected using mRNA or protein obtained from a subject and using standard methodology such as PCRT, Northern analysis, Western analysis, ELISA, or immunostaining.

Suitable imaging agents that can be coupled to MURF1, MURF3 or MAFBXnucleic acid or polypeptide for use in detection include, but are not limited to, agents useful in magnetic resonance imaging (MRI) such as gadolinium chelates (see for example Ladd, DL, et al., 1999, Bioconjug Chem 10:361-370), covalently linked nonionic, macrocyclic, multimeric lanthanide chelates (see for example Ranganathan, RS, et al., 1998, Invest Radiol 33:779-797), and monoclonal antibody-coated magnetite particles (see To, SY, et al., 1992, J Clin Laser Med Surg 10:159-169). For reviews relating to basic principles of MRI see Kirsch, JE, 1991, Top Magn Reson Imaging 3:1-18 and Wallis, F and Gilbert, FJ, 1999, J R Coll Surg Edinb 44:117-125. Radionucleotides are also suitable imaging agents for use in nuclear medicine techniques such as positron emission tomography (PET), single positron emission computed tomography (SPECT), and computerized axial tomography (CAT) scans. By way of non-limiting

WO 02/061046

PCT/US02/02811

example, such agents include technetium 99m, gallium 67 citrate, iodine 123 and indium 111 (see Coleman, RE, 1991, Cancer 67:1261-1270). Other radionucleotides suitable as imaging agents include <sup>123</sup>I and <sup>111</sup>In-DTPA (see Kaltsas, GA, et al., 1998, Clin Endocrinol (Oxf) 49:685-689), radiolabeled antibodies (see Goldenberg, DM and Nabi, HA, 1999, Semin Nucl Med 29:41-48 and Steffens, MC, et al., 1999, J Nucl Med 40:829-836). For reviews relating to basic principles of radionuclear medicine techniques, see Schiepers, C. And Hoh, CK, 1998, Eur Radiol 8:1481-1494 and Ferrand, SK, et al., 1999, Surg Oncol Clin N Am 8:185-204. Any imaging agent may be utilized, including, for example, a radionucleotide or a chelate.

The disclosed methods may be applicable in vivo or in vitro, and the cells may include, for example, cultured muscle cells, myoblasts, C2C12 cells, differentiated myoblasts, or myotubes.

The invention also provides for a method of treating a disease or disorder in an animal associated with muscle atrophy comprising administering to the animal a compound that modulates the synthesis, expression or activity of the MURF1, MURF3 or MAFBX gene or gene product so that symptoms of such disease or disorder are alleviated.

(For a detailed explanation of other assays and methodologies for use of the invention herein described, see also PCT International Publication No. WO 00/12679, published March 9, 2000, which is incorporated by reference herein in its entirety).

The invention also relates to host cells and animals genetically engineered to express MURF1, MURF3 or MAFBX polypeptides or peptides which correspond to functional domains of MURF1, MURF3 and MA-61, such as for example the F-box motif of MA-61, the ring domain of MURF1 or MURF3, the portion of the MURF3 molecule that co-associates with the Syncoilin gene, and the Fbx25 homology domain of MA-61, or derivatives, fragments, or domains thereof, mutated, truncated or deletion forms thereof, fusion proteins thereof, and host cell expression systems incorporating or producing any of the aforementioned, as well as host cells and animals genetically engineered to inhibit or "knock-out" expression of the same. Animals of any species, including but not limited to mice, rats, rabbits, guinea pigs, pigs, goats,

WO 02/061046

PCT/US02/02811

- sheep, and non-human primates, may be used to generate transgenic animals and their progeny, wherein "transgenic" means expressing gene sequences from another source, for example another species, as well as over-expressing endogenous MURF1, MURF3 or MAFBX sequences, or non-expression of an endogenous gene sequence ("knock out"). Any technique known in the art may be used to introduce an MURF1 or MAFBX transgene into an animal to produce a founder line of transgenic animals, including pronuclear injection (Hoppe and Wagner, 1989, U.S. Pat No. 4,873, 191); retroviral mediated gene transfer into germ lines (Van der Putten, et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82, 6148-6152); gene targeting in embryonic stem cells (Thompson, et al., 1989, Cell 56, 313-321); electroporation or embryos (Lo, 1983, Mol. Cell Biol. 3, 1803-1814); and sperm mediated gene transfer (Lavitrano et al., 1989, Cell 57, 717-723). In addition, any technique may be used to produce transgenic animal clones containing a MURF1, MURF3 or MAFBX transgene, for example nuclear transfer into enucleated oocytes of nuclei from cultured embryonic, fetal or adult cells induced to quiescence (Campbell, et al, 1996, Nature 380, 64-66; Wilmut, et al., Nature 385, 810-813). The invention provides for animals that carry the transgene in all of their cells as well as only some of their cells, for example, a particular cell type.
- Before the present nucleic acids, polypeptides and methods for making and using the invention are described, it is to be understood that the invention is not to be limited only to the particular molecules or methods described. The molecules and method may vary, and the terminology used herein is for the purpose of describing particular embodiments. The terminology and definitions are not intended to be limiting since the scope of protection will ultimately depend upon the claims.

#### EXAMPLES

##### Example 1: Animal model for atrophy.

- Skeletal muscle adapts to decreases in activity and load by undergoing atrophy, a process which involves a loss of total muscle mass and a consequent decrease in the size of individual muscle fibers. R. T. Jagoe, A. L. Goldberg, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 4, 183 (2001). Muscle atrophy occurs as a consequence of denervation,

WO 02/061046

PCT/US02/02811

injury, joint immobilization, unweighting or bed-rest, glucocorticoid treatment, inflammatory diseases such as sepsis, cancer and old age ( C. Rommel *et al.*, *Nature Cell Biology* 3, 1009 (2001)).

5 To test for muscle atrophy, the ankle joint of rodents (mice or rats) are immobilized at 90 degrees of flexion. This procedure induces atrophy of the muscles with action at the ankle joint (e.g. soleus, medial and lateral gastrocnemius, tibialis anterior) to varying degrees. A reproducible amount of atrophy can be measured in hindlimb muscles over a 14-day period.

0 The immobilization procedure may involve either casting (mice) or pinning the ankle joint (rats). Rodents are anesthetized with ketamine/xylazine and the right ankle joint is immobilized. In rats, a 0.5 cm incision is made along the axis of the foot, over the heel region. A threaded screw (1.2 x 8mm) is then inserted through  
5 the calcareous and talis, into the shaft of the tibia. The wound is closed with skin glue. In mice, the ankle joint is fixed at 90 degrees with a light weight casting material (VET-LITE) around the joint. The material is soaked in water and then wrapped around the limb. When the material dries it is hard, but light in weight.

0 At seven and 14 days following the immobilization, animals are anesthetized and killed by cervical dislocation. The tibialis anterior (TA), medial gastrocnemius (MG), and soleus (Sol) muscles are removed from the right (immobilized) and left (intact) hindlimbs, weighed, and frozen at a fixed length in liquid nitrogen cooled  
5 isopentane. A cohort of control animals which are the same weight and age as the experimental animals are also killed and the muscles removed, weighed and frozen. The amount of atrophy is assessed by comparing the weight of the muscles from the immobilized limb with the weight of the muscles from the control animals. Further assessment of atrophy will be done by measuring muscle fiber size and muscle tension output.

0 Denervation, immobilization (by joint fixation), and unweighting (by suspending the hindlimbs) in rats all result in similar rates of loss in mass of the medial gastrocnemius muscle (Fig 1A), a result which is at least consistent with the idea that there are common mechanisms leading to atrophy. To determine if universal

WO 02/061046

PCT/US02/02811

markers of atrophy exist, we initially compared gene expression in immobilization and denervation with a set of muscle-specific genes selected from the literature as changing during atrophy. Again, we saw surprising similarity in gene expression patterns between these two models (Fig 1B, compare panel on left to center panel).  
5 However, when an unweighting model (hind-limb suspension) was analyzed none of the selected genes was similarly regulated to immobilization or denervation, indicating that these genes are not "universal" markers for the atrophy process (Fig 1B). To identify potential universal markers of atrophy, we first attempted to identify genes regulated in one particular model (immobilization), and then  
0 determined which of these, if any, were similarly regulated in multiple other models (Fig 1C).

We performed Northern blots with RNA from the muscle of rats involved in three atrophy models: immobilization, denervation, and hindlimb-suspension. The  
5 Northern blots show the effect of atrophy on expression of *muscle creatine kinase* (MCK), *myoD*, *myogenin* and *Myf5*. Muscle was obtained from rats undergoing a time course (0, 1, 3, 7, and either 10 or 14 days, as indicated). For each lane, total RNA was pooled from three rat medial gastrocnemius muscles (MG). (Figure 24).

We also performed an immunoblot of MuRF1 which demonstrates that MuRF1 protein is upregulated after ankle joint immobilization-induced atrophy (Imm). In Figure 25A, Lane 1 is a control of recombinant rat *MuRF1* (Accession number AY059627) expressed in COS cells. A lysate was made from these cells, so that the expected size of MuRF1 could be established. For lanes 2-7, protein lysates were  
5 pooled from three gastrocnemius muscles, taken from untreated rats (CON), rats at day one (Imm1) and day three (Imm3) after immobilization. An immunoblot is shown using an antibody raised against full-length rat MuRF1. Mammalian expression vectors coding for GST, GST-MAFbx, or GST-MAFbxDFb (an F-box deletion of MAFbx amino acids 216-263) were transiently transfected into Cos7 cells  
0 and the cells lysed 48 hours later in cold phosphate-buffered saline containing 1% NP40, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 mg/ml aprotinin, 10 mg/ml leupeptin, 1 mM sodium orthovanadate, 25 mM beta-glycerophosphate, 100 nM okadaic acid, 20 nM microcystin LR, and 5 mM N-ethylmaleimide. Thirty microliters of glutathione-agarose beads (Amersham Pharmacia) was added to the clarified lysates (500 mg)

WO 02/061046

PCT/US02/02811

and rotated for 3 hr at 4°C. Beads were washed three times by centrifugation with lysis buffer, boiled in reducing SDS sample buffer, and subjected to SDS-PAGE/immunoblot analysis with anti-Skp1 (Transduction Labs) and anti-Cullin 1 (Zymed). Muscle lysates (1 mg) were immunoprecipitated and immunoblotted with antisera raised against GST-MuRF1 which had been preabsorbed with immobilized GST.

Northern probes for mouse *myoD* spanned bp 571-938 of coding sequence; mouse *myogenin* spanned bp 423-861 of coding sequence mouse *Myf5* spanned 406-745 of coding sequence. Northern probes for rat *MuRF1* were made by PCR, spanning bp 24 - 612 of coding sequence. For mouse *MuRF2*, the probe was made using the 5' PCR oligo: GAACACAGGAGGAGAACTGGAACATGTC and the 3' PCR oligo: CCCGAAATGGCAGTATTCTGCAG, spanning the fifth exon of mouse *MuRF2*. For mouse *MuRF3*, the probe spanned bp 867-1101 of coding sequence. For rat *MAFbx*, the probe was made by PCR, and spanned bp 21 - 563 of coding sequence. For human *MAFbx*, the probe spanned bp 205 - 585. The Northern of mRNA from the *MAFbx* +/+, +/-, and -/- mice was probed with coding sequence spanning bp 660 - 840. To control for the amount of total RNA loaded, the agarose gels were stained with ethidium bromide and photographed, to assess ribosomal RNA bands. The Southern confirming the loss of the *MAFbx* allele on the 5' end was performed with a mouse *MAFbx* genomic probe, spanning a 1.1 kb *SacII* fragment upstream of the ATG, and downstream of the indicated *EcoRI* site. The Northern of mRNA from the *MuRF1* +/+, +/-, and -/- mice was probed with coding sequence spanning bp 1 - 500 of rat *MuRF1* (accession AY059627). The Southern confirming the loss of the *MuRF1* allele on the 5' end was performed with a mouse *MuRF1* genomic probe, spanning a 0.5 kb *BglII* fragment upstream of the ATG, and downstream of the indicated *EcoRI* site.

0

**Example 2: Cloning of the rat MURF1 gene, a muscle-specific ring-domain gene**

This experiment was performed in the interest of determining which genes are differentially expressed during conditions of skeletal muscle atrophy. The differential

WO 02/061046

PCT/US02/02811

display analysis resulted in 74 transcripts, which were labeled MA1-MA74 ("MA" for Muscle Atrophy). Bioinformatic analysis on the original transcripts and on subsequent RACEd cDNA allowed for determinations in 61 of the transcripts. Transcript analysis was performed using the Genetag™ method (L. Y. Wong *et al.*, *Biotechniques* 28, 776 (2000).) (Figure 23)

Rats were subjected to an atrophy-inducing model, as outlined in Example 1 *supra*. Three days after surgery, muscle tissue was harvested from the surgically treated animals. As a control, muscle tissue was also harvested from untreated animals.

Messenger RNA was isolated from the atrophied muscle tissue and from the control muscle tissue, and put into a differential display assay. One of the gene transcripts found to be up-regulated during atrophy encompassed a 3', untranslated part of the MURF1 transcript. This 3' fragment was used to produce a DNA probe, which was used to clone a full-length gene comprising the coding sequence of MURF1. Also identified was an smaller, alternate splice form termed the rMURF1 VRV splice form. This alternate form differ from the full length form at the 3' end, with the full length form being 152 amino acids longer. The alternate splice form has at its carboxy terminus the amino acid sequence "VRV" which is a PDZ-interacting domain (Torres R, Firestein BL, Dong H, Staudinger J, Olson EN, Haganir RL, Bredt DS, Gale NW, Yancopoulos GD (1998) *Neuron*:1453-63). The presence of a PDZ-interacting domain predicts that the protein is able to participate in protein-protein interactions. In contrast, the full length form has other protein interacting domains, for example, an acidic domain containing the amino acid sequence "DEEEEFTEEEEDQEE". the presence of this domain predicts that this form is also able to interact with other proteins. The nucleotide and deduced amino acid sequences for full length rMURF1 are appended below in Figure 6 and Figure 7, respectively. The nucleotide and deduced amino acid sequences for the rMURF1 VRV splice form are appended below in Figure and Figure 17 respectively.

**Example 3: Cloning of the human MURF3 gene, a muscle-specific ring-domain gene**

The rat MURF1 coding sequence was used to isolate human MURF3, by standard molecular biology techniques. This coding sequence has been previously deposited

WO 02/061046

PCT/US02/02811

with American Type Culture Collection (ATCC®), as Human MA16 C8 in Stratagene T3/T7 vector, Patent Deposit Designation #PTA-1049, on December 10, 1999. The nucleotide and deduced amino acid sequences for hMURF3 are appended below in Figures 8A-8C and Figure 9, respectively. Human MuRF 1 was used to hybridize to rat MURF1, by standard techniques.

**Example 4: Cloning of rat MA-61, a muscle-specific F-box gene**

This experiment was performed in the interest of determining which genes are differentially expressed during conditions of skeletal muscle atrophy. To find such genes, rats were subjected to an atrophy-inducing model, as outlined in Example 1 *supra*. Three days after surgery, muscle tissue was harvested from the surgically treated animals. As a control, muscle tissue was also harvested from untreated animals. Messenger RNA was isolated from the atrophied and from the control muscle tissue, and put into a differential display assay. One of the gene transcripts found to be up-regulated during atrophy encompassed a 3', untranslated part of the MAFBX transcript. This 3' fragment was used to produce a DNA probe, which was used to clone a full-length gene comprising the coding sequence of MA-61, by standard molecular biology techniques. The nucleotide and deduced amino acid sequences for rMAFBX are appended below in Figure 10 and Figure 11, respectively.

**Example 5: Cloning of the human MAFBX gene, a muscle-specific F-box gene**

The rat MAFBX coding sequence was used to isolate the human homolog of MAFBXD18, by standard molecular biology techniques. Two alternate forms of this gene were identified, termed hMAFBXD18 and hMAFBXK8. The D18 form of the gene encodes a protein which is 11 amino acids longer at the carboxy terminus than the K8 form. The significance of having two forms of this gene is unknown. However, it is often the case that alternate splice forms serve to modulate protein-protein interactions. This coding sequence has been previously deposited with American Type Culture Collection (ATCC®) as Human MAFBXK8 in Stratagene T3/T7 vector, Patent Deposit Designation #PTA-1048 and Human MAFBXD18 in Stratagene T3/T7 vector, Patent Deposit Designation #PTA-1050. The nucleotide and deduced amino acid sequences for hMAFBXK8 are appended below in Figure 12

WO 02/061046

PCT/US02/02811

and Figure 13, respectively. The nucleotide and deduced amino acid sequences for hMAFBXD18 are appended below in Figure 18, and Figure 19, respectively.

5 The sequences of rat and human MAFbx protein, and human Fbx25 were aligned  
(C. Cenciarelli *et al.*, *Curr. Biol.* 9, 1177 (1999). The published partial Fbx25 sequence  
begins with the indicated Leucine (L) at amino acid 85 of MAFbx. The region  
surrounding the F-box is indicated, as is a bipartite nuclear localization signal. (Figure  
26) Accession numbers for rat and human MAFbx are AY059628 and AY059629,  
respectively.

0

**Example 6: Demonstration that MURF1 and MAFBX are universal markers for muscle atrophy.**

5 After it was confirmed by Northern blot analysis that MURF1 and MAFBX are both  
up-regulated during immobilization-induced muscle atrophy, other models of  
muscle atrophy were examined. Muscle can undergo atrophy under a variety of  
stresses, including: denervation, in which the nerve to the muscle is severed; hind-  
limb suspension, in which the limb is physically suspended, to decrease muscle load;  
0 treatment with the glucocorticoid drug Dexamethasone. Northern analysis of  
mRNA obtained from muscle tissue subjected to each of these atrophying conditions  
demonstrated that MURF1 and MAFBX are up-regulated in every model of atrophy  
examined. Thus, MURF1 and MAFBX transcriptional up-regulation can serve as  
clinical markers for muscle atrophy.

5

We first compared mRNA from rat skeletal muscle (medial gastrocnemius) which  
had been immobilized for three days to mRNA from control muscle, via the  
GeneTag™ differential display approach. We chose to analyze a relatively early time  
point (3 days), as opposed to a longer time point such as 14 days, in order to identify  
0 genes that may function as potential triggers, as well as markers, of the atrophy  
process. Only genes whose expression changed three-fold or higher were accepted  
as being differentially regulated. Acceptable transcripts were then assayed for  
"universality" by Northern analysis using panels of mRNA prepared from muscle  
subjected to denervation, immobilization or unweighting for periods of 1 to 14 days.

WO 02/061046

PCT/US02/02811

As a follow-up, mRNA from muscle which atrophied following systemic treatment with glucocorticoids or IL-1 was also analyzed. Finally, panels of mRNA prepared from muscle undergoing hypertrophy were examined to see if those genes regulated during atrophy were regulated in the opposite direction during hypertrophy.

One of the disadvantages of the differential display technique as performed was that the resultant cDNA obtained was often restricted to 3' untranslated sequences, and of an average length of 75 base pairs. Thus it was often necessary to perform subsequent PCR-based 3' and 5' RACE analysis in order to obtain sufficient sequence to make gene identifications. The differential display analysis resulted in 74 transcripts, which were labeled MA1-MA74 ("MA" for Muscle Atrophy). Bioinformatic analysis on the original transcripts and on subsequent RACED cDNA allowed for determinations in 61 of the transcripts (Figure 23).

Several major classes of genes were regulated following joint immobilization-induced muscle atrophy. Genes involved in "energy-use pathways" constituted the largest class of down-regulated genes and included: lactate dehydrogenase, phosphofructokinase, and fructose 1,6 biphosphatase. Down-regulation of these pathways indicates that energy pathways can be regulated transcriptionally, as has been shown in the case of endurance exercise (K. Baar, E. Blough, B. Dineen, K. Esser, *Exerc Sport Sci Rev* 27, 333-379 (1999)). The largest class of up-regulated genes were those associated with ubiquitylation and the proteasome pathway including: the 26s proteasome regulatory subunit p31, polyubiquitin, the proteasome activator subunit pa28 beta, and two novel ubiquitin ligases which will be discussed below. Although it has been previously shown that ATP-dependent protein degradation, via the addition of ubiquitin to target proteins and their subsequent proteolysis by the proteasome, is increased during muscle atrophy (R. Medina, S. S. Wing, A. Haas, A. L. Goldberg, *Biomed Biochim Acta* 50, 347-356 (1991); S. Temparis *et al.*, *Cancer Res* 54, 5568-73 (1994); R. Medina, S. S. Wing, A. L. Goldberg, *Biochem J* 307, 631-637 (1995)), it was not clear which if any of the genes involved in ubiquitylation might constitute markers for the atrophy process, or whether any of these genes were actually required, or even sufficient, to induce atrophy.

WO 02/061046

PCT/US02/02811

While the majority of genes perturbed during immobilization were similarly regulated during denervation, most of these genes were unaltered in the unweighting model (data not shown), despite the fact that similar rates of atrophy were seen in these models between one and seven days(Fig 1A).

5

A time course of rat medial gastrocnemius muscle mass loss was examined in three *in vivo* models: Denervation, Immobilization and Hindlimb Suspension. Female Sprague Dawley rats weighing 250-275 gm were used in all models. For the denervation procedure: the right sciatic nerve was cut in the mid-thigh region, leading to denervation of the lower limb muscles. For the immobilization procedure: the right ankle joint was fixed at 90° of flexion by inserting a screw (1.2 x 8mm) through the calcaneus and talis, into the shaft of the tibia. For the Hindlimb Suspension procedure: the hind limbs were unloaded by suspending the rats by their tails using a tail-traction bandage as described ( D. B. Thomason, R. E. Herrick, D. Surdyka, K. M. Baldwin, *J. Appl. Physiol.* **63**, 130 (1987)). On the indicated days, rats were killed and hind limb muscles were removed, weighed and frozen. Weight-matched untreated rats served as controls. Data are means  $\pm$  s.e.m., n=10 rats. (Figures 28A-28DA).

0

5

0

Northern blots were also performed showing the effect of atrophy on *MuRF1* and *MAFbx* transcripts. Medial gastrocnemius muscle was obtained from rats undergoing a time course (0, 1, 3, and 7 days) of three atrophy models: Ankle-Joint Immobilization, Denervation, and Hindlimb-Suspension. (Figures 28A-28D B)

5

These findings indicate that denervation and immobilization are easily distinguishable transcriptionally from unweighting, perhaps because unweighting is unique in that there is relatively normal neural activation and joint movement in the suspended limbs. However, we did identify two genes that were up-regulated in all three models of atrophy; MA16, later identified as *MuRF1* (for muscle-specific ring finger protein), and MA61, (subsequently called *MAFbx*, for Muscle Atrophy F-box protein) (Fig 2A).

0

WO 02/061046

PCT/US02/02811

MuRF1 and MAFbx expression were analyzed in two additional models of skeletal muscle atrophy: treatment with the cachectic cytokine, interleukin-1 (IL-1) (R. N. Cooney, S. R. Kimball, T. C. Vary, *Shock* 7, 1-16 (1997)) and treatment with the glucocorticoid, dexamethasone (A. L. Goldberg, *J Biol Chem* 244, 3223-9 (1969)).

5 While the first three models induced muscle atrophy by altering the neural activity and/or external load a muscle experiences to various degrees, these additional models induce atrophy without directly affecting those parameters. Northern blots were performed showing the effect of dexamethasone (DEX) and Interleukin-1 (IL-1) on expression of *MuRF1* and *MAFbx*. Medial gastrocnemius muscle was obtained

0 from untreated rats (CON), and from rats treated with DEX, delivered orally at a concentration of 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for nine days, and from rats treated with IL-1, delivered subcutaneously daily at a dose of 0.1 mg/kg for three days. Figures 28A-28D(c). Both cachectic agents caused an up-regulation of *MuRF1* and *MAFbx*, with dexamethasone resulting in a greater than ten-fold increase in expression of *MuRF1*

5 and *MAFbx* (Fig 2B).

Identification of a gene whose expression was up-regulated during atrophy and down-regulated during hypertrophy would greatly strengthen the claim that this gene was a marker for the atrophy phenotype, and provide correlative evidence

0 that the gene of interest may function as a direct mediator of the atrophy process. We therefore examined *MuRF1* and *MAFbx* expression in two models of skeletal muscle hypertrophy: hind-limb reloading following a 14-day unweighting period (D. B. Thomason, R. E. Herrick, D. Surdyka, K. M. Baldwin, *J Appl Physiol* 63, 130-7. (1987).), and compensatory hypertrophy in which the gastrocnemius and soleus

5 muscles are removed, leaving the plantaris muscle to compensate for the loss of these synergistic muscles (G. R. Adams, F. Haddad, *J Appl Physiol* 81, 2509-16. (1996); R. R. Roy *et al.*, *J Appl Physiol* 83, 280-90. (1997)). In both of these models, *MuRF1* and *MAFbx* expression decreased, demonstrating that these genes are not only positively correlated with atrophy, but are also negatively correlated with

0 hypertrophy (Fig 2C). Furthermore, Northern analysis on both rat and human "tissue blots" identified *MuRF1* and *MAFbx* as being muscle-specific, in both heart and skeletal muscle (Fig. 2D), consistent with their serving specific roles in these tissues.

WO 02/061046

PCT/US02/02811

Total RNA obtained from rat and human tissues (Clontech) was hybridized with probes for the indicated genes. (Figures 28A-28DD)

5 **Example 7: Demonstration that MURF1 can function in a ubiquitin ligase complex.**

0 Recently, it has been shown that genes containing ring domains can function as  
"monomeric ubiquitin ligases". Under certain conditions, these proteins  
simultaneously bind a substrate and a ubiquitin ligase, causing ubiquitination and  
proteasome-mediated degradation of the substrate. In the process, the ring domain  
protein itself becomes ubiquitinated. A vector encoding the rat MURF1 gene was  
transfected into COS cells, along with a vector encoding an HA-epitope-tagged form  
of ubiquitin. Protein lysates were harvested from the COS cells. MURF1 was  
immune-precipitated from the lysate using an antibody raised against an MURF1  
5 peptide. The immune-precipitated protein was subjected to Western blot analysis,  
utilizing an antibody to the HA-tag. It was seen that MURF1 is highly ubiquitinated.  
Further, as a control, a vector encoding a mutant form of MURF1, in which the ring  
domain portion of the gene was deleted, was co-transfected into COS with tagged  
ubiquitin. In this case, no ubiquitination was evident. These results are consistent  
0 with the hypothesis that MURF1 functions as part of a ubiquitin complex, and that  
the ring-domain is necessary for ubiquitination, as seen in other ring domain  
proteins. Figure 14 is a comparison of hMURF1 with other ring finger proteins.

MuRF1 was previously cloned by virtue of its interaction in a yeast two-hybrid  
5 experiment with a construct encoding a 30 kD domain of the large (300 kD)  
sarcomeric protein titin (T. Centner *et al.*, *J Mol Biol* **306**, 717-726 (2001)). While the  
presence of a "Ring finger domain (K. L. Borden, P. S. Freemont, *Curr Opin Struct  
Biol* **6**, 396-401 (1996); P. S. Freemont, *Ann N Y Acad Sci* **684**, 74-192 (1993).)" in  
MuRF1 was previously noted, no further analysis was done to see if MuRF1 might  
0 function as a ubiquitin ligase. We noted that MuRF1 contains all the canonical  
structural features of ring-domain-containing monomeric ubiquitin ligases (P. S.  
Freemont, *Curr Biol* **10**, R84-87 (2000); C. A. Joaieiro, A. M. Wiessman, *Cell* **102**, 549-  
552 (2000).), and further reasoned that a ubiquitin ligase that could target muscle  
proteins for degradation would be a strong candidate for mediating muscle atrophy.

WO 02/061046

PCT/US02/02811

To initiate characterization of the MuRF1 protein and its potential ubiquitin ligase activity, we first demonstrated that MuRF1 protein levels, in addition to mRNA expression levels, increased during atrophy by immuno-blotting muscle lysates obtained from animals subjected to immobilization with an antibody which  
5 recognized MuRF1 (Fig 3A). Next, recombinant MuRF1 protein was produced, and tested for ubiquitin ligase activity in an *in vitro* assay using radio-labeled ubiquitin as a substrate. MuRF1 was shown to be a potent ubiquitin ligase (Fig 3B) in that no ubiquitin ligase activity was detected in the absence of MuRF1 (Fig3B) and other ring-finger ubiquitin ligases tested in this assay were less potent than MuRF1, as  
0 determined by the amount of radio-labeled ubiquitin self-conjugates per ug of protein.

MuRF1 protein has ubiquitin ligase activity. Purified Glutathione-Sepharose-bound - MuRF1 protein (GST-MuRF1) was added to a ubiquitin ligase reaction as described  
5 (A. Chen *et al.*, *J. Biol. Chem.* 275, 15432 (2000). Briefly, recombinant GST-MuRF1 (100 ng) was incubated with <sup>32</sup>P-ubiquitin (3 mg) in the presence of ATP, E1, and recombinant Ubc5c (Figures 29A-29D(D), lane 5). In lanes 1-4, indicated components were omitted. Aliquots of the reaction were analyzed by 12.5% SDS-PAGE to detect <sup>32</sup>P-labelled high molecular weight ubiquitin conjugates. The "ubiquitin polymer"  
0 may include ubiquitinated Ubc5c and MuRF1. Figures 29A-29DD.

**Example 8: Demonstration that MAFBX can function in an "SCF" ubiquitin ligase complex.**

5 Recently, it has been shown that genes containing F-box domains can function as part of a ubiquitin ligase complex called an "SCF" complex, where S stands for the gene product SKP1, C stands for a gene product called Cullin, and "F" stands for an F-box protein. To determine whether MAFBX is part of an SCF complex, MAFBX was studied to determine if it binds to either SKP1 or Cullin, by doing a co-immune  
0 precipitation assay. Vectors encoding GST (GST/CON), GST-MAFbx, or GST-MAFbxDFb (an F-box deletion of MAFbx, aa 216-263) were transiently transfected into Cos7 cells. Both Cullin1 and SKP1 could be co-purified, using glutathione-agarose beads, from lysates of cells transfected with GST-MAFbx (See Figures 29A-

WO 02/061046

PCT/US02/02811

29D(A), Lane 3). Deletion of the F-box markedly reduced the amount of Cullin1 and Skp1 which co-precipitated (See Figures 29A-29D(A), Lane 4).

Over-expression of MAFbx causes atrophy. C2C12 myotubes, either uninfected (CON), or infected with an adenovirus expressing *EGFP*, or an adenovirus expressing both a Myc-epitope tagged rat *MAFbx* gene, and *EGFP* (MAFbx-EGFP). At day 4 after differentiation, fluorescent myotubes were photographed and myotube diameters were measured (right). The adenoviruses were generated as described (T.-C. He *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 95, 2509 (1998)). Calibration = 50  $\mu$ m. Figures 29A-29D(B)

Since the EGFP and MAFbx-EGFP viruses contained the *EGFP* gene, an anti-EGFP immunoblot (I.B.) allowed for a relative determination of infection levels. An immunoblot (I.B.) of lysates confirmed the presence of Myc-epitope tagged MAFbx protein in the myotubes infected with the MAFbx virus. Figures 29A-29DC.

These results are consistent with the hypothesis that MAFBX functions as part of an SCF ubiquitin ligase complex, and that the F-box-domain is necessary for association, as seen with other members of this complex.

**Example 9: Demonstration that a substrate of MURF3 is the Syncoilin gene.**

To determine potential substrates for MURF3, a "yeast two-hybrid" experiment was performed. This is a standard method to detect proteins which co-associate with the protein of interest. In this experiment, a vector encoding the gene of interest is co-transfected, and fused to a yeast LexA domain, with a library encoding cDNA fused to GAL4-domain. If a cDNA in the library associates with the test gene, then the LexA and GAL4-domains are brought together, resulting in the production of a critical yeast protein, allowing the yeast to live in a particular medium. Using this method, we determined that a substrate for MURF3 is a recently-cloned gene called Syncoilin.

WO 02/061046

PCT/US02/02811

**Example 10 : Clenbuterol treatment, which blocks atrophy, blocks up-regulation of MURF1 and MA-61.**

To further establish whether MURF1 and MAFBX may be markers for the muscle atrophy process, and potential targets to block atrophy, a drug called Clenbuterol was used to inhibit muscle atrophy, to see if this inhibition correlated with a decrease in the up-regulation of MURF1 and MA-61. Clenbuterol, a beta-adrenergic agonist, has been established as an inhibitor of muscle atrophy (see for example: Sneddon AA, Delday MI, Maltin CA, (2000). Amelioration of denervation-induced atrophy by clenbuterol is associated with increased PKC-alpha activity (Am J Physiol Endocrinol Metab 2000 Jul;279(1):E188-95).

Rat limb muscles were immobilized, as described in Example 1 *supra*. At the same time that the rats were immobilized, they were treated with Clenbuterol (3 mg/kg, s.c). Control immobilized animals were left untreated. Messenger RNA from control and clenbuterol-treated animals' muscle tissue was examined for MURF1 and MAFBX expression by standard techniques (Northern hybridization using MURF1 and MAFBX probes). It was found that treatment with clenbuterol, which significantly blocked atrophy, also blocked the up-regulation of MURF1 and MA-61.

**Example 11: Analysis of MuRF2 and MuRF3.**

Two genes closely related to MuRF1 have been cloned, and named MuRF2 and MuRF3 (T. Centner *et al.*, *J Mol Biol* 306, 717-726 (2001), J. A. Spencer, S. Eliazzer, R. L. Ilaria, J. A. Richardson, E. N. Olsen, *J. Cell Biol.* 150, 771-784 (2000)). Northern analysis demonstrated that MuRF2 and MuRF3 expression were not consistently up-regulated during skeletal muscle atrophy (Fig 4C), despite being muscle specific and highly homologous to MuRF1 (T. Centner *et al.*, *J Mol Biol* 306, 717-726 (2001)). Muscle was obtained from rats undergoing a time course (0, 1, 3, and 7 days) of three atrophy models: immobilization, denervation, and hindlimb-suspension. For each lane, total RNA was pooled from three rat medial gastrocnemius muscles (MG). Northern hybridizations were performed with probes for the indicated genes. Northern probes for mouse *myoD* spanned bp 571-938 of coding sequence; mouse *myogenin* spanned bp 423-861 of coding sequence mouse *Miyf5* spanned 406-745 of

WO 02/061046

PCT/US02/02811

coding sequence. Northern probes for rat *MuRF1* were made by PCR, spanning bp 24 - 612 of coding sequence. For mouse *MuRF2*, the probe was made using the 5' PCR oligo: GAACACAGGAGGAGAACTGGAACATGTC and the 3' PCR oligo: CCCGAAATGGCAGTATTCTGCAG, spanning the fifth exon of mouse *MuRF2*.

5 For mouse *MuRF3*, the probe spanned bp 867-1101 of coding sequence. To control for the amount of total RNA loaded, the agarose gels were stained with ethidium bromide and photographed, to assess ribosomal RNA bands. It is unknown whether *MuRF2* or *MuRF3* function as ubiquitin ligases.

0 **Example 12: Ubiquitination increases during muscle atrophy.**

As demonstrated *supra*, MURF1 is part of a ring domain ubiquitin ligase, and MAFBX is part of an "SCF" ubiquitin ligase complex. To show that ubiquitination is involved in the process of muscle atrophy, a Western blot was performed on protein  
5 obtained from control muscle tissue and from muscle tissue undergoing denervation or immobilization-induced atrophy. In both atrophy conditions, it was seen that the level of ubiquitination increases during atrophy. This point has also been established in the literature (see for example: Solomon V, Baracos V, Sarraf P, Goldberg AL. (1998)) Rates of ubiquitin conjugation increase with atrophy, largely through  
0 activation of the N-end rule pathway. (Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Oct 13;95(21):12602-7).

**Example 13: MAFBX is a member of the SCF E3 ubiquitin ligase family, as demonstrated by yeast two-hybrid association between MAFBX and Skp1.**

5 We cloned full-length rat and human cDNAs for this gene. Open reading frames of rat and human MAFbx cDNA sequence predict proteins which are 90% identical (Fig 4A). The protein sequences are notable for the presence of an "F-box" domain, which is of interest since F-box domains have been identified in proteins which are  
0 members of a particular E3 ubiquitin ligase called an "SCF ubiquitin-ligase complex" (D. Skowyra, K. L. Craig, M. Tyers, S. J. Elledge, J. W. Harper, *Cell* 91, 209-19 (1997); J. Lisztwan *et al.*, *EMBO J* 17, 368-83 (1998)). The SCF complex is thus named because it involves stable interactions between the following proteins: Skp1 (Skp1), Cullin1 (Cul1), and one of many "F-box"-containing proteins (Fbps). More than thirty-eight

WO 02/061046

PCT/US02/02811

different Fbxs have been identified in humans ( J. T. Winston, D. M. Koepp, C. Zhu, S. J. Elledge, J. W. Harper, *Curr Biol* 9, 1180-2 (1999); C. Cenciarelli *et al.*, *Curr Biol* 9, 1177-9 (1999)). The closest relative to MAFbx is Fbx25, a gene previously cloned in a large search for F-box containing proteins (19). Interestingly, whereas MAFbx expression is limited to skeletal muscle and heart, Fbx25 is expressed in most other tissues, but not in skeletal muscle (data not shown). We demonstrated that MAFbx is in fact an SCF-type E3 ubiquitin ligase in two ways. First, yeast-two hybrid cloning using full-length MAFbx as a "bait" resulted in 94 independent clones of Skp1, out of a total of 94 clones obtained in the interaction experiment (data not shown). Second, immune-precipitation of MAFbx from mammalian cells transfected with MAFbx resulted in the co-precipitation of both Skp1 and Cul1 (Fig 4B). This co-precipitation was dependent on the presence of the F-box domain in MAFbx (Fig 4B, compare lanes 3 and 4). The F-box motif has been shown to be necessary for interaction between Fbxs and Skp1 (E. T. Kipreos, M. Pagano, *Genome Biol.* 1 (2000).)

**Example 14: MURF1 functions as a ubiquitin ligase.**

To determine whether MURF1 functions as a ubiquitin ligase, recombinant MURF1 protein was produced in *E.Coli* bacteria, using standard techniques. This recombinant protein was purified, and used in an *in vitro* ubiquitin ligase assay, as described in Chen *et al.*, 2000, *J Biol Chem*, 275, pg 15432-15439. It was found that MURF1 was highly active; this activity is dependent on both E1 and UBC5c, as an E2 (E1 and E2 components are necessary for ring domain protein-mediated ubiquitin ligation). A negative control protein failed to work. Other ring domain-containing proteins, as positive controls, also functioned in the assay, but were less efficient, as measured by ubiquitin conjugation. See Figure 15 for a schematic representation of how MURF1 functions as a ubiquitin ligase.

**Example 16: Knock-Out Animals**

**MAFBX knock-out animals show a decrease in muscle atrophy**

To further elucidate the function of MAFbx we genetically engineered a MAFbx null allele in mice, in which genomic DNA spanning the ATG through the exon encoding the F-box region was replaced by a LacZ/ neomycin cassette, (Fig 5A) allowing us to

WO 02/061046

PCT/US02/02811

simultaneously disrupt MAFbx function and perform b-galactosidase (b-gal) staining to determine MAFbx expression patterns. Analysis of the MAFbx locus demonstrated the expected perturbation in MAFbx +/- and -/- animals (Fig5B). Further, MAFbx -/- animals were null for MAFbx mRNA (Fig 5C). MAFbx -/- mice were viable, fertile and appeared normal. Mice deficient in MAFbx had normal growth curves relative to wild type litter mates, and skeletal muscles and heart had normal weights and morphology (data not shown).

Given the absence of an obvious phenotype, we decided to challenge the mice in an atrophy model to determine the role, if any, of MAFbx in producing skeletal muscle loss. Muscle atrophy was induced by cutting the sciatic nerve, resulting in denervation and disuse of the tibialis anterior and gastrocnemius muscles. Denervation resulted in up-regulation of the MAFbx gene locus in all muscle fibers, as demonstrated by b-gal staining in the tibialis anterior of MAFbx +/- mice (Fig 6A). Significant muscle atrophy occurred in the tibialis anterior and gastrocnemius muscles of wild type, MAFbx +/+, mice at 7 and 14 days following denervation (Fig 6B). Mice deficient in MAFbx (MAFbx -/-) had significantly less atrophy than MAFbx +/- mice at both 7 and 14 days (Fig 6B). In fact, MAFbx -/- mice exhibited no additional muscle loss between 7 and 14 days, whereas MAFbx +/+ continued to lose mass. The preservation of muscle mass at 14 days was also reflected in a preservation of mean fiber size and fiber size variability; MAFbx -/- mice had significantly larger fibers than the MAFbx +/- mice, and maintained the same fiber size variability as seen in the undenervated limb (Fig 6C). These data provide strong evidence that MAFbx is a required regulator of muscle atrophy, and that it may play an important role in the degradation of muscle proteins.

#### MuRF-1 knock-out animals show a decrease in muscle atrophy

To further elucidate the function of MuRF1 we genetically engineered a MuRF1 null allele in mice, in which genomic DNA spanning the ATG through the exon encoding the F-box region was replaced by a LacZ/neomycin cassette, (Fig 5A) allowing us to simultaneously disrupt MuRF1 function and perform b-galactosidase (b-gal) staining

WO 02/061046

PCT/US02/02811

to determine MuRF1 expression patterns. Analysis of the MuRF1 locus demonstrated the expected perturbation in MuRF1 +/- and -/- animals (Fig5B). Further, MuRF1 -/- animals were null for MuRF1 mRNA (Fig 5C). MuRF1 -/- mice were viable, fertile and appeared normal. Mice deficient in MuRF1 had normal growth curves relative to wild type litter mates, and skeletal muscles and heart had normal weights and morphology (data not shown).

In this study we identified two genes that are muscle-specific and up-regulated during muscle atrophy induced by a variety of perturbations. Both MuRF1 and MAFbx encode distinct types of E3 ubiquitin ligases. The discovery of two ubiquitin ligases as markers for multiple models of skeletal muscle atrophy suggests that highly disparate perturbations, ranging from denervation to glucocorticoid treatment, activate common atrophy-inducing pathways. Further, the particular function of ubiquitin ligases, to target discrete substrates for proteolysis by the ATP-dependent proteasome, suggests that a particular protein degradation pathway is up-regulated during atrophy and mediated by MAFbx and MuRF1.

MuRF1 contains a ring finger domain and was shown to function as a ubiquitin ligase *in vitro*, thereby suggesting that it may function in skeletal muscle as a monomeric ring-finger ligase. While this study did not identify a substrate, a previous study identified MuRF1 as binding to the sarcomeric protein titin, raising the possibility that MuRF1 might function as a ubiquitin ligase for titin, an important organizer of the sarcomeric complex ( T. Centner *et al.*, *J Mol Biol* 306, 717-726 (2001)).

MAFbx is a member of the F-box containing SCF family. No substrates have been determined for MAFbx in these studies; however, expression of MAFbx in skeletal myotubes *in vitro* was sufficient to induce atrophy in these cells. Further, mice deficient in MAFbx exhibited significantly less atrophy than wild-type mice in a denervation model. This finding demonstrates that MAFbx is a critical regulator of the muscle atrophy process, most likely through the regulation of the degradation of crucial muscle proteins. Analysis of these MAFbx deficient mice in additional

WO 02/061046

PCT/US02/02811

atrophy and hypertrophy models will further elucidate the role of MAFbx in muscle atrophy and protein turnover.

5 Future studies will focus on the identification of substrates for MAFbx and MuRF1, and the further examination of mice lacking either MAFbx or MURF1, MuRF  
relatives, as well as various combinations. Preliminary analysis of mice deficient in MuRF1 show them to be viable, and normal in appearance and growth characteristics (data not shown). The current studies identify MuRF1 and MAFbx as markers of skeletal muscle atrophy, and potential targets for therapeutic  
0 intervention to prevent the loss of skeletal muscle in clinical settings of atrophy. Since both MuRF1 and MAFbx are also specifically expressed in heart muscle, it will also be important to examine the roles of these ubiquitin ligases in heart remodeling and disease.

5 Targeting of the *MAFbx* and *MuRF1* loci.

Targeting of the *MAFbx* locus. To generate a gene targeting vector for homologous recombination in murine ES cells, a BAC genomic clone was obtained by screening a Genome Systems 129 *Sw/J* genomic library, using a probe specific for the first coding exon of the *MAFbx* gene. The BAC contained a genomic DNA insert of  
0 approximately 95 kb and encompassed the entire *MAFbx* gene – which is comprised of 9 coding exons (as in the rat and human orthologs). To disrupt the *MAFbx* gene, a *LacZ/neo* cassette was inserted precisely at the ATG initiation codon, to allow for *LacZ* gene expression to be driven by the *MAFbx* promoter. The insertion of *LacZ* simultaneously replaced approximately 35 kb of *MAFbx* genomic sequences,  
5 containing coding exons 1-7 and most of exon 8. The F-box is encoded by exons 7 and 8 in the mouse, rat and human *MAFbx* genes. The targeting vector was linearized by digestion with Not1 and electroporated into CJ7 ES cells (T. M. DeChiara *et al.*, *Cell* 85, 501 (1996)). ES cell clones that survived selection in G418 were screened to identify homologously recombined heterozygous ES cells. Three  
0 targeted clones were identified from 65 clones screened yielding a recombination frequency of 4.6%. See Figures 27A-27BA.

Targeting of the *MuRF1* locus. To generate a gene targeting vector for homologous recombination in murine ES cells, a BAC genomic clone was obtained by screening a

WO 02/061046

PCT/US02/02811

Genome Systems 129 *Sovf* genomic library, using a probe specific for the first coding exon of the *MuRF1* gene. The BAC contained a genomic DNA insert of approximately 33 kb and included the first five exons of the *MuRF1* gene. To disrupt the *MuRF1* gene, a *LacZ/neo* cassette was inserted precisely at the ATG initiation codon, to allow for *LacZ* gene expression to be driven by the *MuRF1* promoter. The insertion of *LacZ* simultaneously replaced approximately 8 kb of *MuRF1* genomic sequences, containing coding exons 1-4 and most of exon 5. The RING finger is encoded by exons 1 and 2 in the mouse, rat and human *MuRF1* genes. The targeting vector was linearized by digestion with Not1 and electroporated into C17 ES cells (T. M. DeChiara *et al.*, *Cell* 85, 501 (1996)). ES cell clones that survived selection in G418 were screened to identify homologously recombined heterozygous ES cells. Three targeted clones were identified from 22 clones screened yielding a recombination frequency of 14 %. See Figures 27A-27BB.

5 Confirmation of absence of targeted allele: MAFbx

The targeting of the *MAFbx* gene was confirmed in ES cells, and in both heterozygous and homozygous *MAFbx* mutant mice, by digesting genomic tail DNA with EcoR1 and probing with a 5' 1.1kb SacII fragment to detect the endogenous (end. allele) 3.1 kb and targeted (mut. allele) 4.9 kb EcoR1 fragments. (Figures 30A-30D A ).

The targeted mutation in the *MAFbx* gene was verified by probing mRNA from both tibialis anterior (TA) and gastrocnemius muscle (GA) prepared from *MAFbx* +/+ , +/- and -/- mice with a *MAFbx* probe, spanning bp 660 - 840 of coding sequence (*MAFbx*; upper panel), as well as with a probe of the inserted *LacZ* gene (Figures 30A-30D B).

5 Confirmation of absence of targeted allele: MuRF1

The targeting of the *MuRF1* gene was confirmed in ES cells, and in both heterozygous and homozygous *MuRF1* mutant mice, by digesting genomic tail DNA with EcoRI, and probing with a 5' 0.5kb BglIII fragment to detect the endogenous (end. allele) 15 kb and targeted (mut. allele) 10 kb EcoR1 fragments. (Figures 30A-30D(C)).

WO 02/061046

PCT/US02/02811

The targeted mutation in the *MuRF1* gene was verified by probing mRNA from both tibialis anterior muscle (TA) and gastrocnemius muscle (GA) prepared from *MuRF1* +/+, +/- and -/- mice with a probe spanning bp 1-500 of rat *MuRF1* coding sequence (*MuRF1*, upper panel), as well as with a probe of the inserted *LacZ* gene (Figures 30A-30DD)

Confirmation that the *MAFbx* and *MuRF1* genes are upregulated in muscle following denervation.

The regulation of the *MAFbx* and *MuRF1* genes were examined using b-gal staining in *MAFbx* +/- and *MuRF1* +/- mice. The right sciatic nerve was cut in heterozygous mice, resulting in denervation of the tibialis anterior (TA) muscle. Seven days later, the right and left tibialis anterior muscles were sectioned and stained for b-gal activity, in the same media, for equivalent times. In control muscle, there is a low level of *MAFbx* expression in some (primarily deep region), but not all, muscle fibers of the TA. In comparison, *MuRF1* is expressed in all fibers at a slightly higher level than *MAFbx*. After denervation, both *MAFbx* and *MuRF1* expression are upregulated in all muscle fibers. Figures 31A-31C(A).

Muscle mass from *MAFbx* and *MuRF1* deficient was compared to wild type (+/+) mice, and it was found that the mice maintain muscle mass after denervation, as compared to wild type (+/+) mice. The right hindlimb muscles of adult mice (*MAFbx* +/+ and -/-) were denervated by cutting the right sciatic nerve. The left hindlimb of each animal served as its own control. At 7 and 14 days following denervation, the right and left gastrocnemius muscle complex (GA) was removed and weighed. Muscle weights (GA) are plotted as a percent of control, calculated as the right /left muscle weights Data are means  $\pm$  s.e.m., n = 5-10 mice. Figures 30A-30D(B).

Muscle fiber size and variability were maintained in muscles from *MAFbx* deficient mice after denervation. Cross-sections taken from the tibialis anterior muscle were stained with an antibody against laminin (Sigma). In Figures 30A-30D(C), representative cross-sections are shown from the tibialis anterior: wild type (+/+), control left-side (upper left); wild type (+/+), 14-day denervated right side (lower

WO 02/061046

PCT/US02/02811

left); homozygous (-/-), control left side (upper right); homozygous, 14-day denervated right side.

5 For a detailed description of the methodologies that may be employed in the creation of knockout animals, as discussed herein, see United States Application Serial No. 09/732,234 filed December 7, 2000 which claims priority to United States Application Serial No. 60/244,665 filed October 31, 2000, the contents of which is hereby incorporated by reference.

0 Through out this application, the terminology MURF1 and MURF3 are used, as is MAFbx. In our previously filed priority applications, the terminology MA-16 And MAFBX were used. The change in terms represents a change in nomenclature and the molecules will be more accurately identified by their sequences.

5

#### **Deposit of Biological Material**

The following clones were deposited with the American Type Culture Collection (ATCC®), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, on December 10, 0 1999:

<u>Clone</u>	<u>Patent Deposit Designation</u>
Human MA61K8 in Stratagene T3/T7 vector	PTA-1048
5 Human MA16 C8 in Stratagene T3/T7 vector	PTA-1049
Human MA61D18 in Stratagene T3/T7 vector	PTA-1050

The present invention is not to be limited in scope by the specific embodiments described herein. Indeed, various modifications of the invention in addition to those 0 described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description and accompanying figures.

WO 02/061046

PCT/US02/02811

We claim

- 5 1. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence which encodes a protein comprising the amino acid sequence as set forth in Figure 7, 9, and 17.
2. An isolated nucleic acid molecule which encodes MURF1, or a fragment thereof, having a sequence selected from the group consisting of
- 0 a) the nucleotide sequence comprising the coding region of MURF1 as set forth in Figure 6, 8, or 17;
- (b) a nucleotide sequence who complement hybridizes under stringent conditions to the nucleotide sequences of (a) and which encodes a molecule having the biological activity of MURF1; or
- 5 (c) a nucleotide sequence which, but for the degeneracy of the genetic code would hybridize to a complement of the nucleotide sequence of (a) or the complement of (b), and which encodes a molecule having the biological activity of MURF1.
- 0 3. An isolated nucleic acid molecule which is derived from a mammalian genome that:
- a) hybridizes under stringent conditions to the nucleic acid molecule of Figure 6, 8, or 16; and
- 5 b) encodes a gene product which contains a ring domain
4. An isolated nucleic acid molecule which encodes MURF1, or a fragment thereof, having a sequence selected from the group consisting of
- a) the nucleotide sequence comprising the coding region of MURF1 as set
- 0 forth in Figure 6, 8, or 16;
- (b) a nucleotide sequence who complement hybridizes under stringent conditions to the nucleotide sequences of (a) and which encodes a molecule having the biological activity of MURF1; or
- 5 (c) a nucleotide sequence which, but for the degeneracy of the genetic code would hybridize to a complement of the nucleotide sequence of (a) or the complement of (b), and which encodes a molecule having the biological activity of MURF1; and

WO 02/061046

PCT/US02/02811

(d) does not encompass the nucleotide sequences which encodes MURF3  
(Figure 21)

- 5 5. An isolated polypeptide encoded by the nucleic acid molecule of claim 1,2,3, or 4.
6. A vector which comprises a nucleic acid molecule of claim 1, 2, 3, or 4.
7. A vector according to claim 6, wherein the nucleic acid molecule is operatively  
0 linked to an expression control sequence capable of directing its expression in a host  
cell.
8. A host-vector system for the production of MURF1 polypeptide which comprises  
a host cell transformed with the vector of claim 6.
- 5 9. A host-vector system according to claim 8 wherein the host cell is a bacterial,  
yeast, insect or mammalian cell.
10. A transgenic animal having cells which harbor a transgene comprising the nucleic  
0 acid of Claims 1,2,3, or 4.
11. An animal inactivated in the loci comprising the nucleotide sequence of claims  
1,2,3,or 4.
- 5 12. An antibody which binds the MURF1 polypeptide of claim 5.
13. A MURF1 antagonist for use in a method of inhibiting atrophy, inducing  
hypertrophy, decreasing ubiquitination, interfering with the ubiquitin pathway,  
or modulating MURF1 expression or activity.
- 0 14. An antagonist of the MURF1 pathway for use in a method of inhibiting atrophy,  
inducing hypertrophy, decreasing ubiquitination, interfering with the ubiquitin  
pathway, or modulating MURF1 expression or activity.
- 5 15.A method of screening compounds useful for the treatment of muscle atrophy or  
detecting atrophy and related diseases and disorders comprising contacting a muscle  
cell expressing MURF1 with a compound and detecting a change in the MURF1

WO 02/061046

PCT/US02/02811

protein activity or ubiquitination.

16. The method of claim 15 wherein the change is measured by PCR, Taqman PCR,  
5 phage display systems, gel electrophoresis, yeast-two hybrid assay, Northern or  
Western analysis, immunohistochemistry, a conventional scintillation camera, a  
gamma camera, a rectilinear scanner, a PET scanner, a SPECT scanner, a MRI  
scanner, a NMR scanner, or an X-ray machine.
17. The method of claim 15 where in the change in MURF1 protein activity is  
0 detected by detecting a change in the interaction of MURF1 with one or more  
proteins, by detecting a change in the interaction of the ring domain with another  
protein, or by detecting a change in the level of ubiquitination of one or more of the  
proteins in the ubiquitin pathway.
18. The method of claim 15 in which one of the one or more proteins is the substrate  
5 of MURF1.
19. The method of claim 15 wherein the muscle cell is of skeletal muscle origin.
20. The method of claim 15 wherein the muscle cells are cultured cells.  
0
21. The method of claim 15 wherein the muscle cells are obtained from a transgenic  
organism.
22. The method of claim 21 wherein the transgenic organism includes, but is not  
5 limited to a mouse, rat, rabbit, sheep, cow or primate.
23. The method of claim 15 wherein the muscle cells are within a transgenic  
organism.  
0
24. The method of claim 23 wherein the transgenic organism includes, but is not  
limited to a mouse, rat, rabbit, sheep, cow or primate.
25. The method of claim 15 wherein the MURF1 and the molecule capable of  
5 detecting MURF1 are nucleic acids.
26. The method of claim 15 wherein the MURF1 and the molecule capable of

WO 02/061046

PCT/US02/02811

detecting MURF1 are polypeptides.

27. The method of claim 15 wherein the compound is a substrate for MURF1.
- 5 28. The method of claim 15 wherein the change in protein expression is  
demonstrated by a change in amount of protein of one or more of the proteins  
in the ubiquitin pathway.
- 0 29. A method of detecting muscle atrophy in an animal comprising measuring  
MURF1 in a patient sample.
30. A method of inhibiting atrophy or inducing hypertrophy by modulating MURF1  
or a ring domain thereof.
- 5 31. A method of treating illnesses, syndromes or disorders associated with muscle  
atrophy comprising administering to an animal a compound that modulates the  
MURF1 pathway, ubiquitination, the expression or activity of MURF1 or the ring  
domain of MURF1, such that symptoms are alleviated.
- 0 32. The method of claim 31 such that the animal is a mammal.
33. The method of claim 31 such that the mammal is a human.
33. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence which  
5 encodes a protein comprising the amino acid sequence as set forth in Figure 22
34. An isolated nucleic acid molecule which encodes MURF3, or a fragment thereof,  
having a sequence selected from the group consisting of  
a) the nucleotide sequence comprising the coding region of MURF1 as set  
0 forth in Figure 21;  
(b) a nucleotide sequence who complement hybridizes under stringent  
conditions to the nucleotide sequences of (a) and which encodes a molecule having  
the biological activity of MURF3; or  
(c) a nucleotide sequence which, but for the degeneracy of the genetic code  
5 would hybridize to a complement of the nucleotide sequence of (a) or the  
complement of (b), and which encodes a molecule having the biological activity of  
MURF3.

WO 02/061046

PCT/US02/02811

35. An isolated nucleic acid molecule which is derived from a mammalian genome that:
- 5           a) hybridizes under stringent conditions to the nucleic acid molecule of Sfigure 21; and  
          b) encodes a gene product which contains a ring domain
36. An isolated nucleic acid molecule which encodes MURF3, or a fragment thereof ,  
0   having a sequence selected from the group consisting of  
          a) the nucleotide sequence comprising the coding region of MURF1 as set forth in SEQ. ID. NO 7;  
          (b) a nucleotide sequence who complement hybridizes under stringent conditions to the nucleotide sequences of (a) and which encodes a molecule having  
5   the biological activity of MURF3; or  
          (e) a nucleotide sequence which, but for the degeneracy of the genetic code would hybridize to a complement of the nucleotide sequence of (a) or the complement of (b), and which encodes a molecule having the biological activity of MURF3; and  
0   (f) does not encompass the nucleotide sequences which encodes MURF1 (Figure 6, 8, or 16).
37. An isolated polypeptide encoded by the nucleic acid molecule of claim 33, 34, 35, or 36.  
5
38. A vector which comprises a nucleic acid molecule of claim 33,34, 35, or 36.
39. A vector according to claim 39, wherein the nucleic acid molecule is operatively linked to an expression control sequence capable of directing its expression in a host  
0   cell.
40. A host-vector system for the production of MURF3 polypeptide which comprises a host cell transformed with the vector of claim 38.
- 5   41. A host-vector system according to claim 40 wherein the host cell is a bacterial, yeast, insect or mammalian cell.

WO 02/061046

PCT/US02/02811

42. A transgenic animal having cells which harbor a transgene comprising the nucleic acid of Claim 33,34, 35, or 36.
43. An animal inactivated in the loci comprising the nucleotide sequence of claim 5 33,34, 35, or 36.
44. An antibody which binds the MURF3 polypeptide of claim 37.
45. A MURF3 antagonist for use in a method of inhibiting atrophy, inducing 0 hypertrophy, decreasing ubiquitination, interfering with the ubiquitin pathway, or modulating MURF3 expression or activity.
46. An antagonist of the MURF3 pathway for use in a method of inhibiting atrophy, 5 inducing hypertrophy, decreasing ubiquitination, interfering with the ubiquitin pathway, or modulating MURF3 expression or activity.
47. A method of screening compounds useful for the treatment of muscle atrophy or detecting atrophy and related diseases and disorders comprising contacting a 0 muscle cell expressing MURF3 with a compound and detecting a change in the MURF3 protein activity or ubiquitination.
48. The method of claim 47 wherein the change is measured by PCR, Taqman PCR, 5 phage display systems, gel electrophoresis, yeast-two hybrid assay, Northern or Western analysis, immunohistochemistry, a conventional scintillation camera, a gamma camera, a rectilinear scanner, a PET scanner, a SPECT scanner, a MRI scanner, a NMR scanner, or an X-ray machine.
49. The method of claim 47 where in the change in the MURF3 protein activity is 0 detected by detecting a change in the interaction of the MURF3 with one or more proteins, by detecting a change in the interaction of the ring domain with another protein, or by detecting a change in the level of ubiquitination of one or more of the proteins in the ubiquitin pathway.
50. The method of claim 47 in which one of the one or more proteins is the substrate 5 of MURF3.
51. The method of claim 47 wherein the muscle cell is of skeletal muscle origin.

WO 02/061046

PCT/US02/02811

52. The method of claim 47 wherein the muscle cells are cultured cells.
53. The method of claim 47 wherein the muscle cells are obtained from a transgenic  
5 organism.
54. The method of claim 53 wherein the transgenic organism includes, but is not  
limited to a mouse, rat, rabbit, sheep, cow or primate.
- 0 55. The method of claim 47 wherein the muscle cells are within a transgenic  
organism.
56. The method of claim 55 wherein the transgenic organism includes, but is not  
limited to a mouse, rat, rabbit, sheep, cow or primate.
- 5 57. The method of claim 47 wherein the MURF3 and the molecule capable of  
detecting MURF3 are nucleic acids.
- 0 58. The method of claim 47 wherein the MURF3 and the molecule capable of  
detecting MURF3 are polypeptides.
59. The method of claim 47 wherein the compound is a substrate for MURF3.
60. The method of claim 47 wherein the change in protein expression is  
5 demonstrated by a change in amount of protein of one or more of the proteins in  
the ubiquitin pathway.
61. A method of detecting muscle atrophy in an animal comprising measuring  
MURF3 in a patient sample.
- 0 62. A method of inhibiting atrophy or inducing hypertrophy by modulating MURF3  
or a ring domain thereof.
- 5 63. A method of treating illnesses, syndromes or disorders associated with muscle  
atrophy comprising administering to an animal a compound that modulates the  
MURF3 pathway, ubiquitination, the expression or activity of MURF3 such that  
symptoms are alleviated.

WO 02/061046

PCT/US02/02811

64. The method of claim 63 such that the animal is a mammal.
- 5 65. The method of claim 63 such that the mammal is a human.
66. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence which encodes a protein comprising the amino acid sequence as set forth in Figure 11, 13, or 19.
- 0 67. An isolated nucleic acid molecule which encodes MAFBX, or a fragment thereof, having a sequence selected from the group consisting of
- a) the nucleotide sequence comprising the coding region of MAFBX as set forth in Figure 10, 12, or 19;
  - 5 (b) a nucleotide sequence who complement hybridizes under stringent conditions to the nucleotide sequences of (a) and which encodes a molecule having the biological activity of MAFBX; or
  - 0 (c) a nucleotide sequence which, but for the degeneracy of the genetic code would hybridize to a complement of the nucleotide sequence of (a) or the complement of (b), and which encodes a molecule having the biological activity of MAFBX.
68. An isolated nucleic acid molecule which is derived from a mammalian genome that:
- 5 a) hybridizes under stringent conditions to the nucleic acid molecule of Figures 10, 12, or 18; and
  - b) encodes a gene product which contains an F-box domain
69. An isolated nucleic acid molecule which is derived from a mammalian genome that:
- 0 a) hybridizes under stringent conditions to the nucleic acid molecule of Figures 10, 12, or 18; and
  - 5 b) encodes a gene product which contains an Fbx25 domain
70. An isolated polypeptide encoded by the nucleic acid molecule of claim 66, 67, 68, or 69.

WO 02/061046

PCT/US02/02811

71. A vector which comprises a nucleic acid molecule of claim 66, 67, 68, or 69.
- 5 72. A vector according to claim 71, wherein the nucleic acid molecule is operatively  
linked to an expression control sequence capable of directing its expression in a host  
cell.
73. A host-vector system for the production of MAFBX polypeptide which  
0 comprises a host cell transformed with the vector of claim 6.
74. A host-vector system according to claim 73 wherein the host cell is a bacterial,  
yeast, insect or mammalian cell.
- 5 75. A transgenic animal having cells which harbor a transgene comprising the nucleic  
acid of Claims 66, 67, 68, or 69.
76. An animal inactivated in the loci comprising the nucleotide sequence of claims 66,  
67, 68, or 69.
- 0 77. An antibody which binds the MAFBX polypeptide of claim 70.
78. A MAFBX antagonist for use in a method of inhibiting atrophy, inducing  
hypertrophy, decreasing ubiquitination, interfering with the ubiquitin pathway,  
5 or modulating MAFBX expression or activity.
79. An antagonist of the MAFBX pathway for use in a method of inhibiting atrophy,  
inducing hypertrophy, decreasing ubiquitination, interfering with the ubiquitin  
0 pathway, or modulating MAFBX expression or activity.
80. A method of screening compounds useful for the treatment of muscle atrophy  
or detecting atrophy and related diseases and disorders comprising contacting a  
muscle cell expressing MAFBX with a compound and detecting a change in the  
MAFBX protein activity or ubiquitination.
- 5 81. The method of claim 80 wherein the change is measured by PCR, Taqman PCR,  
phage display systems, gel electrophoresis, yeast-two hybrid assay, Northern or

WO 02/061046

PCT/US02/02811

Western analysis, immunohistochemistry, a conventional scintillation camera, a gamma camera, a rectilinear scanner, a PET scanner, a SPECT scanner, a MRI scanner, a NMR scanner, or an X-ray machine.

- 5 82. The method of claim 80 where in the change in the MAFBX protein activity is detected by detecting a change in the interaction of the MAFBX with one or more proteins, or by detecting a change in the level of ubiquitination of one or more of the proteins in the ubiquitin pathway.
- 0 83. The method of claim 80 in which one of the one or more proteins is the substrate of MAFBX.
84. The method of claim 80 wherein the muscle cell is of skeletal origin.
- 5 85. The method of claim 80 wherein the muscle cells are cultured cells.
86. The method of claim 80 wherein the muscle cells are obtained from a transgenic organism.
- 0 87. The method of claim 86 wherein the transgenic organism includes, but is not limited to a mouse, rat, rabbit, sheep, cow or primate.
88. The method of claim 80 wherein the muscle cells are within a transgenic organism.
- 5 89. The method of claim 88 wherein the transgenic organism includes, but is not limited to a mouse, rat, rabbit, sheep, cow or primate.
- 0 90. The method of claim 80 wherein the MAFBX and the molecule capable of detecting MAFBX are nucleic acids.
91. The method of claim 80 wherein the MAFBX and the molecule capable of detecting MAFBX are polypeptides.
- 5 92. The method of claim 80 wherein the compound is a substrate for MAFBX.
93. The method of claim 80 wherein the change in protein expression is

WO 02/061046

PCT/US02/02811

demonstrated by a change in amount of protein of one or more of the proteins in the ubiquitin pathway.

- 5 94. A method of detecting muscle atrophy in an animal comprising measuring MAFBX protein or mRNA in a patient sample.
95. A method of inhibiting atrophy or inducing hypertrophy by modulating MAFBX or the F-box thereof.
- 0 96. A method of treating illnesses, syndromes or disorders associated with muscle atrophy comprising administering to an animal a compound that modulates the MAFBX pathway, ubiquitination, the expression or activity of MAFBX or the F-box of MFBX such that symptoms are alleviated.
- 5 97. The method of claim 96 such that the animal is a mammal.
98. The method of claim 96 such that the mammal is a human

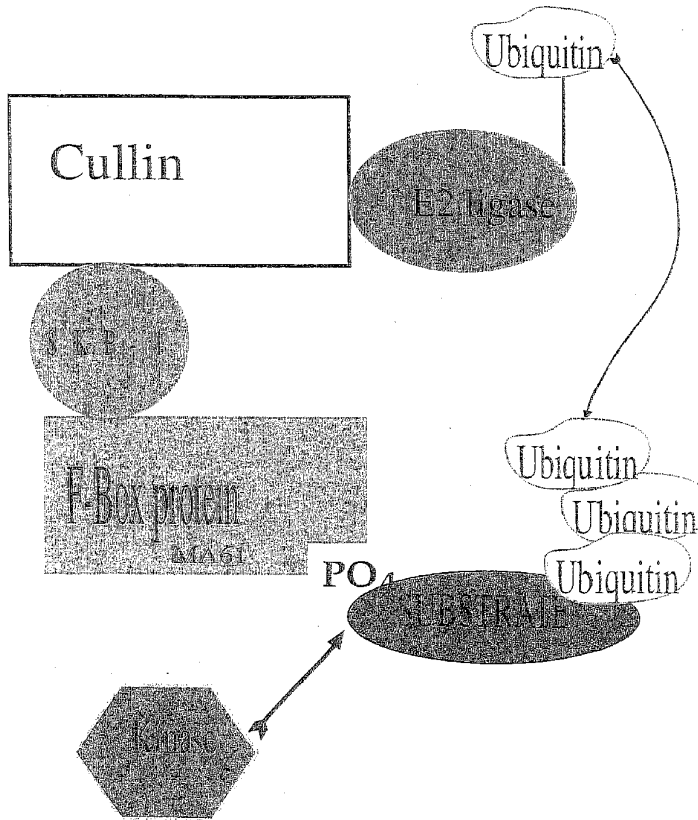
0

WO 02/061046

PCT/US02/02811

1/37  
FIGURE 1

MA61 - A part of the SCF E3 ubiquitin Ligase Complex





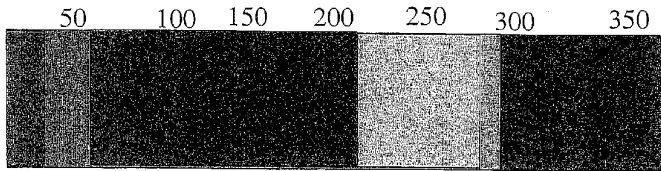
WO 02/061046

PCT/US02/02811

3/37

FIGURE 3

MA 61



Fbx25 Homology Domain (1-25; 86-360)



F-Box Domain (217-264)



Bipartite nuclear localization signal (262-279)

3/37

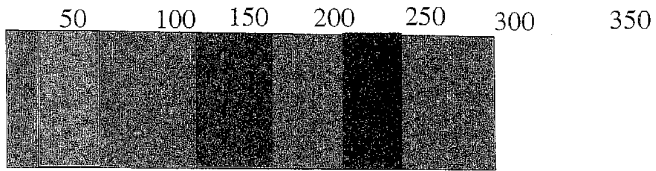
WO 02/061046


PCT/US02/02811

4/37


FIGURE 4

### Human MURF 1 schematic



 RING Finger Domain (26-82)

 BBOX (121-163)

 Spectrin Repeat (207-233)

4/37





WO 02/061046

PCT/US02/02811

7/37  
Figure 6

ATGGATTATAAATCTGGCTTGATTCGGGACGGGAAATGOTATGGAGAACCTGG  
AGAAGCAGCTCATCTGCCDDATCTGCTTGGAGATGTTTACCAAGCCTGTGGT  
CATCCTGCCCTGCCAGCACAACTCTGCCGGAAGTGTGCCAACGACATCTTC  
CAGGCTGDDAATCCCTACTGGACCAACGGGGTGGCTGGGTGCCATGCTGG  
AGGTGTTTTCCGCTGCCCTCGTCCCGCCATGAAGTGATCATGGACGGC  
ATG  
GGGTGTACGGTCTGCAGAGGAACTGCTGGTGGAGAACATCATGACATCTA  
CAAGCAGGAATGCTCCAGTCCGGCCCTGCAGAAAGGCAGCCACCCGATGTC  
AAGGAAACAGAAAGACGAGAAAATCAACATCTACTGTCTCACGTGGAGG  
CTG  
CCTACTTGTCTCTTGTGCAAGGTGTTGGGGCTCACCAGGCTGTGAAGTTC  
CCCCTTACAAAGCATCTTCCAAGGACAGAACTGAACTGAGCAATTGCAT  
CTCCATGCTGGTGGCAGGGAACGACCGAGTTCCAGACTATCATCTCCGAG  
CTG  
GAGGACTCTGCGAGTGAACCAAGGAAAACAGCCACCAGGTGAAGGAGCAA  
CTGAGCCACAAGTTTGAACGCCCTCTACGCCATCCTGGACGAGAAGAAGC  
GTG  
AGCTGCTGCAGCGGATCACTCAGGAGCAGGAGGAGAAGCTGGACTTCAT  
CGA  
GGCCCTGATCCTCCAGTACCGAGAGCAGTTGGAAAAGTGAACCAAGCTT  
CTG  
GAAAACAGCCATCCAGTCCCTGGATGAGCCGGGAGGGGCCACCTTCTCT  
TGA  
GTGCCAAGCCGCTCATCAAGAGCATTGTAGAAGCTTCCAAAGGGCTGCCA  
CGT  
GGGGAAGACAGAACAAAGGCTTTGAGAACATGGACTACTTTACTCTGAA  
TTT  
AGAACACATAGCAGAGGCCCTTGGGGCCATCGACTTTGGACAGATGAG  
GAG  
GAGGAGTTTACTGAAGAGGAGGAGGAGGAGGATCAAGAAAGGGCGTGTCC  
ACAGAGGGACACCAA

7/37

WO 02/061046

PCT/US02/02811

8/37  
Figure 7

MDYKSGSLIPDGNAMENLEKQLICPICLEMFTKPVVILPCQHNLCKCANDIFQAAN  
PYWTRNGGSSVSMGGFRFCPSORHEVIMDRHGVIYGLQRNLLVENIIDYKQECSS  
RPLOKGSHPMCKEHEDEKINIVCLTCEVPTCSLOKVFGAHQACEVAPLQSIHQGG  
KTELSNOCISMLVAGNDRVQTIISQLEDSORVTKENSHQVKEELSHKFDALYAILDE  
KKSELLQRITQEQEEKLDFEALILQYREOLEKSTKLIVETAIQSLDEPGGATFLLSA  
KPLKSIIVEASKGQQLGKTEQGPFENMDYFTLNLEHIAEALRAIDFGTDEEEFT EEE  
EEEDOEEGVSTEGHQ

8/37

WO 02/061046

PCT/US02/02811

9/37  
Figure 8A

```

10      20      30      40      50
TTCTCAGGTACTTTATCGGACCTCTCACATGGCTGCATGCCCCAGAAATGT
60      70      80      90      100
GATGATATTGTTGACAGCCTCTTCAAGGGTTTGGTGAACCTGAGGCCAA
110     120     130     140     150
AGGTTTCCCTCTTCTCAAAGGTATCTCCACCTCTTCCCAAGCAGCAGCA
160     170     180     190     200
AAGTTAGGCTCACCTCGTCTTATGTAAGGATGCGTAGGGATGGGAGG
210     220     230     240     250
GCGATGAGGACTAGGATGATGCCGGCAGGATAGTTCAGACGGTTCCAT
260     270     280     290     300
TTCCTGAGCGTCTGAGAGTPTAGTATTAGTTAGTTTGTGTGAGTFTA
310     320     330     340     350
GAATTCGGGCACCAGGAGAAGGAAGCCAACAGGATCCGACCCGGTPTTT
360     370     380     390     400
GTGACAAAGCCAAAGACCCAGSTACTTAGAGCAAAGTTAGTAGAGGA
410     420     430     440     450
GGCAGCTAGGCGTGGCTCTCATTTCTCCACAGAATGATTTTAAAGTCG
460     470     480     490     500
AGCCTGATCCAGGATGGGAATCCCATGGAGAACTTGGAGAAGCAGCTGAT
510     520     530     540     550
CTGCCCTATCTGCCCTGGAGATGTTTACCAGCCAGTGGTCATCTTGCCGT
560     570     580     590     600
GCCAGCAACAACCTGTGCGGAGTGTGCCAATGACATCTTCCAGGCTGCA
610     620     630     640     650
AATCCCTACTGGACCAGCCGGGSCAGCTCAGTGTCCATGCTGGAGGCCG
660     670     680     690     700
TTTCCGCTGCCCCACCTGCCGCCACGAGGTGATCATGGATCGTCACGGAG
710     720     730     740     750
TGTACGGCTGCGAGAGAACCTGCTGGTGGAGAACATCATCGACATCTAC
760     770     780     790     800
AAACAGGAGTGTCCAGCTGSSCCGCTGCAGAAAGGGCAGTACCCCATGTTG
810     820     830     840     850
CAAGGAGCACGAAGATGGAATAATCAACATCTACTGTCTCACGTGTGAGS
860     870     880     890     900
TGCCCACTGCTCCATGTCAAGGTGTTTGGGATCCCAAGGCCCTGCGAG
910     920     930     940     950
GTGGCCCATGTCAGACTGTCTTCCAGGGACAAAAGACTGAACCTGAATAA

```

9/37

WO 02/061046

PCT/US02/02811

10/37  
Figure 8B

960 970 980 990 1000  
CTGTATCTCCATGCTGGTGGCGGGGAATGACCGTGTGCAGACCATCATCA

1010 1020 1030 1040 1050  
CTCAGCTGGAGGATTCCCTTCGAGTGCACCAAGGAGAACAGTCCACAGGTA

1060 1070 1080 1090 1100  
AAGGAAGAGCTGAGCCAGAAGTTGACACGTTGTATGCCATCTGGATGA

1110 1120 1130 1140 1150  
GAAGAAAGTGTAGTGTGCTGCAGCGGATCAGCGAGGACAGGAGAAAGC

1160 1170 1180 1190 1200  
TTAGCTTCATCCAGGCCCTCATCCAGCAGTACCAGGAGCAGCTGGACAAG

1210 1220 1230 1240 1250  
TCCACAAAGCTGTGAAACTGCCATCCAGTCCCTGGACGAGCCTGGGGG

1260 1270 1280 1290 1300  
AGCCACCTTCCCTGTGACTGCCAAGCACTCATCAAGGCATTTGTGGAAG

1310 1320 1330 1340 1350  
CTTCCAAAGGCTGCCAGCTGGGGAAAGACAGCAGGCGCTTTGAGAACATG

1360 1370 1380 1390 1400  
GACTCTTTTACTTTGGATTTAGAGCACATAGCAGACGCCCTGAGAGCCAT

1410 1420 1430 1440 1450  
TGACTTTGGGACAGATGAGGAAGAGGAAGATTCATTGAAAGAGAGATC

1460 1470 1480 1490 1500  
AGGAAGAGGAAGAGTCCACAGAAGGGAAGGAAGAGGACACCAGTAAGGA

1510 1520 1530 1540 1550  
GCTGGATGATGAGAGGCCCCAGATGCAGAGAGACTGGAGAGGGTGGGG

1560 1570 1580 1590 1600  
AGGGGCCAGGGCCCTTGGTGACAGGCCAGGGTGGGAGGGGTGGGGCC

1610 1620 1630 1640 1650  
CCTGGAGGGGCAATGGGGAGGTGATGCTTCTCTCTGTCTAGAGAGCAGG

1660 1670 1680 1690 1700  
GACTAGGGTACGACCCCTCACCGCTGGTCCAGCAGACACTGAACCAGAT

1710 1720 1730 1740 1750  
TGGAAACGTGCTTGAACAAATCACACAGGACACTTTTCTACATTTGTTGCA

1760 1770 1780 1790 1800  
AAATGGAAATTTTGTACATTTTAAATGTGATTTTGTATATACTTGT

1810 1820 1830 1840 1850  
ATATCTATGCCAATTTGGTCTTTTGTAAAGGAACTTTGTATAATAAT

1860 1870 1880 1890 1900  
CCCTGGTCGTTGGGTGACCTGCGATTTGTCAGAAAGAGGGGAAGGAAGCCA

WO 02/061046

PCT/US02/02811

11/37  
Figure 8C

1910	1920	1930	1940	1950
GGTGTGATACAGCTGCCCACTTCCTTTCCTGAGCAGGAGGATGGGGTAGCA				
1960	1970	1980	1990	2000
CTCACAGGGACGATGTGCTGTATTTCACTGCCTATCCAGACATACGGGG				
2010	2020	2030	2040	2050
TGCTAACTGAGTTTCGTTATATCTTGTTTTAAATAATGCACAATGCTCT				
2060	2070	2080	2090	
CTTCCTGTTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA				

WO 02/061046

PCT/US02/02811

12/37

Figure 9

MENLEKQLICPICLEMFTKPVVILPCOHNLCRKCANDIFQAANPYWTSRGSSVSM  
SGGRFRCPTCRHEVIMDRHGVYGLQRNLLVENIIDYKQECSSRPLQKGSHPMCK  
EHEDEKINICYCLTCEVPTCSMCKVFGIHKACEVAPLQSVFQGGKTELNNCISMLV  
AGNDRVQTITQLEDSRRVTKENSHQVKEELSQKFDLYAILDEKKSELLQRITQE  
QEEKLSFIEALIQYQEQLDKSTKLVETAIQSLDEPGGATFLLTAKQLIKSIVEASK  
GCQLGKTEQGFENMDFFLDLEHIADALRAIDFGTDEEEEFEEEDQEEESSTEG  
KEEGHQ

12/37

WO 02/061046

PCT/US02/02811

13/37  
Figure 10

ATBCCGTTCCCTGGTCAGGACTGGCGGTCCCGGGCCAGAGCTGGGTGAA.GAC  
GGCGGACGGCTGGAAGCGCTTCTTGGATGAGAAAAGCGGCACCTTCGTG.AGC  
GACCTCAGCAGTTACTGCAACAAGGAGAATCTGTTCAACAGCCTGAACTAC  
GATGTTGCAGCCAAGAAGAGAAAAGAAAGACATACAGAACAGCAAAACCAA  
AACTCAGTATTTCCATCAGGAGAAGTGGATCTATGTTCAAAAAGGGAGTAC  
TAAGGAGCGCCATGATACTGCACCTTTGGGGGAAGCTTTCAACAGACTG.GAC  
TTCTCGACTGCCATCCTGGATTCCAGAAGATTCAACTACGTAGTAAGGC.TGT  
TGGAGCTGATAGCAAAGTCACAGCTCACATCCCTGAGTGGCATCGCCCAAAA  
GAACTTCATGAACATTTTGGAAAAAGTAGTACTGAAAGTTCTTGAAGACDA  
GCAAAACATAAGACTCATACGGGAACCTTCCAGACCCCTCACACATCCTT  
ATGCACGCTGGTCCAGAGAGTCGGCAAGTCCGTGCTGGTGGCAACATC.AAC  
ATGTGGCTGTATCGAATGGAGACCACTCTACACTGGCAACAGCAGGTG.ACA  
GCATCCAGATCAGCAGGCGCGCTTCAAAGGTCTCACGATCACCGAACC.CCC  
TGTGTGCTTACAACGAAACATCATGCAGAGGCTGAGCGATGGGCGGGAC.CTG  
GTCAGCCTGGCCAGGCCAGCCCCAGACCTGCATGTGCTCAGTGAAGACCCGGC  
TACTGTGGAAGAGACTCTGCCAGTACCCTTCTCAGAGGGCCAGATCCG.CAA  
GCGATTGATCTTGTCTGACAAAGGGCAGCTGGATTGGAAGAAGATGTACTTT  
AAGCTTGTCCGATGTTACCCAAGAAGAGAAACAGTATGGGGTACCCCTGC.AGC  
TTTGCAAACACTGCCACATTCCTCTCTGGAAGGGCACTBACCATCCATG.CAC  
GGCCAAACCCAGAGAGCTGCTCCGTCTCACTTTCACCCCAAGACTTTATT  
AACTTGTCAAGTTC

WO 02/061046

PCT/US02/02811

14/37  
Figure 11

MPFLGQDWSPGQSWVKTADGWKRFLDEKSGTFVSDLSSYONKENLNFSLNYD  
VAAKKRKKDIQNSKTKTQYFHQEKWIYVHKGSTKERHGYCTLGEAFNRIDFSTAI  
LDSRRFNYYVRLLELIAKSQLTSLSGIAQKNFMNILEKVVVKVLEDOQNIRURELL  
QTLYTSLCTLVQRVVGKSVLVGNINMWWYRMEITLHWQQQLNSIQSRPAFKGLTI  
TDLPVCLQNLIMQRISDGRDLVSLGQAAPDLHVLSERLLWKRLQCYHFSERCIR  
KRLLSDKGLDWWKMYFKLVRCYPRREQYGVTLQLOKHCHILSWKGTDPCTAN  
NPESCSVSLSPQDFINLFKF

14/37

WO 02/061046

PCT/US02/02811

15/37  
Figure 12

ATGCCATTCCTGGGGCAGGACTGGGGTCCCGGGCAGAACTGGGTGAA GA  
CGGCCGACGGCTGGAAAGCGCTTCTGGATGAGAAGAGCGGCAGTTTGGTGA  
CGACCTCAGCAGTTACTGCAACAAGGAGGTATACAATAAGGAGAATCTTTT  
CAACAGCCTGAACTATGATGTTGCAGCCAAGAGAGAAAGAGACATGCT  
GAATAGCAAAACCAAACTCAGTATTTCCACCAAGAAAAATGGATCTA TGT  
TCACAAAGGAAGTACTAAAGAGCGCCATGGATATTGCACCCCTGGGGAA GC  
TTTCAACAGACTGGACTTCTCAACTGCCATTCTGGATTCCAGAAGATTT AAC  
TAOGTGTCCGGCTGTTGGAGCTGATAGCAAAGTCACAGCTCACATCCC TGA  
GTGGCATCGCCAAAAGAACTTCATGAATATTTGGAAAAAGTGGTACT GA  
AAGTCCCTTGAAGACCAGCAAAACATTAGACTAATAAGGGAACACTCC AGA  
CCCTCTACACATCCTTATGTACACTGGTCCAAAGAGTCGGCAAGTCTGT CCT  
GGTCGGGAACATTAACATGTGGGTGATCGGATGGAGACGATTCTCCAC TGG  
CAGCAGCAGCTGAACAACAATCAGATCACAGGCTGCCCTTCAAAGGCC TCA  
CCTTCACTGACCTGCCCTTGTGCCTACAACCTGAACATCATGCAGAGGCT CAG  
CGACGGGGGGGACCTGGTCAGCCTGGGCCAGGCTGCCCGGACCTGCACG TGC  
TCAGCGAAGACCGGCTGCTGTGGAAGAACTCTGCCAGTACCCTTCTC CGA  
GCGGCAGATCCGCAAACGATTAATCTGTCCAGACAAAGGGCAGCTGGAT TGG  
AAGAAATGATATTTCAAACCTTGTCCGATGTTACCCAAGGAAAGAGCAG TAT  
GGAGATACCCTTCAGCTCTGCAAACTGTCCACATCCTTTCTGGAAAGG GCA  
CTGACCATCCGTGCACTGCCAATAACCCAGAGAGCTGCTCCGTTTCACT TTG  
A

WO 02/061046

PCT/US02/02811

16/37  
Figure 13

SEQ. ID NO. 10:

MPFLGQDWRSFGQNWVKTADGWKRFLDEKSGSFVSDLSSYCNKEYNKENLFN  
SLNYDVAAKKPKKIDMLNSKTKQYFHQEKWIYVHKGSTKERHGYCTLGEAFNRL  
DFSTAILDSRRFNYYVRLLELIAKSOLTSLSGIAQKNFMNILEKVVLKVLLEDQONI  
RLIRELLQTLYTSLCTLVQRVGGKSVLVGNINMWVYRMETILHWQQQLNIIQITRP  
AFKGLTFTDLPLQLNIMQRLSDGRRDLVSLGQAAPDLHVLSEDRLLWKKLCCQYH  
FSEKQIRKRLILSDKGLDWWKMYFKLVROYPRKEQYGDTLQLCKHCHILSWI<GT  
DHPCTANNPESCSVSL

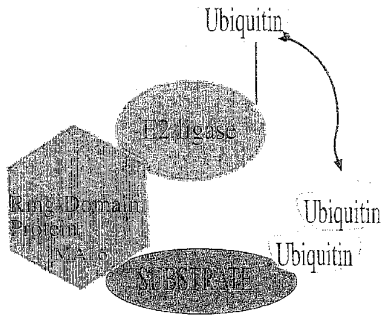


WO 02/061046

PCT/US02/02811

18/37  
FIGURE 15

### MA16 - A Monomeric Ring Ubiquitin Ligase



WO 02/061046

PCT/US02/02811

19/37  
Figure 15

ATGGACTACAAAGACGATGAAGACAAAGATTATAAATCTGGCTTGATTCGG  
GACGGAAATGCTATGGAGAACCTGGAGAAAGCAGCTCATCTGCCCCATCTGGCC  
TTGAGATGTTTACCAAGCCTGTGGTCATCCTGCCCTGCCAGCACAAACCTCTG  
CCGGAAGTGTGCCAACGACATCTTCCAGGCTGCCAATCCCTACTGGACCAAC  
CGGGTGGCTCGGTGTCCATGTCTGGAGGTGTTTTCCGCTGCCCTCGTGC  
CCATGAAGTGATCATGACCGGCATGGGGTGTACGGTCTGCAGAGGAACCTG  
CTGGTGGAGAACATCATCGACATCTACAAGCAGGAATGCTCCAGTGGGCCCG  
TGCAGAAAGGCAGCCACCCGATGTGCAAGGAACACGAAGACGAGAAAAACA  
ACATCTACTGTCTCACGTGGAGGTGCCCTACTTGTCTTGTGCAAGGTGTTG  
GGGGCTCACCAGGCCTGTGAAGTTGCCCTTACAAGCATCTTCCAAGCAC  
AGAAGACTGAACTGAGCAATTGCATCTCCATGCTGGTGGCAGGGAACGACCG  
AGTTCCAGACTATCATCTGCCAGCTGGAGGACTCCTGCCGAGTGACCAAGGTG  
AGGGTG

WO 02/061046

PCT/US02/02811

20/37  
Figure 17

DYKSGLPDGNAMENLEKQLIOPICLEMFTKPVVILPCQHNLCKANDIFQAANP  
YWTNRGGSVSMGGRFRCPSCRHEVIMDRHGVYGLQRNLLVENIIDYKQECSSR  
PLQKGSHPMCKEHEDEKINIYCLTCEVPTCSLCKVFGAHQACEVAPLQSIFQGQK  
TELSNCISMLVAGNDRVQTIISQLEDSRVTKVRV

20/37

WO 02/061046

PCT/US02/02811

21/37  
Figure 18

ATGCCATTCTCGGGCAGGACTGGCGGTCCCCCGGGCAGAAGTGGGTGAA GA  
CGGCGAOCGGCTGGAAGCGCTTCTGGATGAGAAGAGCGGCAGTTTCGTGAG  
CGACCTCAGCAGTTACTGCAACAAGGAGGTATACAATAAGGAGAATCTTTT  
CAACAGCCTGAACTATGATGTTGCAGCCAAAGAAAGAAAAGGACATGCT  
GAATAGCAAACDAAAACCTCAGTATTTCCACCAAGAAAAATGGATCTATGT  
TCACAAAGGAAGTACTAAAGAGCGCCATGGATATTGCACCCCTGGGGAA GC  
TTTCAACAGACTGGACTTCTCAACTGCCATTCTGGATTCCAGAAGATTTAAC  
TACGTGGTCCGGCTGTTGGAGCTGATAGCAAAGTCACAGCTCACATCCCTGA  
GTGGCATCGCCAAAAGAACTTCATGAATATTTTGGAAAAAGTGGTACTGA  
AAGTCOTTGAAGACCAGCAAAACATTAGACTAATAAGGGAAGTACTCCAGA  
CCCTCTACACATCCTTATGTACACTGGTCCAAAGAGTCGGCAAGTCTGTGCT  
GGTCGGGAACATTAACATGTGGGTGTATCGGATGGAGACGATTCTCCACTGG  
CAGCAGCAGCTGAACAACATTGAGATCACCCAGGCCTGCCITCAAAGGCCTCA  
CCTTCACTGACCTGCCCTTTGTGCTACAACCTGAACATCATGCAGAGGCTGAG  
CGACGGCGGGGAACTGCTCAGCCTGGGCCAGGCTGCCCCGACCTGCACGTGC  
TCAGCGAAGACCGGCTGCTGTGGAAGAACTCTGCDAGTACCCTTCTC CGA  
GCGGCAGATCCGCAAACGATTAATTCTGTGACACAAAGGGCAGCTGGATTGG  
AAGAAGATGTATTTCAAACCTGTCCGATGTTACCCAAGGAAAGAGCAG TAT  
GGAGATACCCTTCACTCTGCAAACTGTCCACATCCTTCTCTGGAAGG GCA  
CTGACCATCCGTGCACTGCCAATAACCCAGAGAGCTGCTCCGTTTCACT TTC  
ACCCGAGGACTTTATCAACTTGTTCAGTTC

WO 02/061046

PCT/US02/02811

22/37

Figure 19

MPFLGQDWRS PGQNWVKTADGWKRFLDEKSGSFVSDLSSYCNKEYNKENLFN  
SLNYDVAAKKPKKMDLNSKTKTQYFHQEKWIYVHKGSTKERHGYCTLGEAFNRL  
DFSTAILDSRRFNYYVRIILELIAKSQLTSLSGIAQKNFMNILEKVVLKVLQEQNI  
RLIRELLQTLYTSLCTLVQRVKGKSVLVGNINMWWYRIMETLHWQQQLNNIQITRP  
AFKGLTFTDLPLCLQLNIMQRLSDGRDLVSLGQAAPDLHVLSEDRLLWKKLCCQYH  
FSERQIRKRLILSDKGLDWKKMYFKLVROYPRKEQYGDTLQLCKHCHILSWKGT  
DHPCTANNPESCSVSLSPQDFINLKF

22/37



WO 02/061046

PCT/US02/02811

24/37  
Figure 21

ATGAACTTCACAGTGGGTTTCAAGCCGCTGCTAGGGGATGCACACAGCATGG  
ACAACCTGGAGAAGCAGCTCATCTGCCCATCTGCCTGGAGATGTTCTCCAA  
ACCACTGGTGATCCTGCCCTGCCAACACAACCTGTGCGCAAAATGTGCCAAC  
GACGTCTTCCAGGCCCTCGAATCCTCTATGGCAGTCCCGGGCTCCACCCTGT  
GTCTTCAGGAGGCCGTTTCCGCTGCCCATGTCGACGGCATGAGGTTGTCTGG  
ACAGACACGGTGTCTACGGCCTGCAGCGAAAACCTGCTAGTGGAGAACATTTAT  
CGACATTTACAAGCAGGAGTCATCCAGGCCGCTGCACCTCCAAAGGCTGAGCAG  
CACTCATGTGCGAGGAGCATGAAGAAGAGAAGATCAATATTTACTGCTG  
AGCTGTGAGGTGCCACCTGCTCTCTGCAAGGTCTTCCGTGCCACAAAGG  
ACTGTGAGGTGGCCCCACTGCCACCATTTACAAACGCCAGAGAGTGAAGCT  
CAGCGATGGCATCGCGATGCTGGTGGCAGGCCAATGACCGCGTGCAAGCACTG  
ATCADACAGATGGAGGAGGTGTGCCAGACTATCGAGGACAATAGCCGGAGGC  
AGAAGCAGTTGTTAAACCAGAGGTTTGAAGGCTGTGCGCAGTGTGGAAGGA  
GCGCAAGGGTGAGCTGCTGCAGGCGCTGGCCCGGGAGCAAGAGGAGAAGCTG  
CAGGCGCTCCCGGCCCTCATCCGTCAGTATGGCGACCCACTGGAGGCTCTCT  
TAAGCTGGTGGAGTCTGCCATCCAGTCCATGGAAGAGCCACAATGGCGCTG  
TATCTCCAGCAGGCCAAGGAGCTGATCAATAAG

24/37

WO 02/061046

PCT/US02/02811

25/27  
Figure 22

MNFTYGFKPLLGDHSMNLEKQLICPICLEMFSKPVVILPCQHNLRKCANVYF  
QASNPLWQSRGSTTVSSGGRFRCPSCRHEVLDRHGVYGLQRNLLVENIIDYKQ  
ESSRPLHSAEQHLMOEHEHEEKINIYCLSCVPTCSLCKVFGAHHKCEVAPLPTI  
YKRQKSELSDGIAMLVAGNDRVQAVITOMEEVCQTIEDNSRRQKQLLNORFESLC  
AVLEERKGELLQALAREQEEKLQVRVRLRQYGDHLEASSKLVESAIOSMEEPQM  
ALYLQQAQELINK

25/37

MA1	+4x	KIAA1401
MA2	+3x	Novel, similar to dEST 714698
MA3	+10x	Histone deacetylase 4
MA4	+3x	AKO23151
MA5	+3x	AW91913 (has UBX domain)
MA6	+3x	Acyl-CoA dehydrogenase
MA7	+3x	Stat5b
MA8	+3x	AML1
MA9	+6x	PC3
MA10	+5x	MUC20
MA11	+4x	MURF1
MA12	+4x	Novel, similar to dEST id: 5098739
MA13	+10x	SLMOIC; Intermediate filament pro.
MA14	+3x	Hsp 86
MA15	+3x	20S proteasome regulatory subunit
MA16	+11x	PRK1703
MA17	+3x	UFG; membrane-bound, alpha chain
MA18	+4x	= MA61 = IIA/Bx
MA19	+8x	Acetylcholine receptor, alpha subunit
MA20	+10x	mCARP
MA21	+7x	CD24 heat stable antigen, necladlin
MA22	+3x	BC004795; band 4, 1 homology
MA23	+3x	Osteocalcin mp
MA24	+5x	Novel, dEST id: 1797808
MA25	+3x	K009425; SEC24 related
MA26	+5x	BC012075 similar to beta-transducin
MA27	+3x	Novel, dEST id: 4658995
MA28	+3x	Novel, dEST id: 2964370 similar to rev7, MAD
MA29	+3x	MARFb
MA30	+8x	TAZ
MA31	+2.5x	polyubiquitin
MA32	+3.1x	5'-AMP-activated protein kinase beta subunit
MA33	+5.9x	PA28 beta

Up-regulated Genes

Table 1: Gene Transcripts Identified by the GeneTag™ Differential Display Method

FIGURE 23

MA4	-3x	Novel, dEST id: 3180495
MA5	-3x	delta subunit of F-actin
MA6	-3x	X-chromosome linked phosphoglycerate kinase
MA7	-3x	Myosin
MA8	-3x	Myosin
MA9	-3x	Myosin
MA10	-3x	Myosin
MA11	-3x	Myosin
MA12	-3x	Myosin
MA13	-3x	Myosin
MA14	-3x	Myosin
MA15	-3x	Myosin
MA16	-3x	Myosin
MA17	-3x	Myosin
MA18	-3x	Myosin
MA19	-3x	Myosin
MA20	-3x	Myosin
MA21	-3x	Myosin
MA22	-3x	Myosin
MA23	-3x	Myosin
MA24	-3x	Myosin
MA25	-3x	Myosin
MA26	-3x	Myosin
MA27	-3x	Myosin
MA28	-3x	Myosin
MA29	-3x	Myosin
MA30	-3x	Myosin
MA31	-3x	Myosin
MA32	-3x	Myosin
MA33	-3x	Myosin
MA34	-3x	Myosin
MA35	-3x	Myosin
MA36	-3x	Myosin
MA37	-3x	Myosin
MA38	-3x	Myosin
MA39	-3x	Myosin
MA40	-3x	Myosin
MA41	-3x	Myosin
MA42	-3x	Myosin
MA43	-3x	Myosin
MA44	-3x	Myosin
MA45	-3x	Myosin
MA46	-3x	Myosin
MA47	-3x	Myosin
MA48	-3x	Myosin
MA49	-3x	Myosin
MA50	-3x	Myosin
MA51	-3x	Myosin
MA52	-3x	Myosin
MA53	-3x	Myosin
MA54	-3x	Myosin
MA55	-3x	Myosin
MA56	-3x	Myosin
MA57	-3x	Myosin
MA58	-3x	Myosin
MA59	-3x	Myosin
MA60	-3x	Myosin
MA61	-3x	Myosin
MA62	-3x	Myosin
MA63	-3x	Myosin
MA64	-3x	Myosin
MA65	-3x	Myosin
MA66	-3x	Myosin
MA67	-3x	Myosin
MA68	-3x	Myosin
MA69	-3x	Myosin
MA70	-3x	Myosin
MA71	-3x	Myosin
MA72	-3x	Myosin
MA73	-3x	Myosin
MA74	-3x	Myosin
MA75	-3x	Myosin
MA76	-3x	Myosin
MA77	-3x	Myosin
MA78	-3x	Myosin
MA79	-3x	Myosin
MA80	-3x	Myosin
MA81	-3x	Myosin
MA82	-3x	Myosin
MA83	-3x	Myosin
MA84	-3x	Myosin
MA85	-3x	Myosin
MA86	-3x	Myosin
MA87	-3x	Myosin
MA88	-3x	Myosin
MA89	-3x	Myosin
MA90	-3x	Myosin
MA91	-3x	Myosin
MA92	-3x	Myosin
MA93	-3x	Myosin
MA94	-3x	Myosin
MA95	-3x	Myosin
MA96	-3x	Myosin
MA97	-3x	Myosin
MA98	-3x	Myosin
MA99	-3x	Myosin
MA100	-3x	Myosin

Down-regulated Genes

27/37

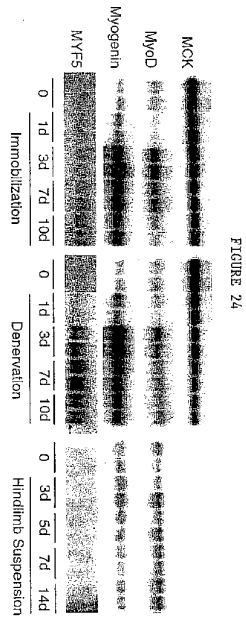


FIGURE 24

27/37

WO 02/061046

PCT/US02/02811

28/37

FIGURE 25A

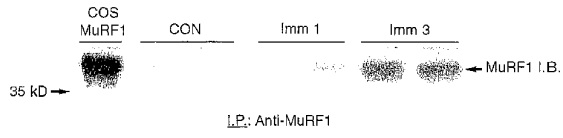
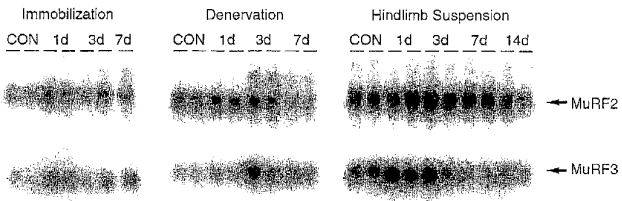


FIGURE 25B



28/37



WO 02/061046

PCT/US02/02811

FIGURE 27A

30/37

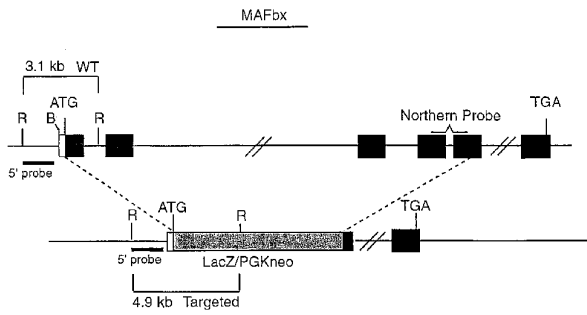
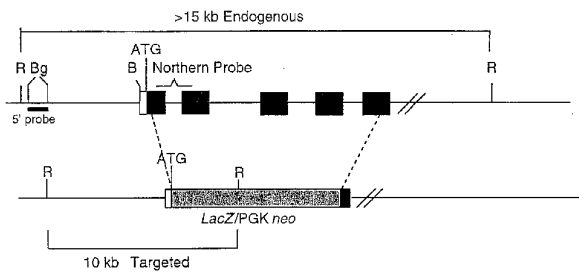


FIGURE 27B

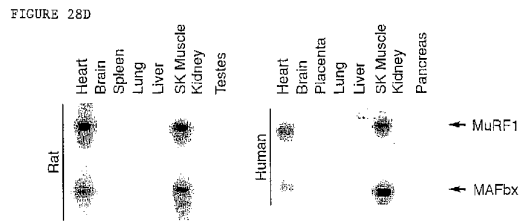
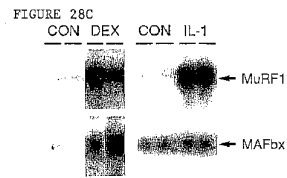
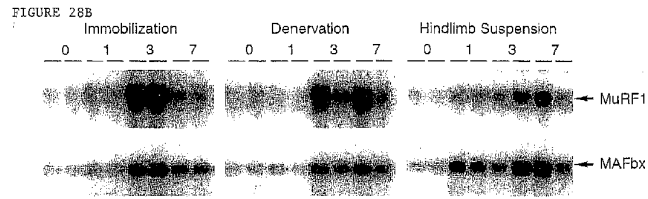
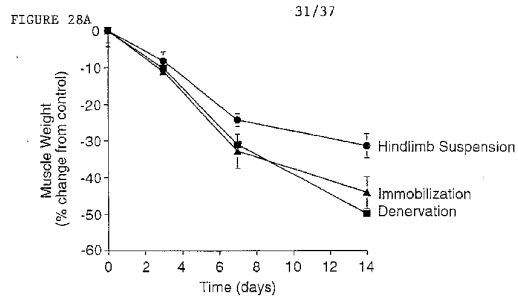
MuRF1



30/37

WO 02/061046

PCT/US02/02811



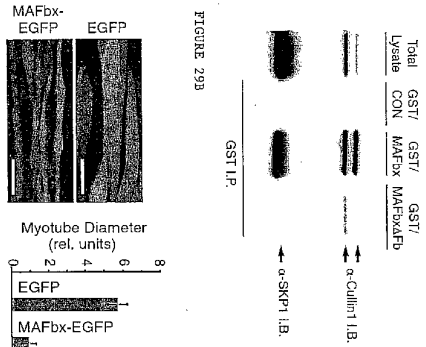


FIGURE 29A

FIGURE 29B

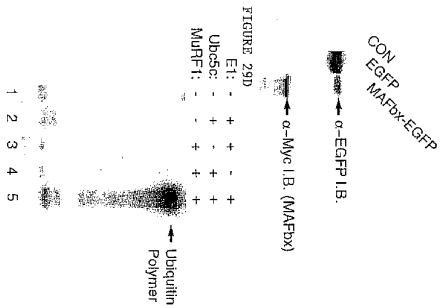


FIGURE 29C

FIGURE 29D

FIGURE 30A

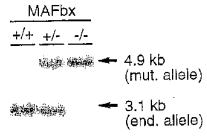


FIGURE 30C

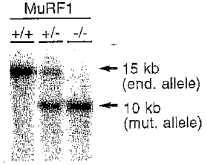


FIGURE 30B

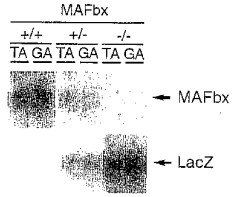
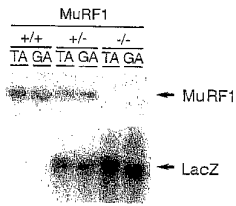
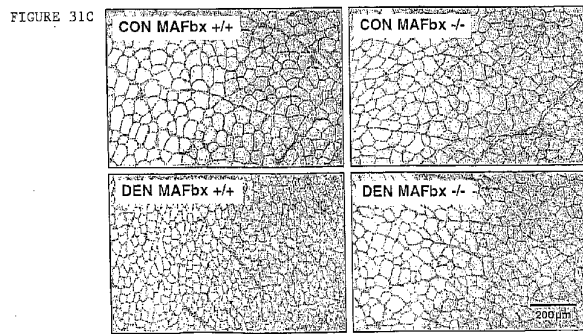
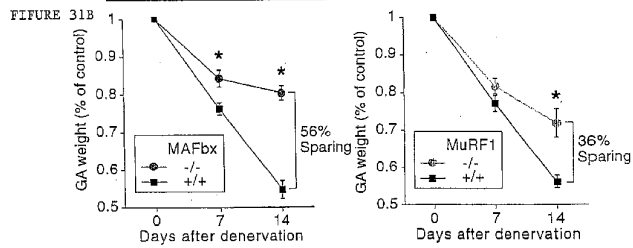
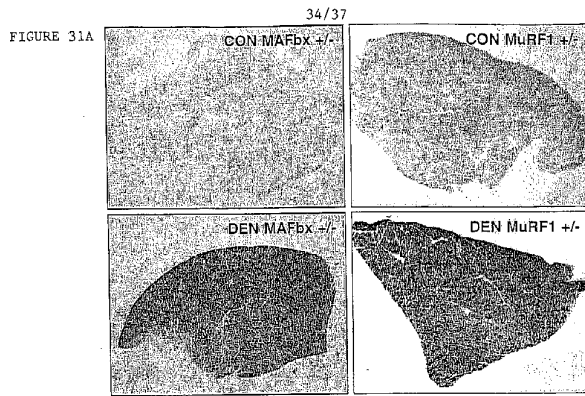


FIGURE 30D



WO 02/061046

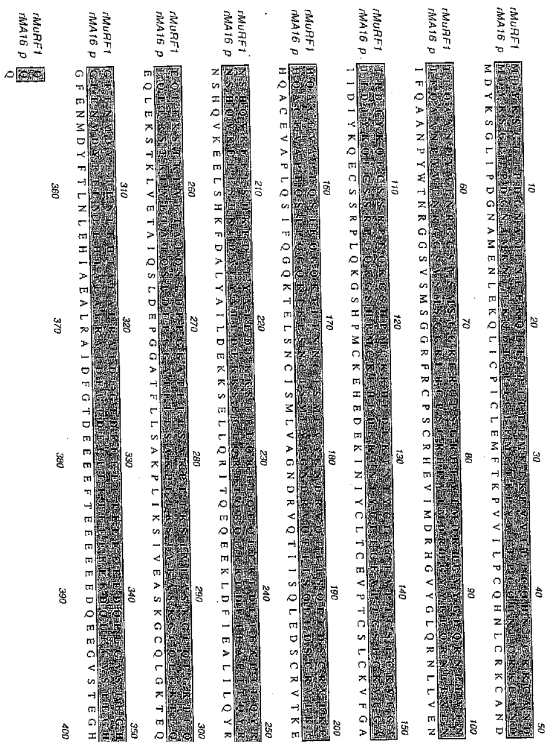
PCT/US02/02811





ClustalW Formatted Alignments

FIGURE 33





## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
		PCT/US02/02811
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(7) : C07H 21/02, 21/04; C07K 1/00, 14/00, 17/00; C12N 15/00, 15/09, 15/63, 15/70, 15/74, 1/14, 1/16, 1/20, 5/00, 5/02, 5/04, 5/10; A01K 67/00, 67/033 US CL : 536/23.1, 23.5; 530/350; 435/320.1, 252.3, 254.11, 419, 325; 800/8		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 536/23.1, 23.5; 530/350; 435/320.1, 252.3, 254.11, 419, 325; 800/8 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) GenEmbl, Genesec, BST, U.S. issued patents, U.S. Patent Application Publications		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category #	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P ---	BODINE et al. Identification of Ubiquitin Ligases Required for Skeletal Muscle Atrophy. Science. 23 November 2001, Vol. 294, pages 1704-1708, teaches SEQ ID NOs:20 (rat MURF1) and 34 (human MAPBX clone D18), encoded proteins, vectors, and host cells thereof.	1-9, 67-75 ----- 10, 76
X,P ---	CENTNER et al. Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain. J. Mol. Biol. March 2001, Vol. 306, No. 4, pages 717-726, teaches RNF28 gene that is 76% identical (will hybridize) to SEQ ID NO:20 (rat MURF1) and is 100% identical to SEQ ID NO:22 (human MURF1), and teaches RNF30 gene that is 84% identical (will hybridize) to SEQ ID NO:38 (human MAFBX clone D18).	1-4, 35-37 ----- 5-10, 38-43
X,P	WO 02/06318 A2 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 24 January 2002 (24.01.2002), teaches sequence 5 that is 85% identical (will hybridize) to SEQ ID NO:20 (rat MURF1), teaches sequence 1 that is 85% identical (will hybridize) to SEQ ID NO:38 (human MURF3), and teaches proteins, vectors, host cells, and transgenic animals thereof (see pages 3-6).	2-10, 35-43
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance    "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to substantiate the principle or theory underlying the invention "B" earlier application or patent published on or after the international filing date    "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)    "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "O" documents referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means    "E" document member of the same patent family "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
11 November 2003 (11.11.2003)		17 DEC 2003
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer <i>Kathleen M. Kerr</i> Kathleen M. Kerr Telephone No. (703) 308-0196
Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		PCT/US02/02811
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	WO 01/53453 A2 (HTSEQ, INC.) 26 July 2001 (26.07.2001), teaches SEQ ID NO:281 that is 76% identical (will hybridize) to SEQ ID NO:20 (rat MURF1) and encodes a protein that is 89% identical to a protein encoded by SEQ ID NO:22 (human MURF1) and teaches proteins, vectors, host cells, and transgenic animals thereof (see Abstract and pages 4, 32-36, and 46-47).	2-10
X,P	WO 01/72777 A2 (INCYTE GENOMICS, INC.) 4 October 2001 (04.10.2001), teaches sequence 192 that is 75% identical (will hybridize) to SEQ ID NO:20 (rat MURF1) and encodes a protein that is 99% identical to a protein encoded by SEQ ID NO:22 (human MURF1) and teaches proteins, vectors, host cells, and transgenic animals thereof (see Abstract and pages 4-6, 30-32, and 36).	2-10
X,P	WO 01/53322 A2 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 2 August 2001 (02.08.2001) teaches SEQ ID NO:21 that is 75% identical (will hybridize) to SEQ ID NO:20 (rat MURF1) and encodes a protein that is 99% identical to a protein encoded by SEQ ID NO:22 (human MURF1) and teaches proteins, vectors, host cells, and transgenic animals thereof (see Abstract and pages 1, 613-616, and 667-669).	2-10
X,P	WO 01/62922 A2 (INCYTE GENOMICS, INC.) 30 August 2001 (30.08.2001), teaches clone LG247381.1:2000MAY19 that encodes a protein that is 96% identical to a protein encoded by SEQ ID NO:22 (human MURF1) and teaches proteins, vectors, host cells, and transgenic animals thereof (see Abstract and pages 1-6 and 35-40).	2-10
X,T	US 6,426,186 B1 (JONES et al) 30 July 2002 (30.07.2002), teaches SEQ ID NO:37 that encodes a protein that is 96% identical to a protein encoded by SEQ ID NO:22 (human MURF1) and teaches proteins, vectors, and host cells thereof (see Abstract and columns 6-11).	2-9
Y,T		10
X,P	Database NCBI Sequence Viewer, WISTOW G. Homo sapiens iris ring finger protein mRNA, complete cds. GenBank Accession Number AF353673. April 25, 2001, teaches a sequence that is 76% identical (will hybridize) to SEQ ID NO:20 (rat MURF1) and that encodes a protein 99% identical to a protein encoded by SEQ ID NO:22 (human MURF1).	2-5
X,P	WO 01/42302 A1 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) 14 June 2001 (14.06.2001), teaches HP03115 that is identical to SEQ ID NO:38 (human MURF3) and teaches proteins, vectors, host cells, and gene therapy uses (transgenics) thereof (see Abstract).	34-43
X,P	WO 01/62767 A1 (GENE LOGIC, INC.) 30 August 2001 (30.08.2001), teaches a human CAP sequence that is identical to SEQ ID NO:38 (human MURF3) and teaches proteins, vectors, host cells, and transgenic animals thereof (see Abstract and pages 3-5).	34-43
X	WO 00/44900 A2 (INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.) 03 August 2000 (03.08.2003), teaches NuABP-52 cDNA that encodes a protein that is 99% identical to a protein encoded by SEQ ID NO:38 (human MURF3) and teaches proteins, vectors, host cells, and transgenic animals thereof (see Abstract and pages 4-7, 25-28, and 35-36).	35-43
X	WO 00/78954 A2 (INCYTE GENOMICS, INC.) 28 December 2000 (28.12.2000), teaches sequence 54 that encodes a large fragment of a protein encoded by SEQ ID NO:38 (human MURF3) and teaches proteins, vectors, host cells, and transgenic animals thereof (see Abstract and pages 29-31 and 35).	35-43
X	SPENCER et al. Regulation of Microtubule Dynamics and Myogenic Differentiation by MURF, a Striated Muscle RING-Finger Protein. J. Cell Biol. 21 August 2000, Vol. 150, No. 4, pages 771-784, teaches a sequence that is 85% identical (will hybridize) to SEQ ID NO:38 (human MURF3), proteins, vectors, and host cells thereof.	35-42

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		PCT/US02/02811
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/70047 A2 (INCYTE GENOMICS INC.) 23 November 2000 (23.11.2000), teaches sequence 106 that is identical to SEQ ID NO:34 (human MAFB clone D18) and teaches proteins, vectors, host cells, and transgenic animals thereof (see Abstract and pages 26-31 and 35-36).	67-76

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/02811
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)</b>		
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.	<input type="checkbox"/>	Claim Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)</b>		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: Please See Continuation Sheet		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input checked="" type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: Please See Continuation Sheet
4.	<input type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/02811

**BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING**

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I, claim(s) 1-10, drawn to nucleic acid molecules, polypeptides, vectors, host-vector systems, and transgenic animals related to the amino acid sequence in Figure 7 (rat MURF1 - SEQ ID NOs:20/21).

Group II, claim(s) 1-10, drawn to nucleic acid molecules, polypeptides, vectors, host-vector systems, and transgenic animals related to the amino acid sequence in Figure 9 (human MURF1 - SEQ ID NOs:22/23).

Group III, claim(s) 1-10, drawn to nucleic acid molecules, polypeptides, vectors, host-vector systems, and transgenic animals related to the amino acid sequence in Figure 17 (rat MURF1 VRV splice form - SEQ ID NO:?)

Group IV, claim(s) 11, drawn to a transgenic animal without the nucleotide sequence that encodes the amino acid sequence in Figure 7 (rat MURF1).

Group V, claim(s) 11, drawn to a transgenic animal without the nucleotide sequence that encodes the amino acid sequence in Figure 9 (human MURF1).

Group VI, claim(s) 11, drawn to a transgenic animal without the nucleotide sequence that encodes the amino acid sequence in Figure 17 (rat MURF1 VRV splice form).

Group VII, claim(s) 12, drawn to antibodies related to the amino acid sequence described by the nucleotide sequence in Figure 7 (rat MURF1).

Group VIII, claim(s) 12, drawn to antibodies related to the amino acid sequence described by the nucleotide sequence in Figure 9 (human MURF1).

Group IX, claim(s) 12, drawn to antibodies related to the amino acid sequence described by the nucleotide sequence in Figure 17 (rat MURF1 VRV splice form).

Group X, claim(s) 13, drawn to MURF1 antagonists.

Group XI, claim(s) 14, drawn to MURF1 pathway antagonists.

Group XII, claim(s) 15-28, drawn to methods of screening compounds using a muscle cell expressing MURF1.

Group XIII, claim(s) 29, drawn to methods of detecting muscle atrophy by measuring MURF1.

Group XIV, claim(s) 30-33, drawn to methods of treatment by modulating MURF1.

Group XV, claim(s) 34-43, drawn to nucleic acid molecules, polypeptides, vectors, host-vector systems, and transgenic animals related to the amino acid sequence in Figure 22 (human MURF3 clone C8 - SEQ ID NOs:38/39).

Group XVI, claim(s) 44, drawn to a transgenic animal without the nucleotide sequence that encodes the amino acid sequence in Figure 22 (human MURF3 clone C8).

Group XVII, claim(s) 45, drawn to antibodies related to the amino acid sequence described by the nucleotide sequence in Figure 22 (human MURF3 clone C8).

Group XVIII, claim(s) 46, drawn to MURF3 antagonists.

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/02811

Group XIX, claim(s) 47, drawn to MURF3 pathway antagonists.

Group XX, claim(s) 48-61, drawn to methods of screening compounds using a muscle cell expressing MURF3.

Group XXI, claim(s) 62, drawn to methods of detecting muscle atrophy by measuring MURF3.

Group XXII, claim(s) 63-66, drawn to methods of treatment by modulating MURF3.

Group XXIII, claim(s) 67-76, drawn to nucleic acid molecules, polypeptides, vectors, host-vector systems, and transgenic animals related to the amino acid sequence in Figure 11 (rat MAFBX - SEQ ID NO:7).

Group XXIV, claim(s) 67-76, drawn to nucleic acid molecules, polypeptides, vectors, host-vector systems, and transgenic animals related to the amino acid sequence in Figure 13 (human MAFBX clone K8 - SEQ ID NO:7).

Group XXV, claim(s) 67-76, drawn to nucleic acid molecules, polypeptides, vectors, host-vector systems, and transgenic animals related to the amino acid sequence in Figure 19 (human MAFBX clone D18 - SEQ ID NOs:34/35).

Group XXVI, claim(s) 77, drawn to a transgenic animal without the nucleotide sequence that encodes the amino acid sequence in Figure 11 (rat MAFBX).

Group XXVII, claim(s) 77, drawn to a transgenic animal without the nucleotide sequence that encodes the amino acid sequence in Figure 13 (human MAFBX clone K8).

Group XXVIII, claim(s) 77, drawn to a transgenic animal without the nucleotide sequence that encodes the amino acid sequence in Figure 19 (human MAFBX clone D18).

Group XXIX, claim(s) 78, drawn to antibodies related to the amino acid sequence described by the nucleotide sequence in Figure 11 (rat MAFBX).

Group XXX, claim(s) 78, drawn to antibodies related to the amino acid sequence described by the nucleotide sequence in Figure 13 (human MAFBX clone K8).

Group XXXI, claim(s) 78, drawn to antibodies related to the amino acid sequence described by the nucleotide sequence in Figure 19 (human MAFBX clone D18).

Group XXXII, claim(s) 79, drawn to MAFBX antagonists.

Group XXXIII, claim(s) 80, drawn to MAFBX pathway antagonists.

Group XXXIV, claim(s) 81-94, drawn to methods of screening compounds using a muscle cell expressing MAFBX.

Group XXXV, claim(s) 95, drawn to methods of detecting muscle atrophy by measuring MAFBX.

Group XXXVI, claim(s) 96-99, drawn to methods of treatment by modulating MAFBX.

The inventions listed as Groups I-XXXVI do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: the special technical feature of Group I, as claimed, is a nucleotide sequence that encodes the amino acid sequence in Figure 7. This technical feature, the structure, is not shared with the nucleotide sequences in Groups II and III, which, although they are described as MURF1 sequences with similar functions, have distinct structures as shown in the sequence listing. Thus, Groups I-III lack unity of invention. For these same reasons, the nucleotide sequence in Groups XV, XXIII, XXIV, and XXV also lack unity with the first claimed invention, MURF1 in Figure 7.

Groups IV-VI also lack unity with Group I because the transgenic animals claimed therein require the absence of the sequence in Groups I, II, and III, respectively. Thus, the technical feature, the structure as depicted in Figure 7, is absent in the transgenic animal claims. For these same reasons, the transgenic animals in Groups XVI, XXVI, XXVII, and XXVIII also lack unity with the first claimed invention, MURF1 in Figure 7.

Groups VII-IX also lack unity with Group I because the antibodies claimed therein do not contain the structure that is the polypeptide in Figure 7. While antibodies can recognize particular structures, they themselves are distinct in structure from the proteins they

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/02811

recognize. Since the structure of the protein is the technical feature of Group I, this feature cannot be shared with the antibodies of Groups VII-IX. For these same reasons, the antibodies in Groups XVII, XXIX, XXX, and XXXI also lack unity with the first claimed invention, MURF1 in Figure 7.

Groups X-XI, XVIII-XIX, and XXXII-XXXIII also lack unity with Group I because antagonists are wholly distinct structure from the technical feature of Group I. Since the structure of the protein is the technical feature of Group I, this feature cannot be shared with the antagonists of Groups X-XI, XVIII-XIX, and XXXII-XXXIII.

Methods of screening, detecting, and treating in Groups XII-XIV, XX-XXII, and XXXIV-XXXVI are all related to the MURF1 structure in Group I. However, none of these methods make or use the technical feature of Group I, the isolated nucleic acid sequence and/or the isolated protein sequence. Thus, all these method Groups lack unity with Group I.

**Continuation of Box II Item 3:**

Claims 1-10 (SEQ ID NOs:20-23), claims 34-43 (SEQ ID NOs:38/39), and claims 67-76 (SEQ ID NOs: 34/35)

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/47	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/68	
G 0 1 N 33/68	C 1 2 N 5/00	A

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 グラス, デイビッド ジェイ.

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 5 6 7, コートラント マナー, ファーネス ドック  
ロード 3 4 1, ナンバー 3 0

(72)発明者 ボディーン, スー シー.

アメリカ合衆国 ニューヨーク 1 0 6 0 4, ウェスト ハリソン, ワシントン ストリート  
7 5

F ターム(参考) 2G045 AA29 AA34 AA35 BB24 BB46 CB01 DA13 DA36 FB02  
4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA09 CA12 CA20 DA02 GA11 HA11  
HA13 HA14  
4B063 QA01 QA05 QQ21 QQ41 QQ61 QQ79 QQ89 QR08 QR32 QR35  
QR40 QR56 QR62 QR72 QR77 QS16 QS31 QS34 QS36 QS39  
QX01 QX02  
4B065 AA01X AA58X AA72X AA90X AA91Y AA93Y AC14 BA02 CA24 CA43  
CA44 CA46  
4C084 AA07 AA13 AA17 BA22 CA53 CA56 CA59 NA14 ZA941 ZC781  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 EA20 EA50 FA71  
FA74

专利名称(译)	新型核酸和多肽分子		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004524024A</a>	公开(公告)日	2004-08-12
申请号	JP2002561603	申请日	2002-01-30
[标]申请(专利权)人(译)	再生元医药公司		
申请(专利权)人(译)	Regeneron公司制药公司		
[标]发明人	グラスデイビッドジェイ ボディーンスーシー		
发明人	グラス, デイビッド ジェイ. ボディーン, スーシー.		
IPC分类号	A01K67/027 A61K45/00 A61K48/00 A61P21/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/02 C12N5/10 C12N15/09 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/68		
CPC分类号	A61P21/00 C07K14/47		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K45/00 A61K48/00 A61P21/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/566 G01N33/68 C12N5/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA29 2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB24 2G045/BB46 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/GA11 4B024/HA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QQ21 4B063/QQ41 4B063/QQ61 4B063/QQ79 4B063/QQ89 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS16 4B063/QS31 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX01 4B063/QX02 4B065/AA01X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA91Y 4B065/AA93Y 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA43 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA22 4C084/CA53 4C084/CA56 4C084/CA59 4C084/NA14 4C084/ZA941 4C084/ZC781 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/264926 2001-01-30 US 60/311697 2001-08-10 US 60/338742 2001-10-22 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了编码新的哺乳动物细胞内信号转导多肽的核酸序列，命名为MURF1，MURF3或MA-61。本发明还提供了可用于检测和/或测量结合MURF1或MAFBX gene产物的试剂的测定系统。本发明还提供了基于MURF1或MAFBX与通过结合MURF1或MA-61来启动信号转导或抑制泛素化，抑制MURF1，MURF3或MA-61的mRNA表达的 药物之间相互作用的诊断和治疗方法，或抑制MURF，MURF3或MAFBX通路。

【 図 1 】

FIGURE 1

MA61- SCF E3ユビキチンリガーゼ複合体の一部

