

(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2004-528822

(P2004-528822A)

(43) 公表日 平成16年9月24日(2004.9.24)

(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	2 G O 4 5
<b>A O 1 K 67/027</b>	A O 1 K 67/027	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 31/7088</b>	A 6 1 K 31/7088	4 B O 6 3
<b>A 6 1 K 35/34</b>	A 6 1 K 35/34	4 B O 6 4
<b>A 6 1 K 35/76</b>	A 6 1 K 35/76	4 C O 7 6
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 221 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2002-548136 (P2002-548136)	(71) 出願人	501306656 ボード・オブ・リージェンツ、ザ・ユニヴァーシティ・オブ・テキサス・システム アメリカ合衆国、78701 テキサス、オースティン、ウェスト・セヴンス・ストリート 201
(86) (22) 出願日	平成13年11月7日 (2001. 11. 7)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	平成15年4月15日 (2003. 4. 15)	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/049861	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 国際公開番号	W02002/046419	(72) 発明者	オルソン, エリック エヌ, アメリカ合衆国 テキサス 75225, ダラス, サウスウエスタン 3700 最終頁に続く
(87) 国際公開日	平成14年6月13日 (2002. 6. 13)		
(31) 優先権主張番号	60/246, 629		
(32) 優先日	平成12年11月7日 (2000. 11. 7)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 筋特異的筋節カルシニューリン結合タンパク質 (カルサルシン) に関する方法および組成物

## (57) 【要約】

本発明は、カルシニューリン関連タンパク質 (カルサルシン) として知られるポリペプチドに関する。カルサルシン - 1、- 2、および - 3 は、カルシニューリン、テレットニン、および - アクチニンに結合し、これはこれらの分子と筋節との間での連結を提供する。筋節の機能不全は最終的には、カルシニューリンの活性化を生じ、そして結果として肥大型心筋症を生じる。従って、これらの医学的状態に関してカルサルシンを利用する方法が本明細書中で提供され、そしてこの方法は、カルサルシンと相互作用するペプチドをスクリーニングする工程、カルシニューリンまたは - アクチニンへのカルサルシンの結合のモジュレーターをルクリーニングする工程を包含する。カルシニューリン活性を調節するための方法、遺伝子の転写のカルシニューリン活性化を阻害するための方法、ならびに心肥大、心不全、および I I 型糖尿病を処置するための方法が提供される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列番号 2 を含む、単離されそして精製されたポリペプチド。

## 【請求項 2】

配列番号 2 からなる、単離されそして精製されたポリペプチド。

## 【請求項 3】

配列番号 6 を含む、単離されそして精製されたポリペプチド。

## 【請求項 4】

配列番号 6 からなる、単離されそして精製されたポリペプチド。

## 【請求項 5】

配列番号 10 を含む、単離されそして精製されたポリペプチド。

## 【請求項 6】

配列番号 10 からなる、単離されそして精製されたポリペプチド。

## 【請求項 7】

さらなるコード領域をさらに含む、請求項 1 に記載の単離されそして精製されたポリペプチド。

## 【請求項 8】

さらなるコード領域をさらに含む、請求項 3 に記載の単離されそして精製されたポリペプチド。

## 【請求項 9】

さらなるコード領域をさらに含む、請求項 5 に記載の単離されそして精製されたポリペプチド。

## 【請求項 10】

配列番号 2 をコードする核酸セグメントを含む、単離されそして精製された核酸。

## 【請求項 11】

真核生物細胞中で活性化プロモーターをさらに含む、請求項 10 に記載の単離されそして精製された核酸セグメント。

## 【請求項 12】

前記核酸が組換えベクターをさらに含む、請求項 10 に記載の単離されそして精製された核酸セグメント。

## 【請求項 13】

配列番号 6 をコードする核酸セグメントを含む、単離されそして精製された核酸。

## 【請求項 14】

真核生物細胞中で活性化プロモーターをさらに含む、請求項 13 に記載の単離されそして精製された核酸セグメント。

## 【請求項 15】

前記核酸が組換えベクターをさらに含む、請求項 13 に記載の単離されそして精製された核酸セグメント。

## 【請求項 16】

配列番号 10 をコードする核酸セグメントを含む、単離されそして精製された核酸。

## 【請求項 17】

真核生物細胞中で活性化プロモーターをさらに含む、請求項 16 に記載の単離されそして精製された核酸セグメント。

## 【請求項 18】

前記核酸が組換えベクターをさらに含む、請求項 16 に記載の単離されそして精製された核酸セグメント。

## 【請求項 19】

前記核酸セグメントが、配列番号 2 を含む融合ポリペプチドをコードする、単離されそして精製された核酸セグメント。

## 【請求項 20】

10

20

30

40

50

前記核酸セグメントが、配列番号 6 を含む融合ポリペプチドをコードする、単離されそして精製された核酸セグメント。

【請求項 2 1】

前記核酸セグメントが、配列番号 10 を含む融合ポリペプチドをコードする、単離されそして精製された核酸セグメント。

【請求項 2 2】

カルシニューリン関連筋節タンパク質（カルサルシン）をコードする核酸の欠損対立遺伝子を含む、ノックアウト非ヒト動物。

【請求項 2 3】

カルサルシンをコードする核酸の 2 つの欠損対立遺伝子をさらに含む、請求項 2 2 に記載の動物。 10

【請求項 2 4】

前記動物がマウスである、請求項 2 2 に記載の動物。

【請求項 2 5】

発現カセットを含むトランスジェニック非ヒト動物であって、該カセットが、真核生物細胞中で活性なプロモーターの制御下に、カルサルシンポリペプチドをコードする核酸を含む、トランスジェニック非ヒト動物。

【請求項 2 6】

前記プロモーターが構成的である、請求項 2 5 に記載の動物。

【請求項 2 7】

前記プロモーターが組織特異的である、請求項 2 5 に記載の動物。 20

【請求項 2 8】

前記プロモーターが誘導性である、請求項 2 5 に記載の動物。

【請求項 2 9】

前記動物がマウスである、請求項 2 5 に記載の動物。

【請求項 3 0】

配列番号 2 またはその抗原性フラグメントを含むポリペプチドに免疫学的に結合する、モノクローナル抗体。

【請求項 3 1】

その抗体が、配列番号 2 またはその抗原性フラグメントを含むポリペプチドに免疫学的に結合する、ポリクローナル抗血清。 30

【請求項 3 2】

配列番号 6 またはその抗原性フラグメントを含むポリペプチドに免疫学的に結合する、モノクローナル抗体。

【請求項 3 3】

その抗体が、配列番号 6 またはその抗原性フラグメントを含むポリペプチドに免疫学的に結合する、ポリクローナル抗血清。

【請求項 3 4】

配列番号 10 またはその抗原性フラグメントを含むポリペプチドに免疫学的に結合する、モノクローナル抗体。 40

【請求項 3 5】

その抗体が、配列番号 10 またはその抗原性フラグメントを含むポリペプチドに免疫学的に結合する、ポリクローナル抗血清。

【請求項 3 6】

カルサルシンポリペプチドまたはそのカルシニューリン結合フラグメントを生物体に投与する工程を包含する、動物のカルシニューリン活性を調節する方法。

【請求項 3 7】

カルサルシンポリペプチドまたはそのカルシニューリン結合フラグメントのドミナントネガティブ形態を生物体に投与する工程を包含する、動物のカルシニューリン活性を調節する方法。 50

## 【請求項 38】

カルサルシンポリペプチドまたはそのカルシニューリン結合フラグメントをコードする核酸を動物に投与する工程を包含し、該核酸が該動物中で作動可能なプロモーターの制御下にある、動物のカルシニューリン活性を調節する方法。

## 【請求項 39】

前記プロモーターが構成的プロモーターである、請求項 38 に記載の方法。

## 【請求項 40】

前記プロモーターが筋特異的プロモーターである、請求項 38 に記載の方法。

## 【請求項 41】

前記筋特異的プロモーターが、ミオシン軽鎖 - 2 プロモーター、アクチンプロモーター、トロポニン 1 プロモーター、 $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$  交換プロモーター、ジストロフィンプロモーター、クレアチンキナーゼプロモーター、 $\alpha$ 7 インテグリンプロモーター、脳のナトリウム排泄増加性ペプチドプロモーター、B - クリスタリン / 小熱ショックタンパク質プロモーター、ミオシン重鎖プロモーター、または心房性ナトリウム排泄増加性因子プロモーターである、請求項 40 に記載の方法。

## 【請求項 42】

前記核酸がウイルスベクターを含む、請求項 38 に記載の方法。

## 【請求項 43】

カルサルシンと相互作用するペプチドをスクリーニングする方法であって、以下の工程：

( a ) 細胞中に以下を導入する工程：

試験ペプチドをコードする DNA セグメントを含む第 1 の核酸であって、ここで、該試験ペプチドは DNA 結合ドメインに融合される、第 1 の核酸；および

カルサルシンの少なくとも一部をコードする DNA セグメントを含む第 2 の核酸であって、ここで、該カルサルシンの少なくとも一部は DNA 活性化ドメインに融合される、第 2 の核酸；ならびに

( b ) 該 DNA 結合ドメインと該 DNA 活性化ドメインとの間での相互作用をアッセイすることによって、該試験ペプチドと該カルサルシンの少なくとも一部との間での相互作用をアッセイする工程、

を包含する、方法。

## 【請求項 44】

前記 DNA 結合ドメインおよび前記 DNA 活性化ドメインが、GAL4 および LexA からなる群より選択される、請求項 43 に記載の方法。

## 【請求項 45】

- アクチニンへのカルサルシンの結合のモジュレーターをスクリーニングする方法であって、以下の工程：

( a ) カルサルシンおよび - アクチニンを提供する工程；

( b ) 候補モジュレーターの存在下で、該カルサルシンと - アクチニンを混合する工程；

( c ) カルサルシン / - アクチニンの結合を測定する工程；ならびに

( d ) 該候補モジュレーターの非存在下でのカルサルシンと - アクチニンとの結合と、工程 ( c ) での結合を比較する工程、を包含し、

それによって、該候補モジュレーターの非存在下での結合と比較した、該候補モジュレーターの存在下でのカルサルシンと - アクチニンとの結合の差異によって、- アクチニンへのカルサルシンの結合のモジュレーターとして、該候補モジュレーターを同定する、方法。

## 【請求項 46】

カルサルシンおよび - アクチニンが、無細胞系の一部である、請求項 45 に記載の方法。

## 【請求項 47】

カルサルシンおよび - アクチニンが、インタクトな細胞内に配置される、請求項 45 に

記載の方法。

【請求項 48】

前記細胞が筋細胞である、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】

前記細胞が H9C2 細胞、C2C12 細胞、3T3 細胞、293 細胞、新生児心筋細胞、または筋管細胞である、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 50】

前記インタクトな細胞が動物中に配置される、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 51】

前記モジュレーターが - アクチニンへのカルサルシンの結合を増大させる、請求項 45 に記載の方法。 10

【請求項 52】

前記モジュレーターが - アクチニンへのカルサルシンの結合を減少させる、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 53】

カルサルシンおよび - アクチニンのいずれかまたは両方が標識される、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 54】

カルサルシンおよび - アクチニンの両方が、一方がクエンチ可能な標識で、そして他方がクエンチング剤で標識される、請求項 53 に記載の方法。 20

【請求項 55】

カルサルシンおよび - アクチニンの両方が標識されるが、該標識は互いに近位にもたらされない限りは検出不能である、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 56】

前記測定する工程が、カルサルシン、 - アクチニン、またはこれらの両方の免疫学的検出を含む、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 57】

モジュレーターの非存在下でのカルサルシンと - アクチニンとの結合を測定する工程をさらに包含する、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 58】

カルシニューリンへのカルサルシンの結合のモジュレーターをスクリーニングする方法であって、以下の工程： 30

(a) カルサルシンおよびカルシニューリンを提供する工程；

(b) 候補モジュレーターの存在下で、該カルサルシンとカルシニューリンとを混合する工程；

(c) カルサルシン/カルシニューリンの結合を測定する工程；ならびに

(d) 該候補モジュレーターの非存在下でのカルサルシンとカルシニューリンとの結合と、工程(c)での結合を比較する工程、を包含する方法であって、

それによって、該候補モジュレーターの非存在下での結合と比較した、該候補モジュレーターの存在下でのカルサルシンとカルシニューリンとの結合の差異によって、カルシニューリンへのカルサルシンの結合のモジュレーターとして、該候補モジュレーターを同定する、方法。 40

【請求項 59】

カルサルシンおよびカルシニューリンが、無細胞系の一部である、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 60】

カルサルシンおよびカルシニューリンが、インタクトな細胞内に配置される、請求項 58 に記載の方法。

【請求項 61】

前記細胞が筋細胞である、請求項 60 に記載の方法。 50

## 【請求項 6 2】

前記細胞が H 9 C 2 細胞、C 2 C 1 2 細胞、3 T 3 細胞、2 9 3 細胞、新生児心筋細胞、または筋管細胞である、請求項 6 0 に記載の方法。

## 【請求項 6 3】

前記インタクトな細胞が動物中に配置される、請求項 6 0 に記載の方法。

## 【請求項 6 4】

前記モジュレーターがカルシニューリンへのカルサルシンの結合を増大させる、請求項 5 8 に記載の方法。

## 【請求項 6 5】

前記モジュレーターがカルシニューリンへのカルサルシンの結合を減少させる、請求項 5 8 に記載の方法。

## 【請求項 6 6】

カルサルシンおよびカルシニューリンのいずれかまたは両方が標識される、請求項 5 8 に記載の方法。

## 【請求項 6 7】

カルサルシンおよびカルシニューリンの両方が、一方がクエンチ可能な標識で、そして他方がクエンチング剤で標識される、請求項 6 6 に記載の方法。

## 【請求項 6 8】

カルサルシンおよびカルシニューリンの両方が標識されるが、該標識は互いに近位にもたらされない限りは検出不能である、請求項 6 6 に記載の方法。

## 【請求項 6 9】

前記測定する工程が、カルサルシン、カルシニューリン、またはこれら両方の免疫学的検出を含む、請求項 5 8 に記載の方法。

## 【請求項 7 0】

モジュレーターの非存在下でのカルサルシンとカルシニューリンとの結合を測定する工程をさらに包含する、請求項 5 8 に記載の方法。

## 【請求項 7 1】

テレットニンへのカルサルシンの結合のモジュレーターをスクリーニングする方法であって、以下の工程：

( a ) カルサルシンおよびテレットニンを提供する工程；

( b ) 候補モジュレーターの存在下で、該カルサルシンとテレットニンを混合する工程；

( c ) カルサルシン/テレットニンの結合を測定する工程；ならびに

( d ) 該候補モジュレーターの非存在下でのカルサルシンとテレットニンとの結合と、工程 ( c ) での結合を比較する工程、を包含し、

それによって、該候補モジュレーターの非存在下での結合と比較した、該候補モジュレーターの存在下でのカルサルシンとテレットニンとの結合の差異によって、テレットニンへのカルサルシンの結合のモジュレーターとして、該候補モジュレーターを同定する、方法。

## 【請求項 7 2】

カルサルシンおよびテレットニンが、無細胞系の一部である、請求項 7 1 に記載の方法。

## 【請求項 7 3】

カルサルシンおよびテレットニンが、インタクトな細胞中に配置される、請求項 7 1 に記載の方法。

## 【請求項 7 4】

前記細胞が筋細胞である、請求項 7 3 に記載の方法。

## 【請求項 7 5】

前記細胞が H 9 C 2 細胞、C 2 C 1 2 細胞、3 T 3 細胞、2 9 3 細胞、新生児心筋細胞、または筋管細胞である、請求項 7 3 に記載の方法。

## 【請求項 7 6】

前記インタクトな細胞が動物中に配置される、請求項 7 3 に記載の方法。

## 【請求項 7 7】

前記モジュレーターがテレトニンへのカルサルシンの結合を増大させる、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記モジュレーターがテレトニンへのカルサルシンの結合を減少させる、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 7 9】

カルサルシンおよびテレトニンのいずれかまたは両方が標識される、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 8 0】

カルサルシンおよびテレトニンの両方が、一方がクエンチ可能な標識で、そして他方がクエンチング剤で標識される、請求項 7 9 に記載の方法。 10

【請求項 8 1】

カルサルシンおよびテレトニンの両方が標識されるが、該標識は互いに近位にもたらされない限りは検出不能である、請求項 7 9 に記載の方法。

【請求項 8 2】

前記測定する工程が、カルサルシン、テレトニン、またはそれらの両方の免疫学的検出を含む、請求項 7 1 に記載の方法。

【請求項 8 3】

モジュレーターの非存在下でのカルサルシンとテレトニンの結合を測定する工程をさらに包含する、請求項 7 1 に記載の方法。 20

【請求項 8 4】

心肥大、心不全、または I I 型糖尿病を処置する方法であって、該方法は、心肥大、心不全、または I I 型糖尿病に罹患している動物に、カルサルシンポリペプチドまたはそのカルシニューリン結合フラグメントを投与する工程を包含し、ここで、該カルサルシンポリペプチドまたはそのフラグメントはカルシニューリン活性を阻害する、方法。

【請求項 8 5】

心肥大、心不全、または I I 型糖尿病を処置する方法であって、該方法は、心肥大、心不全、または I I 型糖尿病に罹患している動物に、心臓組織中で活性化プロモーターの制御下にカルサルシンポリペプチドまたはそのカルシニューリン結合フラグメントをコードしている核酸を投与する工程を包含し、ここで、該カルサルシンポリペプチドまたはそのフラグメントの発現によってカルシニューリン活性を阻害する、方法。 30

【請求項 8 6】

前記ポリペプチドがカルサルシンのドミナントネガティブ形態である、請求項 8 5 に記載の方法。

【請求項 8 7】

前記動物を、イオノトロープ、 $\beta$ -ブロッカー、不整脈治療薬、利尿剤、血管拡張剤、ホルモンアンタゴニスト、エンドセリンアンタゴニスト、アンジオテンシン 2 型アンタゴニスト、およびサイトカインインヒビター/ブロッカーからなる群より選択される化合物で処置する工程をさらに包含する、請求項 8 5 に記載の方法。

【請求項 8 8】 40

前記プロモーターが構成的プロモーターである、請求項 8 5 に記載の方法。

【請求項 8 9】

前記プロモーターが誘導性プロモーターである、請求項 8 5 に記載の方法。

【請求項 9 0】

細胞における遺伝子転写のカルシニューリン活性化を阻害する方法であって、該方法は、カルシニューリンが通常に機能する亜細胞性領域以外の亜細胞性領域に融合タンパク質を局在化させる標的化ペプチドに対して融合された、カルサルシンまたはそのカルシニューリン結合フラグメントを含む融合タンパク質を該細胞に提供する工程を包含する、方法。

【請求項 9 1】

前記標的化ペプチドが、ゲラニルゲラニル基、核局在化シグナル、ミリスチル化シグナル 50

、および小胞体シグナルペプチドを含む、請求項 9 0 に記載の方法。

【請求項 9 2】

前記細胞が動物中に配置される、請求項 9 0 に記載の方法。

【請求項 9 3】

前記動物がヒトである、請求項 9 2 に記載の方法。

【請求項 9 4】

前記動物を、イオントロップ、 $\beta$ -ブロッカー、不整脈治療薬、利尿剤、血管拡張剤、ホルモンアンタゴニスト、エンドセリンアンタゴニスト、カルシウムチャンネルブロッカー、ホスホジエステラーゼインヒビター、アンジオテンシン 2 型アンタゴニスト、およびサイトカインインヒビター/ブロッカーからなる群より選択される化合物で処置する工程をさらに包含する、請求項 9 3 に記載の方法。

10

【請求項 9 5】

カルサルシンに結合するペプチドを同定する方法であって、該方法は、以下の工程：

( a ) カルサルシンポリペプチドまたはそのフラグメントを支持体に付着させる工程；

( b ) 該カルサルシンポリペプチドまたはそのフラグメントを候補ペプチドに曝す工程；

および

( c ) 該カルサルシンポリペプチドまたはそのフラグメントへの該候補ペプチドの結合をアッセイする工程、

を包含する、方法。

【請求項 9 6】

前記支持体が、ニトロセルロース、カラム、またはゲルからなる群より選択される、請求項 9 5 に記載の方法。

20

【請求項 9 7】

以下の工程を包含する、抗心筋肥大活性または抗心不全活性について候補物質をスクリーニングする方法であって、以下の工程：

( a ) 機能的なカルサルシンポリペプチドを欠く細胞を提供する工程；

( b ) 該細胞を該候補物質と接触させる工程；および

( c ) 該細胞に対する該候補物質の影響を決定する工程、

を包含する、方法。

【請求項 9 8】

前記細胞が筋肉細胞である、請求項 9 4 に記載の方法。

30

【請求項 9 9】

前記細胞がカルサルシンの調節領域中に変異を有する、請求項 9 7 に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

前記変異が、欠失変異、挿入変異、または点変異である、請求項 9 7 に記載の方法。

【請求項 1 0 1】

前記細胞がカルサルシンのコード領域中に変異を有する、請求項 9 7 に記載の方法。

【請求項 1 0 2】

前記変異が、欠失変異、挿入変異、フレームシフト変異、ナンセンス変異、ミスセンス変異、またはスプライシング変異である、請求項 1 0 1 に記載の方法。

40

【請求項 1 0 3】

前記細胞がインビトロで接触させられる、請求項 9 7 に記載の方法。

【請求項 1 0 4】

前記細胞がインビボで接触させられる、請求項 9 7 に記載の方法。

【請求項 1 0 5】

前記細胞が非ヒトトランスジェニック動物中に配置される、請求項 1 0 5 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

( 発明の背景 )

本出願は、2 0 0 0 年 1 1 月 7 日に提出された同時係属中の米国仮特許出願番号 6 0 / 2

50

46, 629に対する優先権を主張する。上記の参照される開示の本文の全体は、本明細書中において、特許権の一部放棄を伴わずに、参考として詳細に援用される。政府は、国立衛生研究所からの助成金番号HL53351-06に基づいて、本発明において独自の権利を所有し得る。

【0002】

(1. 発明の分野)

本発明は、一般的に、細胞生物学および分子生物学の分野に関する。特に、本発明は、カルシニューリン結合性筋節タンパク質(カルサルシン(calsarcin))を通じたカルシニューリンの活性の調節に関する。より詳細には、本発明は、カルサルシン-1を通じたカルシニューリンの活性の調節に関し、カルサルシン-1はまた、筋節に関連する - アクチニンと相互作用する。

10

【0003】

(2. 関連分野の説明)

カルシニューリンは、セリン/スレオニンプロテインホスファターゼであり、これは、広範な種々の細胞型の発生調節およびホメオスタシス調節における中枢の役割を果たす(Kleeら、1998、Crabtree、1999)。白血球におけるT細胞レセプターの活性化後の、カルシニューリンのNFATファミリーの転写因子との相互作用は、カルシニューリンが遺伝子発現を制御する理由の最良に特徴付けられる例を提供する(Raoら、1997)。細胞内カルシウムの変化は、 $Ca^{2+}$ /カルモジュリンのカルシニューリン(CnA)の触媒サブユニットへの結合を促進し、それによって、自己抑制領域を転置し、そしてタンパク質基質の触媒ドメインへの接近を可能にする。活性化カルシニューリンによるNFATの脱リン酸化は、細胞質から核へのその移動を促進し、ここで、NFATは、AP1ヘテロダイマーと共同してDNAを結合して、サイトカイン(例えば、IL-2)をコードする遺伝子の転写を活性化する。NFAT活性化のこの基本的なモデルは、多くの細胞型において、カルシニューリンを介して $Ca^{2+}$ シグナルを変換し、そして各々の細胞内環境に独特な標的遺伝子の多様なセットの転写を制御することが示されている(Timmermanら、1996)。各々の場合において、NFATは、他の転写因子と共同して作用し、この転写因子としては、AP1(Raoら、1997)、cMAF(Hoら、1996)、GATA(Mesaeliら、1999; Molkenstinら、1998; Musaroら、1999)またはMEF2(Chinら、1998; Liuら、1997; Maoら、1999; MaoおよびWiedmann、1999)ファミリーのタンパク質が挙げられる。T細胞活性化に加えて、カルシニューリンシグナル伝達によって制御される細胞応答は、シナプス可塑性(Maoら、1999; Graefら、1999; Zhuoら、1999)およびアポトーシス(Wangら、1999; Younら、1999)を含む。

20

30

【0004】

心臓および骨格筋の横紋筋細胞におけるカルシニューリンシグナル伝達の最近の研究は、この遍在して発現されるタンパク質によって制御される重要な生理学的事象および病理学的事象の範囲を拡大した。トランスジェニックマウスの心臓における構成的に活性化形態のカルシニューリンの強制発現は、心肥大を促進し、これは、ヒト疾患の特徴を要約する様式で、拡張した心筋症、心不全および死に進行する(Molkenstinら、1998、本明細書中で参考として援用される)。さらに、これらの動物、および心筋症の特定の他の動物モデルにおける肥大および心不全は、カルシニューリンアンタゴニスト薬物、シクロスポリンAまたはFK-506の投与によって予防される(Sussmanら、1998)。骨格筋において、カルシニューリンシグナル伝達は、インスリン様増殖因子-1によって刺激される肥大成長(Musaroら、1999; Semsarianら、1999)、および特有の筋原繊維サブタイプを確立する遺伝子発現の特殊化プログラムの制御(Chinら、1998; Dunnら、1999)の両方に関係する。これらの観察は、筋細胞において、選択的にカルシニューリン活性を改変する治療可能性における関心を刺激するが、一方、他の細胞型においては、変更されるカルシニューリンシグナル伝達の

40

50

望まれない結果を回避する (Sigalら、1991)。

【0005】

哺乳動物細胞におけるカルシニューリンの活性は、他のタンパク質との相互作用によって調節され得る。これらは、免疫抑制薬物 (シクロスポリンAおよびFK-506) の標的であるイムノフィリンだけでなく、最近同定された2つの関連のないタンパク質 (AKAP79およびcabin-1/cain) をも含む。AKAP79は、プロテインキナーゼCおよびプロテインキナーゼAとともにカルシニューリンを結合し、これは、大きなヘテロ-オリゴマーシグナル伝達複合体のアセンブリについての足場として役立つ (Kashishianら、1998)。cabin-1/cainは、カルシニューリンおよび転写因子MEF2の両方を結合する (Sunら、1998; Laiら、1998)。cabin-1過剰発現の結果として、カルシニューリン活性が阻害され、そしてMEF2が、不活性状態に隔離される。別のカルシニューリン結合タンパク質は、*Saccharomyces cerevisiae* の Rex1p (YKL159c) である。予備報告は、この小さな24kDaタンパク質が、酵母において過剰発現される場合に、カルシニューリンシグナル伝達を阻害することを特筆した (KingsburyおよびCunningham、1998)。

10

【0006】

筋細胞において、細胞骨格のアクチンフィラメントは、筋節のZディスクに安定に固定され、そしてさらに、連続順序の筋節を通じて、筋肉の長さに沿った物理的ひずみの伝達に必要とされる。このZディスクは、逆平行ダイマーのアクチン結合タンパク質、 $\alpha$ -アクチニンからなる (Luther、1991)。所定のアクチンフィラメントについて、反対の筋節由来の4つのフィラメントの重複が存在し、これは、 $\alpha$ -アクチニンを構成するZフィラメントによって、ジグザクパターンで交差接続される四角い格子の形成をもたらす。この格子における $\alpha$ -アクチニンの周期性は、15nmと20nmとの間であり (Luther、1991; Schroeterら、1996)、そして $\alpha$ -アクチニン架橋の数が可変性でも、総数は、所定の筋繊維において、高度に調節される (Squire、1981; Vigoreaux、1994)。

20

【0007】

筋節の $\alpha$ -アクチニン (s- $\alpha$ -アクチニン) および非筋細胞に存在する $\beta$ -アクチニン (非-s- $\alpha$ -アクチニン) は、2つの異なる遺伝子によってコードされる。さらに、s- $\alpha$ -アクチニンのアイソフォームは、おそらく選択的スプライシングスキームを介して産生される (Baronら、1987; de Arrudaら、1990; Beggsら、1992; Parrら、1992)。非-s- $\alpha$ -アクチニン形態のアクチン結合は、 $Ca^{2+}$ 感受性であり、一方、s- $\alpha$ -アクチニン形態のアクチン結合は、 $Ca^{2+}$ 非感受性である (BurridgeおよびFeramisco、1980; DuhaimeanおよびBanburg、1984; Bennettら、1984; Landonら、1985)。

30

【0008】

ショウジョウバエの $\alpha$ -アクチニン遺伝子変異体は致死性であるが、ハエは、胚発生を越えて生存し得、検出可能な筋肉機能不全が、孵化段階で存在する (Fyrbergら、1998)。幼生発生において、この変異は、段階的に可動性を制限する顕著な筋肉変性を通じて現れ、そして最後に、死に至る。変異体の筋繊維の顕微鏡評価は、1日齢幼生と同じくらい初期に、筋繊維が、ヒトネマリンミオパシーと類似の細胞病理学で、有意に混乱される。

40

【0009】

テレットニン (telethonin) は、肢帯筋ジストロフィに關与する遺伝子によってコードされる、心臓および骨格筋の筋節タンパク質である。筋ジストロフィ (MD) は、進行性の脱力、および運動を制御する骨格筋または随意筋の変性によって特徴付けられる遺伝子疾患の群をいう。心臓の筋肉およびいくつかの他の不随意筋はまた、いくつかの形態のMDに影響を及ぼし、そしていくらかの形態は、同様に他の器官を含む。MDの主要

50

な形態としては、筋緊張性ジストロフィ、デュシェーヌジストロフィ、ベッカー筋ジストロフィ、肢帯筋ジストロフィ、顔面肩甲上腕筋ジストロフィ、先天性筋ジストロフィ、咽頭筋ジストロフィ、遠位筋ジストロフィおよびエメリー-ドライフス筋ジストロフィが挙げられる。デュシェーヌは、子供を冒すMDの最も一般的な形態であり、そして筋緊張性MDは、成人を冒す最も一般的な形態である。MDは、あらゆる年代の人々を冒し得る。いくつかの形態が、幼年期または幼児期に第一に現れるようになるが、他の形態は、中年またはそれ以降まで現れないかもしれない。筋ジストロフィについての公知の治療は存在せず、従って、カルサルシンを用いた遺伝子治療が、有益であることを証明し得る。

#### 【0010】

以前の研究 (Sussmanら、1998; Shimoyamaら、1999; Hillら、2000; Limら、2000a; Limら、2000b; Taigenら、2000) は、カルシウム処理において変更を生じる筋節機能不全が、カルシニューリンの活性化、および引き続く肥大型心筋症をもたらすことを実証した。カルシニューリンと筋節との間の、例えば、カルシニューリン結合タンパク質またはペプチドとの結合は、治療標的を提供する。心臓組織においてカルシニューリン機能を調節する能力を有する新規のより適切な候補物の同定は、現在の研究努力の重要な目標である。

#### 【0011】

心肥大および心不全におけるカルシニューリンの中心的な役割の最初の発見の時以来 (Molkentinら、1998)、非常に多くの追跡研究が存在し、これらは、多様な内因性シグナルおよび外因性シグナルにตอบสนองして、心臓の肥大成長におけるこのシグナル伝達経路の重要性を確認した (OlsonおよびMolkentin、1999; IzumoおよびAoki、1998において概説される)。心臓におけるこの経路の阻害または活性化は、心臓の細胞増殖に対する十分な結果を有し得、そして重要な治療含意を有する。しかし、T細胞活性化についてのカルシニューリンの重要性は、カルシニューリンが、器官全体において全体的に阻害される場合、免疫抑制をもたらす。従って、心臓特異的カルシニューリン結合タンパク質の同定は、特異的な亜細胞部位へのタンパク質の標的化、または心臓特異的標的タンパク質の改変を通じて、心臓におけるカルシニューリン活性を変更する可能な組織特異的手段を可能にし得る。

#### 【0012】

(発明の要旨)

本発明は、新規のタンパク質、カルサルシンを利用し、これは、筋節内で、カルシニューリンを - アクチニンに結合する。「おとり」として、カルサルシンのドミナントネガティブ変異体バージョンを使用して、カルシニューリンは、心筋細胞内において、不適切な細胞内位置に誤って指向され得、それによって、カルシニューリンの肥大シグナル伝達を混乱させる。特定の実施形態において、カルシニューリンに結合するが、 - アクチニンには結合しないカルサルシンの一部分を含み得るこれらのおとりは、アデノウイルス媒介性の遺伝子送達によって、インビトロで心筋細胞において発現され得る。

#### 【0013】

本発明の実施形態において、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10または配列番号12を含む、単離され、そして精製されるポリペプチドが存在する。

#### 【0014】

本発明のさらなる実施形態において、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11をコードする核酸セグメントを含む、単離され、そして精製される核酸が存在する。特定の実施形態において、核酸セグメントは、真核生物細胞において活性なプロモーターをさらにも含む。別の特定の実施形態において、核酸は、組換えベクターをさらにも含む。

#### 【0015】

本発明の別の実施形態において、単離され、そして精製される核酸セグメントが存在し、ここで、上記の核酸セグメントは、配列番号2を含む融合ポリペプチドをコードする。本

10

20

30

40

50

発明の別の実施形態において、単離され、そして精製される核酸セグメントが存在し、ここで、上記の核酸セグメントは、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10または配列番号12を含む融合ポリペプチドをコードする。

【0016】

本発明のさらなる実施形態において、カルサルシンをコードする核酸の欠損対立遺伝子を含む、ノックアウト非ヒト動物が存在する。特定の実施形態において、この動物は、カルサルシンをコードする核酸の2つの欠損対立遺伝子をさらに含む。さらなる特定の実施形態において、この動物は、マウスである。

【0017】

本発明のさらなる実施形態において、発現カセットを含むトランスジェニック非ヒト動物が存在し、ここで、上記のカセットは、真核生物細胞において活性なプロモーターの制御下において、カルサルシンポリペプチドをコードする核酸を含む。特定の実施形態において、このプロモーターは、構成的、組織特異的または誘導性である。別の特定の実施形態において、この動物は、マウスである。

10

【0018】

本発明の別の実施形態において、配列番号2を含むポリペプチドに免疫学的に結合するモノクローナル抗体、またはその抗原性フラグメントが存在する。本発明の別の実施形態において、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10または配列番号12を含むポリペプチドに免疫学的に結合するモノクローナル抗体、あるいはその抗原性フラグメントが存在する。

20

【0019】

本発明のさらなる実施形態において、ポリクローナル抗血清、配列番号2を含むポリペプチドに免疫学的に結合する抗体、またはその抗原性フラグメントが存在する。本発明のさらなる実施形態において、ポリクローナル抗血清、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10または配列番号12を含むポリペプチドに免疫学的に結合する抗体、あるいはその抗原性フラグメントが存在する。

【0020】

本発明のさらなる実施形態において、動物において、カルシニューリン活性を調節する方法が存在し、この方法は、上記の生物に、カルサルシンポリペプチド、またはそのカルシニューリン結合フラグメントを投与する工程を包含する。

30

【0021】

本発明のさらなる実施形態において、動物において、カルシニューリン活性を調節する方法が存在し、この方法は、上記の生物に、カルサルシンポリペプチド、またはそのカルシニューリン結合フラグメントのドミナントネガティブ形態を投与する工程を包含する。

【0022】

本発明のさらなる実施形態において、動物において、カルシニューリン活性を調節する方法が存在し、この方法は、上記の生物に、カルサルシンポリペプチド、またはそのカルシニューリン結合フラグメントをコードする核酸を投与する工程であって、上記の核酸は、上記の動物の細胞において操作可能なプロモーターの制御下にある工程を包含する。特定の実施形態において、このプロモーターは、構成的プロモーターまたは筋特異的プロモーターである。別の特定の実施形態において、この筋特異的プロモーターは、ミオシン軽鎖-2プロモーター、アクチンプロモーター、トロポニン1プロモーター、 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体プロモーター、ジストロフィンプロモーター、クレアチンキナーゼプロモーター、フィネグリンプロモーター、脳ナトリウム利尿ペプチドプロモーター、B-クリスタリン/低分子量熱ショックタンパク質プロモーター、ミオシン重鎖プロモーター、または心房性ナトリウム利尿因子プロモーターである。別の特定の実施形態において、この核酸は、ウイルスベクターを含む。

40

【0023】

本発明の別の実施形態において、カルサルシンと相互作用するペプチドについてのスクリーニング方法が存在し、この方法は、試験ペプチドをコードするDNAセグメントを含む

50

第一の核酸（ここで、上記の試験ペプチドは、DNA結合ドメインに融合される）；およびカルサルシンの少なくとも一部分をコードするDNAセグメントを含む第二の核酸（ここで、上記のカルサルシンの少なくとも一部分は、DNA活性化ドメインに融合される）を、細胞に導入する工程；ならびに上記の試験ペプチドと上記のカルサルシンの少なくとも一部分との間の相互作用について、上記のDNA結合ドメインと上記のDNA活性化ドメインとの間の相互作用についてのアッセイによってアッセイする工程を包含する。特定の実施形態において、DNA結合ドメインおよびDNA活性化ドメインは、GAL4およびLexAからなる群より選択される。

【0024】

本発明のさらなる実施形態において、  
 - アクチニンへのカルサルシン結合のモジュレーターについてのスクリーニング方法が存在し、この方法は、カルサルシンおよび  
 - アクチニンを提供する工程；候補モジュレーターの存在下で、カルサルシンおよび  
 - アクチニンを混合する工程；カルサルシン/  
 - アクチニン結合を測定する工程；ならびに上記の候補モジュレーターの非存在下で、工程（c）における結合を、カルサルシンおよび  
 - アクチニンの結合と比較し、それによって、上記の候補モジュレーターの非存在下における結合と比較される場合、上記の候補モジュレーターの存在下におけるカルサルシンおよび  
 - アクチニンの結合における差異が、  
 - アクチニンへのカルサルシン結合のモジュレーターとして、上記の候補モジュレーターを同定する工程を包含する。特定の実施形態において、カルサルシンおよび  
 - アクチニンは、無細胞系の一部である。別の特定の実施形態において、カルサルシンおよび  
 - アクチニンは、インタクトな細胞内に位置する。さらなる特定の実施形態において、この細胞は、筋細胞である。さらなる特定の実施形態において、この細胞は、H9C2細胞、C2C12細胞、3T3細胞、293細胞、新生児心筋細胞、成体心筋細胞または筋管細胞である。さらなる特定の実施形態において、このインタクトな細胞は、動物内に位置する。さらなる特定の実施形態において、このモジュレーターは、  
 - アクチニンへのカルサルシン結合を増大または減少する。別の特定の実施形態において、カルサルシンおよび  
 - アクチニンの両方が標識される。別の特定の実施形態において、カルサルシンおよび  
 - アクチニンの両方が標識され、一方は、消光可能な標識で標識され、そして他方は、消光剤で標識される。さらなる特定の実施形態において、カルサルシンおよび  
 - アクチニンの両方が標識されるが、上記の標識は、互いに近接する場合を除いて、検出不可能である。さらなる特定の実施形態において、この測定工程は、カルサルシン、  
 - アクチニンまたは両方の免疫学的検出を含む。別の特定の実施形態において、この方法は、モジュレーターの非存在下で、カルサルシンおよび  
 - アクチニンの結合を測定する工程をさらに包含する。

【0025】

本発明の別の実施形態において、カルシニューリンへのカルサルシン結合のモジュレーターについてのスクリーニング方法が存在し、この方法は、カルサルシンおよびカルシニューリンを提供する工程；候補モジュレーターの存在下で、カルサルシンおよびカルシニューリンを混合する工程；カルサルシン/  
 カルシニューリン結合を測定する工程；ならびに上記の候補モジュレーターの非存在下で、工程（c）における結合を、カルサルシンおよびカルシニューリンの結合と比較し、それによって、上記の候補モジュレーターの非存在下における結合と比較される場合、上記の候補モジュレーターの存在下におけるカルサルシンおよびカルシニューリンの結合における差異が、カルシニューリンへのカルサルシン結合のモジュレーターとして、上記の候補モジュレーターを同定する工程を包含する。特定の実施形態において、カルサルシンおよびカルシニューリンは、無細胞系の一部である。別の特定の実施形態において、カルサルシンおよびカルシニューリンは、インタクトな細胞内に位置する。さらなる特定の実施形態において、この細胞は、筋細胞である。さらなる特定の実施形態において、この細胞は、H9C2細胞、C2C12細胞、3T3細胞、293細胞、新生児心筋細胞、成体心筋細胞または筋管細胞である。さらなる特定の実施形態において、このインタクトな細胞は、動物内に位置する。別の特定の実施形態において、このモジュレーターは、カルシニューリンへのカルサルシン結合を増大または減少

する。さらなる特定の実施形態において、カルサルシンおよびカルシニューリンの両方が標識される。別の特定の実施形態において、カルサルシンおよびカルシニューリンの両方が標識され、一方は、消光可能な標識で標識され、そして他方は、消光剤で標識される。さらなる特定の実施形態において、カルサルシンおよびカルシニューリンの両方が標識されるが、上記の標識は、互いに近接する場合を除いて、検出不可能である。別の特定の実施形態において、この測定工程は、カルサルシン、カルシニューリンまたは両方の免疫学的検出を含む。さらなる実施形態において、この方法は、モジュレーターの非存在下で、カルサルシンおよびカルシニューリンの結合を測定する工程をさらに包含する。

#### 【0026】

本発明の別の実施形態において、テレットニンへのカルサルシン結合のモジュレーターにつ  
10  
いてのスクリーニング方法が存在し、この方法は、カルサルシンおよびテレットニンを提供  
する工程；候補モジュレーターの存在下で、カルサルシンおよびテレットニンを混合する工  
程；カルサルシン/テレットニン結合を測定する工程；ならびに上記の候補モジュレータ  
の非存在下で、工程(c)における結合を、カルサルシンおよびテレットニンの結合と比較  
し、それによって、上記の候補モジュレーターの非存在下における結合と比較される場  
合、上記の候補モジュレーターの存在下におけるカルサルシンおよびテレットニンの結合にお  
ける差異が、テレットニンへのカルサルシン結合のモジュレーターとして、上記の候補モジ  
ュレーターを同定する工程を包含する。特定の実施形態において、カルサルシンおよびテ  
レットニンは、無細胞系の一部である。別の特定の実施形態において、カルサルシンおよび  
20  
テレットニンは、インタクトな細胞内に位置する。さらなる特定の実施形態において、この  
細胞は、筋細胞である。さらなる特定の実施形態において、この細胞は、H9C2細胞、  
C2C12細胞、3T3細胞、293細胞、新生児心筋細胞、成体心筋細胞または筋管細  
胞である。さらなる特定の実施形態において、このインタクトな細胞は、動物内に位置す  
る。別の特定の実施形態において、このモジュレーターは、テレットニンへのカルサルシン  
結合を増大または減少する。さらなる特定の実施形態において、カルサルシンおよびテレ  
ットニンの両方が標識される。別の特定の実施形態において、カルサルシンおよびテレ  
ットニンの両方が標識され、一方は、消光可能な標識で標識され、そして他方は、消光剤で標識  
される。さらなる特定の実施形態において、カルサルシンおよびテレットニンの両方が標識  
されるが、上記の標識は、互いに近接する場合を除いて、検出不可能である。別の特定の  
30  
実施形態において、この測定工程は、カルサルシン、テレットニンまたは両方の免疫学的検  
出を含む。さらなる実施形態において、この方法は、モジュレーターの非存在下で、カル  
サルシンおよびテレットニンの結合を測定する工程をさらに包含する。

#### 【0027】

本発明の別の実施形態において、心肥大、心不全またはII型糖尿病を処置する方法が存  
在し、この方法は、それに罹患する動物に、カルサルシンポリペプチドまたはそのカルシ  
ニューリン結合フラグメントを投与する工程を包含し、ここで、上記のカルサルシンポリ  
ペプチドまたはそのフラグメントは、カルシニューリン活性を阻害する。

#### 【0028】

本発明のさらなる実施形態において、心肥大、心不全またはII型糖尿病を処置する方法  
が存在し、この方法は、それに罹患する動物に、カルサルシンポリペプチドまたはそのカル  
シニューリン結合フラグメントをコードする核酸を、心臓組織において活性化プロモー  
ターの制御下で投与する工程を包含し、ここで、上記のカルサルシンポリペプチドまたは  
そのフラグメントの発現は、カルシニューリン活性を阻害する。また、インヒビターは、  
カルシニューリン-カルサルシン、または - アクチニン相互作用を妨げる任意の分子で  
あり得る。特定の実施形態において、このポリペプチドは、カルサルシンのドミナントネ  
ガティブ形態である。別の特定の実施形態において、この方法は、以下からなる群より選  
40  
択される化合物を用いて上記の動物を処置する工程をさらに包含する：イオノトロープ(  
ionotrope)、ブロッカー、抗不整脈薬、利尿薬、血管拡張薬、ホルモンアン  
タゴニスト、エンドセリンアンタゴニスト、アンジオテンシン2型アンタゴニストおよび  
サイトカインインヒビター/ブロッカー。さらなる特定の実施形態において、このプロモ  
50

ーターは、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターである。

【0029】

本発明のさらなる実施形態において、細胞における遺伝子転写のカルシニューリン活性化を阻害する方法が存在し、この方法は、上記の細胞に、標的化ペプチドに融合されるカルサルシンまたはそのカルシニューリン結合フラグメントを含む融合タンパク質を提供する工程であって、この標的ペプチドは、上記の融合タンパク質を、正常機能の亜細胞領域以外の亜細胞領域に局在化させる工程を包含する。特定の実施形態において、標的ペプチドは、ゲラニルゲラニル基、核局在化シグナル、ミリスチル化シグナルおよび小胞体シグナルペプチドを含む。別の特定の実施形態において、細胞は、動物内に位置する。さらなる特定の実施形態において、この動物は、ヒトである。さらなる特定の実施形態において、この方法は、上記の動物を、以下からなる群より選択される化合物を用いて処理する工程をさらに包含する：イオノトロップ、ブロッカー、抗不整脈薬、利尿薬、血管拡張薬、ホルモンアンタゴニスト、エンドセリンアンタゴニスト、アンジオテンシン2型アンタゴニストおよびサイトカインインヒビター/ブロッカー。

10

【0030】

本発明の別の実施形態において、カルサルシンを結合するペプチドを同定する方法が存在し、この方法は、カルサルシンポリペプチドまたはそのフラグメントを、支持体に接着する工程；上記のカルサルシンポリペプチドまたはフラグメントを、候補ペプチドに曝露する工程；および上記の候補ペプチドの、上記のカルサルシンポリペプチドまたはそのフラグメントとの結合についてアッセイする工程を包含する。特定の実施形態において、この支持体は、ニトロセルロース、カラムまたはゲルからなる群より選択される。

20

【0031】

本発明のさらなる実施形態において、抗心筋症 (anti-cardiomyopic) の肥大活性または抗心不全活性に対する候補物質についてスクリーニングする方法が存在し、この方法は、機能的カルサルシンポリペプチドを欠失する細胞を提供する工程；上記の細胞を、上記の候補物質と接触させる工程；および上記の細胞に対する上記の候補物質の効果を決定する工程を包含する。特定の実施形態において、この細胞は、筋細胞である。別の特定の実施形態において、この細胞は、カルサルシンの調節領域に変異を有する。さらなる特定の実施形態において、この変異は、欠失変異、挿入変異または点突然変異である。特定の実施形態において、この細胞は、カルサルシンのコード領域に変異を有する。別の特定の実施形態において、この変異は、欠失変異、挿入変異、フレームシフト変異、ナンセンス変異、ミスセンス変異またはスプライシング変異である。さらなる特定の実施形態において、この細胞は、インビトロまたはインビボで接触される。さらなる特定の実施形態において、この細胞は、非ヒトトランスジェニック動物内に位置する。

30

【0032】

(例示的な実施形態の詳細な説明)

心不全 - 心臓が、ホメオスタシスを維持するに十分な速度で、血液を押し出せないことは、今日の世界における主要な健康問題である。これは、心臓疾患によって引き起こされる早死に起因するだけでなく、必要とされる患者の援助に起因して陥る莫大な支出 (入院期間の延長を含む) に起因して真実である。従って、この高価かつ衰弱させる疾患に取り組む多大な必要性が残存する。

40

【0033】

本発明者らは、本明細書中において、カルシニューリンの活性形態を結合し得るカルシニューリン結合ペプチド (カルサルシン - 1) を報告する。特定の実施形態において、カルサルシン - 1 はまた、カルシニューリンの不活性形態を結合する。さらに、カルサルシン - 1 は、アクチニン (筋節形態および非筋節形態の両方) を結合し、これは、筋節に結合される。この筋節は、筋肉組織 (例えば、心筋) における重要な筋肉サブユニットであり、これは、多くの点で、横紋筋に似ている。この筋節は、筋肉の最小の収縮成分であり、そしてタンパク質フィラメント (アクチンフィラメントおよびミオシンフィラメントを含む) から構成される。この細いフィラメントは、より小さなアクチンサブユニットか

50

ら構成されるタンパク質フィラメントであり、このサブユニットが結合して、繊維状のアクチンまたはFアクチンを形成する。各々の細いフィラメントは、2つの絡み合うアクチンフィラメントからなる。太いフィラメントは、タンパク質分子、ミオシンから構成され、このミオシンは、尾部領域および頭部領域の両方を有し、これにおいて、この頭部領域は、収縮の間に、太いフィラメントを細いフィラメントに接続する。筋節自身は、2つのZ線（また、Zディスクとも呼ばれる）との間の領域として規定され、これは、ある筋節の細いフィラメントが、次の筋節の細いフィラメントに付着する境界（*d e m a r a c t i o n*）である。上記で議論されるように、このZディスクは、 - アクチニンから構成される。

【0034】

最新の結果は、カルサルシン - 1 とカルシニューリンとの間の相互作用が、ヒト心臓疾患の病理生物学、および最終的に治療に関係があることを示す。例えば、肥大型心筋症の家族性形態は、カルシニューリンシグナル伝達を伴うような様式で（*M a r b a n*ら、1987）、筋節のタンパク質をコードする遺伝子における変異によって引き起こされる（*S e i d m a n*および*S e i d m a n*、1998）。カルシニューリンアンタゴニスト薬物、シクロスポリンAまたはFK - 506の投与は、肥大型心筋症の家族性形態のトランスジェニック動物モデルにおいて、心肥大を妨げるが（*S u s s m a n*ら、1998）、類似の臨床試験は、現存する因子の毒性の副作用（例えば、免疫抑制および高血圧）のために排除される。

【0035】

カルシニューリンアンタゴニストはまた、ヒト集団において一般的である心筋症の獲得形態のいくつかの（しかしすべてではない）動物モデルにおいて、心肥大および心不全を防ぐが（*S u s s m a n*ら、1998；*D i n g*ら、1999；*Z h a n g*ら、1999）、臨床試験に対する同じ制約が適用される。心筋におけるカルサルシン - 1 が比較的多いために、これは薬物開発についての主要な標的となり、最新のカルシニューリンアンタゴニストのこれらの制約を回避する。

【0036】

本発明の結果は、カルサルシン1、カルサルシン2およびカルサルシン3が、遺伝性筋ジストロフィおよびミオパシーについての候補遺伝子であることをさらに示し；そしてテレトニン（肢帯筋ジストロフィに關与する遺伝子）とのカルサルシンの相互作用によって、これをさらに支持する。筋ジストロフィ（MD）は、進行性脱力、および運動を制御する骨格筋または随意筋の変性によって特徴付けられる遺伝子疾患の群をいう。心臓の筋肉およびいくつかの他の不随意筋はまた、いくつかの形態のMDにおいて冒され、そしていくつかの形態は、同様に、他の器官を冒す。主要な形態のMDとしては、筋緊張性ジストロフィ、デュシェーヌジストロフィ、ベッカー筋ジストロフィ、肢帯筋ジストロフィ、顔面肩甲上腕筋ジストロフィ、先天性筋ジストロフィ、眼咽頭筋ジストロフィ、遠位筋ジストロフィおよびエメリー - ドライフス筋ジストロフィが挙げられる。

【0037】

心筋症および筋ジストロフィにおけるカルシニューリン結合タンパク質の重要性が、本発明においてさらに示される。インビボでのそれらの相互作用および共局在に基づいて、本明細書中において、カルサルシン - 1 が、カルシニューリンをZ膜に結合することがまた提唱され、ここで、これは、筋細胞におけるカルシウムシグナル伝達の変化を感知し得、そして潜在的に、肥大シグナルを変換し得る（図8）。カルサルシン - 1 および/または他のカルサルシタンパク質（例えば、カルサルシン - 2 またはカルサルシン - 3）はまた、Z膜の調節、および細胞における他のタンパク質との結合を介して、心筋細胞および骨格筋細胞における構造的役割および/または機械的感覚の役割を果たし得る。Z膜は、筋細胞の構造および機能の調節において、重要な役割を果たすことが示されている。従って、カルサルシンは、これらのプロセスに密接に關与するようであり、そしてヒト心筋症および筋ジストロフィに關与する遺伝子についての強力な候補物である。

【0038】

10

20

30

40

50

## ( I . カルサルシンペプチドおよびポリペプチド )

本出願者らは、本明細書中において、ヒトカルサルシン - 1 ( 配列番号 2 ) およびマウスカルサルシン - 1 ( 配列番号 4 )、ヒトカルサルシン - 2 ( 配列番号 6 )、マウスカルサルシン - 2 ( 配列番号 8 )、ヒトカルサルシン - 3 ( 配列番号 10 ) ならびにマウスカルサルシン - 3 ( 配列番号 12 ) についてのタンパク質配列を提供する。特定の実施形態において、カルシニューリン結合筋節タンパク質 ( カルサルシン ) ペプチド、カルサルシンポリペプチドまたはカルサルシンタンパク質は、カルサルシン - 1、カルサルシン - 2 またはカルサルシン - 3 をいう。カルサルシン - 1 分子全体に加えて、本発明はまた、ポリペプチドのフラグメントに関連し、このフラグメントは、以下に記載される種々の機能を保持するかもしれないし、保持しないかもしれない。フラグメント ( 分子の N 末端を含む ) は、コード領域内部の翻訳停止部位の遺伝子操作によって作製され得る ( 以下に議論される )。あるいは、( プロテアーゼとして公知の ) タンパク質分解酵素を用いたカルサルシン - 1 の処理は、種々の N 末端フラグメント、C 末端フラグメントおよび内部フラグメントを産生し得る。フラグメントの例としては、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40、45、50、55、60、65、75、80、85、90、95、100、200 以上のアミノ酸長の配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10 および配列番号 12 の連続した残基が挙げられ得る。これらのフラグメントは、公知の方法 ( 例えば、沈殿 ( 例えば、硫酸アンモニウム )、HPLC、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー ( 免疫アフィニティークロマトグラフィーを含む ) または種々のサイズ分離 ( 沈降、ゲル電気泳動、ゲル濾過 ) ) に従って精製され得る。

10

20

## 【 0 0 3 9 】

## ( A . 構造特徴 )

当業者は、カルサルシン - 1、カルサルシン - 2 および / またはカルサルシン - 3 の構造特徴を決定するための標準的な方法を承知しており、この方法は、例えば、市販のコンピュータプログラムまたはインターネット上で利用可能な政府支援プログラム ( <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/> ) である。

## 【 0 0 4 0 】

## ( B . 機能的局面 )

本明細書中の実施例に記載されるように、カルサルシン - 1 の領域は、 - アクチニンとの結合に参与する。特定の実施形態において、この領域は、アミノ酸 105 と 176 との間に局在する ( 実施例 7 を参照のこと )。別の実施形態において、カルサルシン - 1 の領域は、類似の方法によって、カルシニューリンとの結合に参与することが決定される。さらなる実施形態において、カルサルシン - 2 および / またはカルサルシン - 3 は、類似の方法によって、カルシニューリンとの結合に参与することが同定される。別の実施形態において、1 を超えるカルサルシンポリペプチドが、カルシニューリンと相互作用し、そして特定の実施形態において、1 を超えるカルサルシンポリペプチドが、付随してカルシニューリンと相互作用する。別の実施形態において、1 を超えるカルサルシンポリペプチドが、 - アクチニンと相互作用する。さらなる特定の実施形態において、1 を超えるカルサルシンポリペプチドが、付随して - アクチニンと相互作用する。特定の実施形態において、カルサルシン - 1 アミノ酸配列、カルサルシン - 2 アミノ酸配列および / またはカルサルシン - 3 アミノ酸配列が、当該分野で標準的なコンピュータプログラムによって、または肉眼で比較されて、カルシニューリン相互作用についての候補物であるような類似のドメインを探索する。カルサルシン - 1、カルサルシン - 2 および / またはカルサルシン - 3 におけるこのドメインは、当該分野で標準的な方法 ( 例えば、指向性ツーハイブリッド分析または共同免疫沈降 ) によって、カルシニューリン結合について試験される。これらの研究は、カルサルシン - 1 のカルシニューリン結合ドメインが、残基 217 ~ 240 に局在することを明らかにした。

30

40

## 【 0 0 4 1 】

50

## ( C . カルサルシンの改変体 )

カルサルシンポリペプチドのアミノ酸配列改変体は、置換改変体、挿入改変体または欠失改変体であり得る。欠失改変体は、ネイティブタンパク質の1以上の残基を欠失し、この残基は、機能または免疫原性活性に不可欠ではない。別の一般的な型の欠失改変体は、分泌シグナル配列、またはタンパク質に細胞の特定の部分に結合することを指向するシグナル配列を欠失する改変体である。挿入改変体は、代表的には、ポリペプチドの非末端地点に物質の付加を含む。これは、免疫反応性エピトープまたは単に1残基の挿入を含み得る。末端付加(融合タンパク質と呼ばれる)は、以下に議論される。

## 【 0 0 4 2 】

置換改変体は、代表的には、タンパク質内部の1以上の部位で、あるアミノ酸の別のアミノ酸への交換を含み、そして他の機能または性質を失わずに、ポリペプチドの1つ以上の性質(例えば、タンパク質分解開裂に対する安定性)を調節するように設計され得る。この種類の置換は、好ましくは、保存的であり、すなわち、1つのアミノ酸が、類似の形状および荷電のアミノ酸で置換される。保存的置換は、当該分野で周知であり、そして例えば、以下の変化を含む;アラニンからセリン;アルギニンからリジン;アスパラギンからグルタミンまたはヒスチジン;アスパラギン酸からグルタミン酸;システインからセリン;グルタミンからアスパラギン;グルタミン酸からアスパラギン酸;グリシンからプロリン;ヒスチジンからアスパラギンまたはグルタミン;イソロイシンからロイシンまたはバリン;ロイシンからバリンまたはイソロイシン;リジンからアルギニン;メチオニンからロイシンまたはイソロイシン;フェニルアラニンからチロシン、ロイシンまたはメチオニン;セリンからスレオニン;スレオニンからセリン;トリプトファンからチロシン;チロシンからトリプトファンまたはフェニルアラニン;およびバリンからイソロイシンまたはロイシン。

## 【 0 0 4 3 】

以下は、等価な、または改善さえされる雑種第二分子を作製するためのタンパク質またはポリペプチドのアミノ酸の変化に基づいた議論である。例えば、特定のアミノ酸が、構造(例えば、抗体の抗原結合領域または基質分子上の結合部位のような)との相互作用性結合能の相当な損失を伴わずに、タンパク質構造において他のアミノ酸について置換され得る。タンパク質の生物学的機能活性を規定するのは、タンパク質の相互作用能および性質であるので、特定のアミノ酸置換は、タンパク質配列およびその基礎をなすDNAコード配列においてなされ得、そしてそれにもかかわらず、類似の性質を有するタンパク質を獲得し得る。従って、本発明者らによって、種々の変化が、以下に議論されるように、対応するポリペプチドの生物学的有用性または活性の相当な損失を伴わずに、遺伝子のDNA配列においてなされ得ることが意図される。本明細書中の他の場所に提供される表1は、特定のアミノ酸をコードするコドンを示す。

## 【 0 0 4 4 】

このような変化を行う際に、アミノ酸のヒドロパシー(hydrophobic)指標が考慮され得る。タンパク質への相互作用性の生物学的機能の付与におけるヒドロパシーアミノ酸指標の重要性は、一般に、当該分野で理解される(KyteおよびDoolittle、1982)。アミノ酸の相対的ヒドロパシー特性が、結果として生じるタンパク質の二次構造に寄与し、これは、次に、他の分子(例えば、酵素、基質、レセプター、DNA、抗体、抗原など)とのタンパク質の相互作用を規定することが認められる。

## 【 0 0 4 5 】

各々のアミノ酸は、その疎水性および荷電特性に基づいて、ヒドロパシー指標を割り当てられており(KyteおよびDoolittle、1982)、これらは、以下である:イソロイシン(+4.5);バリン(+4.2);ロイシン(+3.8);フェニルアラニン(+2.8);システイン/シスチン(+2.5);メチオニン(+1.9);アラニン(+1.8);グリシン(-0.4);スレオニン(-0.7);セリン(-0.8);トリプトファン(-0.9);チロシン(-1.3);プロリン(-1.6);ヒスチジン(-3.2);グルタミン酸(-3.5);グルタミン(-3.5);アスパラギン

ン酸 ( - 3 . 5 ) ; アスパラギン ( - 3 . 5 ) ; リジン ( - 3 . 9 ) ; およびアルギニン ( - 4 . 5 ) 。

【 0 0 4 6 】

当該分野において、特定のアミノ酸が、類似のヒドロパシー指標またはスコアを有する他のアミノ酸によって置換され得、そして類似の生物学的活性を有するタンパク質をなおもたらす(すなわち、生物学的な機能が等価なタンパク質をなお得る)ことが公知である。このような変化を行う際に、ヒドロパシー指標が、 $\pm 2$ 以内であるアミノ酸の置換が好ましく、 $\pm 1$ 以内の置換が、特に好ましく、そして $\pm 0.5$ 以内の置換が、なおより特に好ましい。

【 0 0 4 7 】

当該分野において、類似のアミノ酸の置換が、親水性に基づいて有効に作製され得ることがまた理解される。本明細書中において参考として援用される米国特許第 4, 554, 101号は、タンパク質の最も大きな局所平均親水性が、その近傍のアミノ酸の親水性によって支配されるように、このタンパク質の生物学的性質に相関することを述べる。米国特許第 4, 554, 101号に詳述されるように、以下の親水性値は、アミノ酸残基に対して割り当てられている: アルギニン (+ 3 . 0 ) ; リジン (+ 3 . 0 ) ; アスパラギン酸 (+ 3 . 0  $\pm$  1 ) ; グルタミン酸 (+ 3 . 0  $\pm$  1 ) ; セリン (+ 0 . 3 ) ; アスパラギン (+ 0 . 2 ) ; グルタミン (+ 0 . 2 ) ; グリシン ( 0 ) ; スレオニン ( - 0 . 4 ) ; プロリン ( - 0 . 5  $\pm$  1 ) ; アラニン ( - 0 . 5 ) ; ヒスチジン\* ( - 0 . 5 ) ; システイン ( - 1 . 0 ) ; メチオニン ( - 1 . 3 ) ; バリン ( - 1 . 5 ) ; ロイシン ( - 1 . 8 ) ; イソロイシン ( - 1 . 8 ) ; チロシン ( - 2 . 3 ) ; フェニルアラニン ( - 2 . 5 ) ; トリプトファン ( - 3 . 4 ) 。

【 0 0 4 8 】

アミノ酸が、類似の親水性値を有する別のアミノ酸について置換され得、そして生物学的に等価かつ免疫学的に等価なタンパク質をなお獲得することが理解される。このような変化において、親水性値が、 $\pm 2$ 以内であるアミノ酸の置換が好ましく、 $\pm 1$ 以内の置換が、特に好ましく、そして $\pm 0.5$ 以内の置換が、なおより特に好ましい。

【 0 0 4 9 】

上記で略述されるように、アミノ酸置換は、一般的には、アミノ酸側鎖の置換基の相対的類似性(例えば、その疎水性、親水性、電荷、サイズなど)に基づく。種々の上述の特性を考慮する例示的な置換は、当業者に周知であり、そして以下を含む: アルギニンおよびリジン; グルタミン酸およびアスパラギン酸; セリンおよびスレオニン; グルタミンおよびアスパラギン; ならびにバリン、ロイシンおよびイソロイシン。

【 0 0 5 0 】

本発明に従ったポリペプチドの調製についての別の実施形態は、ペプチド模倣物の使用である。模倣物は、ペプチド含有分子であり、これは、タンパク質の二次構造の成分を模倣する(Johnsonら、1993)。ペプチド模倣物の使用の背後の基礎をなす原理は、タンパク質のペプチド骨格が存在して、本質的に、分子相互作用(例えば、抗体および抗原の相互作用)を容易にするような様式で、アミノ酸側鎖を配向することである。ペプチド模倣物は、天然の分子に類似の分子相互作用を可能にすることが期待される。これらの原理が、上記で略述される原理と共に使用されて、カルサルシンの天然の性質の多くを有するが、変更され、そしてなお改善される特性を有する雑種第二代分子を操作し得る。

【 0 0 5 1 】

( D . ドメインスイッチング )

実施例に記載されるように、本発明者らは、カルサルシンを単離した。当該分野における標準的な手段によって決定される、ヒトカルサルシンと、マウスカルサルシンと、ラットカルサルシンとの間の相同性を考慮すると、興味深い一連の変異体が、種々のタンパク質の相同領域の置換によって作製され得る。これは、特定の状況において、「ドメインスイッチング」として公知である。

【 0 0 5 2 】

10

20

30

40

50

ドメインスイッチングは、異なるが、この場合においては関連するポリペプチドを用いたキメラ分子の作製を伴う。種々のカルサルシタンパク質の比較によって、これらの分子の機能的に有意な領域に関する予測を行い得る。次いで、カルサルシン機能に対するこれらの領域の臨界を決定しようと努力して、これらの分子の関連ドメインをスイッチすることが可能である。これらの分子は、これらの「キメラ」が、天然の分子と区別され得るが、一方、同じ機能を提供するかもしれない点において、さらなる価値を有し得る。

## 【0053】

## (E. 融合タンパク質)

挿入改変体の特殊化種類は、融合タンパク質である。この分子は、一般的に、N末端またはC末端で、第二のポリペプチドのすべてまたは一部に結合したネイティブ分子のすべてまたは実質的部分を有する。例えば、融合は、代表的には、他の種由来のリーダー配列を利用して、異種宿主におけるタンパク質の組換え発現を可能にする。別の有用な融合は、免疫学的に活性なドメイン（例えば、抗体エピトープ）の付加を含み、融合タンパク質の精製を容易にする。融合点または融合点付近での開裂部位の包含は、精製後の外来ポリペプチドの除去を容易にする。他の有用な融合は、機能的ドメイン（例えば、酵素由来の活性部位、グリコシル化ドメイン、細胞標的化シグナルまたは膜貫通領域）の結合を含む。特定の実施形態において、カルサルシンを含む融合タンパク質が利用されて、細胞における遺伝子転写のカルシニューリン活性化を阻害し、この細胞において、融合タンパク質は、上記の融合タンパク質カルサルシンを、上記のカルシニューリンについての正常機能の亜細胞領域以外の亜細胞領域に局在させる。カルシニューリン機能の局在化についての亜細胞領域を同定するための方法は、当該分野で周知であり、そして亜細胞分別および免疫局在化を通じて、標識されるカルシニューリンの透過電子顕微鏡法単離を含む。特定の実施形態において、カルサルシンを含む融合タンパク質はまた、標的ペプチドを含み、ここで、この標的ペプチドは、ゲラニルゲラニル基、核局在化シグナル、ミリスチル化シグナルまたは小胞体シグナルペプチドを含む。特定の実施形態において、ゲラニルゲラニル基またはミリスチル化シグナルは、膜に対して融合タンパク質を標的化する。

## 【0054】

## (F. タンパク質の精製)

カルサルシンまたはその改変体を精製することが望ましい。タンパク質精製技術は、当業者に周知である。これらの技術は、1つのレベルにおいて、細胞環境の、ポリペプチドおよび非ポリペプチド画分への粗分別を含む。ポリペプチドを他のタンパク質から分離して、目的のポリペプチドは、クロマトグラフィー技術および電気泳動技術を用いてさらに精製されて、部分精製または完全精製（もしくは均質性までの精製）を達成する。純粋なペプチドの精製に特に適した分析方法としては、イオン交換クロマトグラフィー、排除クロマトグラフィー；ポリアクリルアミドゲル電気泳動；および等電点電気泳動が挙げられる。精製ペプチドの特に有効な方法は、高速タンパク質液体クロマトグラフィーおよびHPLCである。

## 【0055】

本発明の特定の局面は、コードタンパク質またはペプチドの精製に関し、そして特定の実施形態において、コードタンパク質またはペプチドの実質的精製に関する。本明細書中で使用される場合、用語「精製タンパク質またはペプチド」は、他の成分から単離可能な組成物をいうことが意図され、ここで、このタンパク質またはペプチドは、その天然に獲得可能な状態に対する任意の程度まで精製される。従って、精製タンパク質またはペプチドはまた、天然に存在し得る環境を含まないタンパク質またはペプチドをいう。

## 【0056】

一般的に、「精製された」は、分別に供されて、種々の他の成分を除去されるタンパク質またはペプチド組成物をいい、そしてこの組成物は、その発現される生物学的活性を実質的に保持する。用語「実質的に精製される」が使用される場合、この呼称は、タンパク質またはペプチドが、組成物の主要な成分を形成する（例えば、組成物において、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%以上のタンパク質を構成する）組

10

20

30

40

50

成物をいう。

【0057】

タンパク質またはペプチドの精製の程度の定量についての種々の方法は、本発明の開示を考慮して、当業者に公知である。これらとしては、例えば、活性画分の特異的活性を決定する工程、またはSDS/PAGE分析による画分内のポリペプチドの量を評価する工程を包含する。画分の純度の評価についての好ましい方法は、この画分の特異的活性を計算し、それを最初の抽出物の特異的活性と比較し、従って、純度（本明細書中において、「～倍の精製数」によって評価される）を計算することである。活性の量を表現するために使用される実際の単位は、もちろん、精製を続けるために選択される特定のアッセイ技術、および発現タンパク質またはペプチドが、検出可能な活性を示すか否かに依存する。

10

【0058】

タンパク質精製における使用に適切な種々の技術は、当業者に周知である。これらは、例えば、以下を含む：硫酸アンモニウム、PEG、抗体などを用いた沈殿、または熱変性による沈殿、遠心分離後の沈殿；クロマトグラフィー工程（例えば、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーおよびアフィニティークロマトグラフィー）；等電集束法；ゲル電気泳動；ならびにこのような技術および他の技術の組み合わせ。当該分野において一般的に公知であるように、種々の精製工程の実施の順序が、変化し得るか、または特定の工程が省略され得ることが考えられ、そして実質的に精製されるタンパク質またはペプチドの調製についての適切な方法をなおもたらす。

20

【0059】

タンパク質またはペプチドが、常にその最も精製される状態で提供されるという一般的な要件は存在しない。実際に、さほど実質的に精製されない産物が、特定の実施形態において有用性を有することが意図される。部分精製は、組み合わせたより少数の精製工程によってか、または異なる形態の同じ一般的精製スキームの利用によって果たされ得る。例えば、HPLC装置を利用して行われる陽イオン交換カラムクロマトグラフィーは、一般的に、低圧のクロマトグラフィー系を利用する同じ技術よりも大きな「～倍の」精製をもたらすことが理解される。より低い程度の相対的精製を示す方法は、タンパク質産物の総回収における利点、または発現されるタンパク質の活性の維持における利点を有し得る。

【0060】

ポリペプチドの移動が、SDS/PAGEの異なる条件を用いて、時折有意に変化し得ることが公知である（Capaldiら、1977）。従って、異なる電気泳動条件下で、精製発現産物または部分精製発現産物の見かけの分子量が変化し得ることが理解される。

30

【0061】

高速液体クロマトグラフィー（HPLC）は、並はずれた分解能のピークを伴う非常に迅速な分離によって特徴付けられる。これは、非常に細かい粒子および高圧の使用によって達成されて、適切な流速を維持する。分離は、約数分、またはせいぜい1時間で果たされ得る。さらに、極めて少量のサンプルのみが必要とされる。なぜなら、この粒子は非常に小さくそして密に詰まっているので、ポイド容量が、総容量の極めて少ない画分であるからである。また、サンプルの濃度が非常に高い必要はない。なぜなら、このバンドは非常に狭いので、このサンプルの非常にわずかな希釈が存在するからである。

40

【0062】

ゲルクロマトグラフィーまたは分子篩クロマトグラフィーは、分子サイズに基づく特殊型の分配クロマトグラフィーである。ゲルクロマトグラフィーの背後の理論は、カラム（これは、小孔を含む不活性物質の小さな粒子を用いて調製される）が、分子のサイズに依存して、孔を通過するかまたは回るように、より小さな分子からより大きな分子を分離する。粒子が作製される材料が、分子を吸着しない限りは、流速を決定する唯一の因子はサイズである。従って、分子は、形状が比較的一定である限りは、漸減サイズでカラムから溶出される。ゲルクロマトグラフィーは、異なるサイズの分子の分離に卓越する。なぜなら、分離は、すべての他の因子（例えば、pH、イオン強度、温度など）から独立するから

50

である。また、実質的に吸着は存在せず、より少ないゾーン分離および溶出量が、簡単な事柄で分子量に関連する。

【0063】

アフィニティークロマトグラフィーは、単離されるべき物質とそれに特異的に結合し得る分子との間の特異的親和性に頼るクロマトグラフィー手順である。これは、レセプター-リガンド型相互作用である。カラム材料は、結合パートナーのうちの1つを不溶性マトリックスに共有結合することによって合成される。次いで、このカラム材料は、溶液から物質を特異的に吸着し得る。溶出は、条件を結合が生じない条件に変化させることによって（pH、イオン強度、温度などを変更することによって）生じる。

【0064】

炭水化物含有化合物の精製に有用な特定の型のアフィニティークロマトグラフィーは、レクチンアフィニティークロマトグラフィーである。レクチンは、種々の多糖類および糖タンパク質に結合する物質のクラスである。レクチンは、通常、プロモシアンによってアガロースに結合される。セファロースに結合されるコンカナバリンA (concanavalin A) は、使用されるべきこの種類の第一の物質であり、そして多糖類および糖タンパク質の単離に広範に使用されている。他のレクチンとしては、レンチルレクチン、小麦胚芽凝集素（これは、N-アセチルグルコサミニル残基の精製に有用である）およびHelix pomatiaレクチンが挙げられる。レクチン自身は、炭水化物リガンドとのアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製される。ラクトースが使用されて、ヒマの実およびピーナッツからレクチンを精製する；マルトースは、レンズマメおよびタチナタマメからのレクチンの抽出に有用である；N-アセチル-Dガラクトサミンは、ダイズからのレクチンの精製のために使用される；N-アセチルグルコサミニルは、小麦胚芽由来のレクチンに結合する；D-ガラクトサミンは、二枚貝 (clams) からのレクチンの獲得に使用されており、そしてL-フコースは、ミヤコグサ (lotus) 由来のレクチンに結合する。

【0065】

このマトリックスは、それ自身、どんな有意な程度までの分子も吸着せず、そして広範な化学的安定性、物理的安定性および熱安定性を有する物質であるべきである。このリガンドは、その結合性質に影響を及ぼさないような様式で結合されるべきである。このリガンドはまた、比較的密接な結合を提供するべきである。そしてこれは、サンプルまたはリガンドを破壊することなく、物質の溶出を可能にするべきである。最も一般的な形態のアフィニティークロマトグラフィーのうちの1つは、免疫アフィニティークロマトグラフィーである。本発明に従った使用に適切な抗体の作製は、以下に議論される。

【0066】

(G. 合成ペプチド)

本発明はまた、本発明の種々の実施形態における使用についてのより小さなカルサルシンペプチドを記載する。その比較的小さなサイズのために、本発明のペプチドはまた、従来技術に従って、溶液中または固体支持体上で合成され得る。種々の自動合成器が市販され、そして公知のプロトコルに従って使用され得る。例えば、StewartおよびYoung、(1984)；Tamら、(1983)；Merrifield、(1986)；ならびにBaranyおよびMerrifield (1979) (各々は、本明細書中において参考として援用される) を参照のこと。短いペプチド配列、または重複ペプチドのライブラリ (通常、およそ6アミノ酸からおよそ35~50アミノ酸まで) (これは、本明細書中に記載される選択領域に対応する) が容易に合成され得、次いで、反応性ペプチドを同定するように設計されるスクリーニングアッセイにおいてスクリーニングされ得る。あるいは、組換えDNAテクノロジーが利用され得、ここで、本発明のペプチドをコードするヌクレオチド配列が、発現ベクターに挿入され、適切な宿主細胞に形質転換またはトランスフェクトされ、そして発現に適切な条件下で培養される。

【0067】

(H. 抗原組成物)

10

20

30

40

50

本発明はまた、抗体の産生に関連する動物の免疫についての抗原として、カルサルシンタンパク質またはペプチドの使用を提供する。カルサルシンまたはその一部分が、リンカー、ポリリンカーまたは誘導体化アミノ酸を介して、1つ以上の因子に結合(coupled)、結合(bonded)、結合(bound)、結合体化(conjugated)または化学結合されることが予見される。これが行われ得、その結果、二重特異性組成物または多価組成物あるいはワクチンが産生される。これらの組成物の調製において使用される方法が、当業者に周知であり、そして動物への投与に適切である(すなわち、薬学的に受容可能である)べきであることがさらに予見される。好ましい因子は、キャリア(キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)またはウシ血清アルブミン(BSA))である。

10

## 【0068】

(II. 核酸)

本発明はまた、別の実施形態において、カルサルシンをコードする核酸を提供する。カルサルシン核酸は、ヒトカルサルシン-1、ヒトカルサルシン-2、ヒトカルサルシン-3、マウスカルサルシン-1、マウスカルサルシン-2およびマウスカルサルシン-3を含む。ヒトカルサルシン-1についての核酸(配列番号1)およびマウスカルサルシン-1についての核酸(配列番号3)が同定されている。さらに、3つのマウスカルサルシン-2 ESTおよび4つのヒトカルサルシン-2 ESTが同定された(実施例1を参照のこと)。マウスカルサルシン-2 ESTは、以下の通りである: GenBank番号AA036142; GenBank番号AW742494; およびGenBank番号W29466。ヒトカルサルシン-2 ESTは以下の通りである: GenBank番号AW964108; GenBank番号AA197193; GenBank番号AW000988; およびGenBank番号AA176945。特定の実施形態において、マウスカルサルシン-2 ESTおよびヒトカルサルシン-2 ESTは、当該分野で公知のコンピュータプログラムによって整列されて、それぞれ全長のマウスカルサルシン-2配列および全長のヒトカルサルシン-2配列を同定する。本発明は、これらの核酸に対する範囲に限定されない。しかし、当業者は、これらの核酸を用いて、種々の他の種(例えば、ラット、ウサギ、イヌ、サル、テナガザル、ヒト、チンパンジー、類人猿、ヒヒ、ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ネコおよび他の種)における関連ホモログを容易に同定し得る。

20

## 【0069】

別の特定の実施形態において、カルサルシン-3は、カルサルシン1配列およびカルサルシン2配列をデータベースと比較することによって、「インシリコで(in silico)」発見された。いくつかの相同配列を含むヒトゲノムDNA(AC008453.3; 公共データベース、Celeraデータベースではない)が、カルサルシン-3のエキソンであることが確認された。プライマーが設計され、そしてヒト骨格筋ライブラリが、ヒトカルサルシン-3に対する全長cDNAについてスクリーニングされた(図5)。同様に、マウス骨格筋ライブラリがスクリーニングされ、そしてマウスカルサルシン-3についてコードするいくつかの独立クローンおよび重複クローンが同定された。cDNAおよびゲノムライブラリ由来の全長核酸配列が比較されて、エキソン配列とイントロン配列間を区別する(Sambrookら、1989)。さらに、当該分野で周知のコンピュータプログラムは、この核酸配列を使用して、推定アミノ酸配列を作製する。

30

40

## 【0070】

さらに、本発明が、本明細書中に開示される特定の核酸に限定されないことが明らかであるはずである。以下に議論されるように、「カルサルシン核酸」は、種々の異なる塩基を含み得、そして対応するポリペプチドをまだなお産生し、このポリペプチドは、本明細書中に開示されるヒトおよびマウスの核酸から機能的に区別できず、そしていくつかの場合において、これらの核酸から構造的に区別できない。

## 【0071】

同様に、核酸に対する任意の参照は、この核酸を含む宿主細胞、およびいくつかの場合において、この核酸の産物を発現し得る宿主細胞を包含するとして読まれるべきである。治

50

療的考慮に加えて、本発明の核酸を発現する無細胞系の細胞は、カルサルシンの機能を誘導、抑制、阻害、増大、干渉、ブロック、阻止、刺激または増強する因子についてのスクリーニングの状況における有用性を提供し得る。

【0072】

(A. カルサルシン - 1 をコードする核酸)

本発明に従った核酸は、カルサルシン核酸、カルサルシンのドメインまたは本明細書中に示されるようなカルサルシン - 1 の任意の他のフラグメントをコードし得る。好ましい実施形態において、この核酸は、カルサルシンペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質をコードし、これは、機能的活性または免疫原性活性を有する。特定の実施形態において、用語「カルサルシン核酸」または「カルサルシン」は、カルサルシン - 1 核酸、カルサルシン - 2 核酸またはカルサルシン - 3 核酸、それぞれカルサルシン - 1 のドメイン、カルサルシン - 2 のドメインまたはカルサルシン - 3 のドメイン、あるいは本明細書中に示されるようなカルサルシン - 1 の任意の他のフラグメント、カルサルシン - 2 の任意の他のフラグメントまたはカルサルシン - 3 の任意の他のフラグメントをいう。この核酸は、ゲノム DNA に由来し得、すなわち、特定の生物のゲノムから直接クローニングされ得る。しかし、好ましい実施形態において、この核酸は、相補的 DNA (cDNA) を含む。また、cDNA および天然のイントロンまたは別の遺伝子に由来するイントロンが意図される；このような操作される分子は、時折、「ミニ遺伝子」といわれる。最低限において、これらの核酸および本発明の他の核酸は、例えば、ゲル電気泳動において、分子量基準として使用され得る。

10

20

【0073】

用語「cDNA」は、鋳型としてメッセンジャー RNA (mRNA) を用いて調製される DNA をいうことが意図される。ゲノム DNA あるいはゲノムの非プロセシング RNA 鋳型またはゲノムの部分プロセシング RNA 鋳型から重合される DNA とは対照的に、cDNA を使用する利点は、cDNA が、対応するタンパク質のコード配列を主に含むことである。完全なゲノム配列または部分ゲノム配列が好ましい場合が存在し得、これは例えば、非コード領域が、最適発現に必要であるか、またはイントロンのような非コード領域が、アンチセンスストラテジーにおいて標的されるべきである場合である。

【0074】

また、所定の種由来の所定のカルサルシンが、天然の改変体によって表され得ることが意図され、この改変体は、わずかに異なる核酸配列を有するが、それにもかかわらず、同じタンパク質をコードする(以下の表 1 を参照のこと)。

30

【0075】

本出願において使用されるように、用語「カルサルシンをコードする核酸」は、細胞核酸の全体を離れて単離されているカルサルシン核酸分子をいう。好ましい実施形態において、本発明は、本質的に、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9 または配列番号 11 において示されるような核酸配列に関する。用語「配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9 または配列番号 11 に示されるような」は、核酸配列が、それぞれ配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9 または配列番号 11 の一部分に実質的に対応することを意味する。用語「機能的に等価なコドン」は、本明細書中において使用されて、同じアミノ酸をコードするコドン(例えば、アルギニンまたはセリンについての 6 つのコドン(以下の表 1))をいい、そしてまた、以下の頁に議論されるように、生物学的に等価なアミノ酸をコードするコドンをいう。

40

【0076】

【表 1】

表1

アミノ酸			コドン					
アラニン	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU		
システイン	Cys	C	UGC	UGU				
アスパラギン酸	Asp	D	GAC	GAU				
グルタミン酸	Glu	E	GAA	GAG				10
フェニルアラニン	Phe	F	UUC	UUU				
グリシン	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU		
ヒスチジン	His	H	CAC	CAU				
イソロイシン	Ile	I	AUA	AUC	AUU			
リジン	Lys	K	AAA	AAG				
ロイシン	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU
メチオニン	Met	M	AUG					
アスパラギン	Asn	N	AAC	AAU				20
プロリン	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU		
グルタミン	Gln	Q	CAA	CAG				
アルギニン	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU
セリン	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU
スレオニン	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU		
バリン	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU		
トリプトファン	Trp	W	UGG					30
チロシン	Tyr	Y	UAC	UAU				

遺伝コードの縮重を考慮して、少なくとも約50%、通常は少なくとも約60%、より通常には約70%、最も通常には約80%、好ましくは少なくとも約90%および最も好ましくは、約95%のヌクレオチド(このヌクレオチドは、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9または配列番号11のヌクレオチドに等しい)を有する配列が意図される。配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9または配列番号11に示される配列と本質的に同じ配列がまた、標準的な条件下で、それぞれ配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9または配列番号11の相補体を含む核酸セグメントとハイブリダイズし得る配列として機能的に規定され得る。 40

【0077】

本発明のDNAセグメントは、上記のように、生物学的に機能的等価なカルサルシントタンパク質およびペプチドをコードするセグメントを含む。このような配列は、コドンの重複の結果およびアミノ酸の機能的等価の結果として生じ得、これらは、核酸配列内部で自然に生じることが公知であり、従って、タンパク質がコードされる。あるいは、機能的に等価なタンパク質またはペプチドが、組換えDNA技術の適用を介して作製され得、これにおいて、タンパク質構造の変化が、交換されているアミノ酸の性質の考慮に基づいて操作され得る。人によって設計される変化は、以下に議論されるように、部位特異的突然変異 50

誘発技術の適用を通じて導入され得るか、またはランダムに導入され得、そしてその後所望の機能についてスクリーニングされ得る。

【0078】

(B. オリゴヌクレオチドプローブおよびプライマー)

本来、本発明はまた、DNAセグメントを包含し、このセグメントは、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9または配列番号11に示される配列に相補的、または本質的に相補的である。「相補的」である核酸配列は、標準的なワトソン-クリックの相補的規則に従って、塩基対合し得る配列である。本明細書中で使用される場合、用語「相補的配列」は、上記に示される同じヌクレオチド比較によって評価され得るように、または本明細書中に記載されるような比較的ストリンジェントな条件下で、それぞれ配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9または配列番号11の核酸セグメントにハイブリダイズし得ると規定されるように、実質的に相補的である核酸配列を意味する。このような配列は、カルサルシンポリペプチドまたはタンパク質の全体、またはその機能的フラグメントもしくはその非機能的フラグメントをコードし得る。

10

【0079】

あるいは、このハイブリダイズセグメントは、より短いオリゴヌクレオチドであり得る。17塩基長の配列は、ヒトゲノムにおいてただ1回生じるはずであり、従って、独特の標的配列の特定に十分である。より短いオリゴマーは作製し易く、インピボ接近を増大するが、多数の他の因子が、ハイブリダイゼーションの特異性の決定に関与する。その相補的標的に対するオリゴヌクレオチドの結合親和性および配列特異性の両方が、漸増長とともに増大する。8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100以上の塩基対の例示的なオリゴヌクレオチドが使用されるが、他のオリゴヌクレオチドが意図されることが意図される。250、500、1000、1212、1500、2000、2500または3000塩基以上をコードするより長いポリヌクレオチドが、同様に意図される。このようなオリゴヌクレオチドは、例えば、サザンプロットおよびノーザンプロットにおけるプローブとしての使用、ならびに増幅反応におけるプライマーとしての使用を見出す。

20

【0080】

適切なハイブリダイゼーション条件は、当業者に周知である。特定の適用、例えば、部位特異的突然変異誘発によるアミノ酸の置換において、より低いストリンジェンシー条件が必要とされることが理解される。これらの条件下で、ハイブリダイゼーションは、たとえプローブおよび標的鎖の配列が、完全に相補的でなくても生じ得るが、1以上の位置でミスマッチされ得る。条件は、漸増塩濃度および漸減温度によって、より少ないストリンジェンシーにされ得る。例えば、中程度のストリンジェンシー条件は、約37～約55の温度で、約0.1～0.25M NaClによって提供され得、一方、低いストリンジェンシー条件は、約20～約55の範囲の温度で、約0.15M～約0.9Mの塩によって提供され得る。従って、ハイブリダイゼーション条件は、容易に操作され得、従って、一般的に、所望の結果に依存した選択方法である。

30

【0081】

他の実施形態において、ハイブリダイゼーションは、例えば、約20と約37との間の温度で、50mM Tris-HCl (pH 8.3)、75mM KCl、3mM MgCl<sub>2</sub>、10mM ジチオトレイトールの条件下で達成され得る。利用される他のハイブリダイゼーション条件は、約40～約72の範囲の温度で、約10mM Tris-HCl (pH 8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl<sub>2</sub>を含み得る。ホルムアミドおよびSDSがまた使用されて、ハイブリダイゼーション条件を変更し得る。

40

【0082】

本発明のプローブおよびプライマーを使用する1つの方法は、カルサルシンに関連する遺伝子、またはより特に、他の種由来のカルサルシンのホモログの検索にある。標準的に、この標的DNAは、ゲノムライブラリまたはcDNAライブラリであるが、スクリーニン

50

グは、RNA分子の分析を伴い得る。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーおよびプローブの領域を変化させることによって、異なる程度の相同性が発見され得る。

【0083】

本発明のプローブおよびプライマーを利用する別の方法は、部位特異的 (site-directed) 突然変異誘発または部位特異的 (site-specific) 突然変異誘発にある。部位特異的突然変異誘発は、基礎をなすDNAの特異的突然変異誘発を通じた、個々のペプチドまたは生物学的に機能等価なタンパク質もしくはペプチドの調製に有用な技術である。この技術は、1つ以上のヌクレオチド配列変化をDNAに導入することによって、1つ以上の上述の考慮を含む配列改変体を調製および試験する容易な能力をさらに提供する。部位特異的突然変異誘発は、特定のオリゴヌクレオチド配列の使用を通じた変異体の産生を可能にし、この配列は、所望の変異のDNA配列、ならびに十分な数の近傍ヌクレオチドをコードして、十分なサイズおよび配列複雑性のプライマー配列を提供して、交差されている両側の欠失連結点上に安定な二重鎖を形成する。代表的には、変更されている配列の両側の連結点上に、約5~10残基を有する約17~25ヌクレオチド長のプライマーが好ましい。

10

【0084】

この技術は、代表的には、バクテリオファージベクターを利用し、このベクターは、一本鎖形態および二本鎖形態の両方に存在する。部位特異的突然変異誘発に有用な代表的なベクターは、M13ファージのようなベクターを含む。これらのファージベクターは、市販されており、そしてその使用は、一般的に、当業者に周知である。二本鎖プラスミドはまた、部位特異的突然変異誘発に慣用的に利用され、これは、目的の遺伝子を、ファージからプラスミドに移動する工程を排除する。

20

【0085】

一般に、部位特異的突然変異誘発は、一本鎖ベクターの第一の獲得、または二本鎖ベクターの二本鎖の融解によって行われ、これは、所望のタンパク質をコードするDNA配列をその配列内に含む。所望の変異配列を保有するオリゴヌクレオチドプライマーは、合成によって調製される。次いで、このプライマーは、ハイブリダイゼーション条件を選択する場合のミスマッチの程度を考慮して、一本鎖DNA調製物とアニーリングされ、そして変異保有鎖の合成を完全にするために、DNA重合酵素 (例えば、E. coliポリメラーゼIクレノウフラグメント) に供される。従って、ヘテロ二重鎖が形成され、ここで、1つの鎖が、本来の非変異配列をコードし、そして第二の鎖が、所望の変異を保有する。次いで、このヘテロ二重鎖ベクターが使用されて、適切な細胞 (例えば、E. coli細胞) を形質転換し、そして変異配列の配置を保有する組換えベクターを含むクローンが選択される。

30

【0086】

部位特異的突然変異誘発を用いた選択遺伝子の配列改変体の調製が、潜在的に有用な種を産生する手段として提供され、そして遺伝子の配列改変体が獲得され得る他の方法が存在するので、限定されることは意味されない。例えば、所望の遺伝子をコードする組換えベクターが、突然変異誘発性因子 (例えば、ヒドロキシルアミン) を用いて処理されて、配列改変体を獲得し得る。

40

【0087】

(C. アンチセンス構築物)

アンチセンス方法論は、核酸が、「相補的」配列と対合する傾向にあるという事実を利用する。相補的によって、ポリヌクレオチドが、標準的なワトソン-クリックの相補的規則に従って塩基対合し得るポリヌクレオチドであることが意味される。すなわち、より大きなプリンが、より小さなピリミジンと塩基対合して、シトシンと対合するグアニンの組み合わせ (G:C)、およびDNAの場合においてはチミンと対合するアデニンの組み合わせ (A:T) またはRNAの場合においてはウラシルと対合するアデニンの組み合わせ (A:U) のいずれかを形成する。より一般的でない塩基 (例えば、イノシン、5-メチルシトシン、6-メチルアデニン、ヒポキサンチンおよび他の塩基) のハイブリダイズ配列

50

への包含は、対合を妨げない。

【0088】

ポリヌクレオチドを用いた二本鎖 (ds) DNA の標的化は、三重らせん形成を導く；標的 RNA は、二重らせん形成を導く。標的細胞に導入される場合のアンチセンスポリヌクレオチドは、その標的ポリヌクレオチドに特異的に結合し、そして転写、RNA プロセッシング、輸送、翻訳および/または安定性を妨げる。アンチセンス RNA 構築物、またはこのようなアンチセンス RNA をコードする DNA が利用されて、インビトロまたはインビボのいずれかで、宿主細胞内で（例えば、ヒト被験体を含む宿主動物内で）、遺伝子の転写または翻訳あるいはその両方を阻害し得る。

【0089】

アンチセンス構築物は、プロモーターおよび他の制御領域、エキソン、イントロンまたは遺伝子のエキソン - イントロン境界までにも結合するように設計され得る。大半の有効なアンチセンス構築物が、エキソン/イントロンスプライス部位に相補的な領域を含むことが意図される。従って、好ましい実施形態が、イントロン - エキソンスプライス部位の 50 ~ 200 塩基内の領域に対する相補性を有するアンチセンス構築物を含むことが提唱される。いくつかのエキソン配列が、その標的選択性に重く影響を及ぼさずに、この構築物に含められ得ることが観察されている。含められるエキソン物質の量は、使用される特定のエキソン配列およびイントロン配列に依存して変化する。非常に過剰のエキソン DNA が、インビトロで構築物を試験することによって簡単に含められるか否かを容易に試験して、正常な細胞機能が、影響を及ぼされるか否か、または相補的配列を有する関連遺伝子の発現が、影響を及ぼされるか否かを決定し得る。

【0090】

上記のように、「相補的」または「アンチセンス」は、その全体の長さに渡って実質的に相補性であり、そして極めて少ない塩基ミスマッチを有するポリヌクレオチド配列を意味する。例えば、15 塩基長の配列が、13 ~ 14 の位置で相補的ヌクレオチドを有する場合、相補的と呼ばれ得る。本来、完全に相補的な配列は、その全体の長さを通して完全に相補的であり、そして塩基ミスマッチを有さない配列である。より低い程度の相同性を有する他の配列がまた意図される。例えば、高い相同性の限定される領域を有するが、また非相同領域を含むアンチセンス構築物（例えば、リボザイム；以下を参照のこと）が設計され得る。これらの分子は、50% 未満の相同性を有するが、適切な条件下で、標的配列に結合する。

【0091】

ゲノム DNA の一部分を、cDNA または合成配列に結合して、特定の構築物を作製することが有利であり得る。例えば、イントロンが、最終的な構築物に所望される場合、ゲノムクローンが使用される必要がある。この cDNA または合成ポリヌクレオチドは、構築物の一部分の存続についてより簡便な制限部位を提供し得、従って、配列の残部について使用される。

【0092】

(D. リボザイム)

タンパク質は、伝統的に、核酸の触媒作用について使用されているが、別のクラスの高分子が、この試みにおいて有用であるとして現れた。リボザイムは、RNA - タンパク質複合体であり、これは、部位特異的様式で、核酸を切断する。リボザイムは、特異的な触媒ドメインを有し、これは、エンドヌクレアーゼ活性を有する (Kim および Cook、1987; Gerlach ら、1987; Forster および Symons、1987)。例えば、多数のリボザイムが、高度の特異性で、リン酸エステル転移反応を促進し、頻繁に、オリゴヌクレオチド基質におけるいくつかのリン酸エステルのうちのただ1つを開裂する (Cook ら、1981; Michel および Westhof、1990; Reinhold-Hurek および Shub、1992)。この特異性は、この基質が、特異的塩基対合相互作用を介して、化学反応の前に、リボザイムの内部ガイド配列 (「IGS」) に結合するという要件に起因する。

10

20

30

40

50

## 【0093】

リボザイムの触媒作用は、主に、核酸を伴う配列特異的開裂/連結反応の一部として観察されている (Joyce、1989; Cookら、1981)。例えば、米国特許第5,354,855号は、特定のリボザイムが、既知のリボヌクレアーゼの配列特異性よりも大きく、そしてほぼDNA制限酵素の配列特異性を有するエンドヌクレアーゼとして作用し得ることを報告する。従って、遺伝子発現の配列特異的リボザイム媒介性阻害は、治療適用に特に適し得る (Scanlonら、1991; Sarverら、1990)。最近、リボザイムが、適用されたいくつかの細胞系統において遺伝子変化を誘導したことが報告された; この変更された遺伝子は、癌遺伝子H-ras、c-fosおよびHIVの遺伝子を含んだ。この研究の大半は、特定のリボザイムによって開裂される特定の変異体コドンに基づいた標的mRNAの修飾を含んだ。

10

## 【0094】

(E. クローニング、遺伝子転移および発現についてのベクター)

特定の実施形態内において、発現ベクターが利用されて、カルサルシンポリペプチド産物を発現し、次いでこれは精製され得、そして例えば、動物のワクチン接種に使用されて、抗血清またはモノクローナル抗体を作製し得、これを用いて、さらなる研究が行われ得る。他の実施形態において、この発現ベクターは、遺伝子治療に使用される。発現は、適切なシグナルが、ベクターにおいて提供される必要があり、そしてこれは宿主細胞において目的の遺伝子の発現を駆動するウイルス供給源および哺乳動物供給源の両方由来の種々の調節エレメント (例えば、エンハンサー/プロモーター) を含む。宿主細胞におけるメッセンジャーRNAの安定性および翻訳能を最適化するように設計されるエレメントがまた規定される。この産物を発現する永続的な安定した細胞クローンの確立についての多くの主要な薬物選択マーカーの使用についての条件が、薬物選択マーカーの発現をポリペプチドの発現に結合するエレメントであるようにまた提供される。

20

## 【0095】

((i) 調節エレメント)

本出願を通して、用語「発現構築物」は、遺伝子産物についてコードする核酸を含む遺伝子構築物の任意の型を含むことが意味され、この遺伝子産物において、核酸コード配列の一部またはすべてが、転写され得る。この転写物は、タンパク質に翻訳され得るが、翻訳される必要性はない。特定の実施形態において、発現は、遺伝子の転写およびmRNAの遺伝子産物への翻訳の両方を含む。他の実施形態において、発現は、目的の遺伝子をコードする核酸の転写のみを含む。

30

## 【0096】

特定の実施形態において、遺伝子産物をコードする核酸は、プロモーターの転写制御下にある。「プロモーター」は、細胞の合成機械によって認識されるか、または合成機械を導入されるDNA配列をいい、この合成機械は、遺伝子の特異的転写の開始に必要とされる。句「転写制御下」は、プロモーターが、核酸に関して正確な位置および配向にあって、RNAポリメラーゼの開始および遺伝子の発現を制御することを意味する。

## 【0097】

用語プロモーターは、本明細書中で使用されて、RNAポリメラーゼIIについての開始部位の周囲に密集する転写制御モジュールの群をいう。プロモーターが編成される理由についての見解の多くは、HSVチミジンキナーゼ(tk)およびSV40初期転写単位についてのプロモーターを含むいくつかのウイルスプロモーターの分析に由来する。より最近の研究によって増大したこれらの研究は、プロモーターが、別個の機能モジュールから構成され、各々が、およそ7~20bpのDNAからなり、そして転写アクチベーターまたはリプレッサータンパク質についての1つ以上の認識部位を含むことを示している。

40

## 【0098】

各々のプロモーターにおいて少なくとも1つのモジュールが、RNA合成についての開始部位を配置するように機能する。この最も良く知られた例は、TATAボックスであるが、TATAボックスを欠失するいくつかのプロモーター (例えば、哺乳動物末端デオキシ

50

ヌクレオチジルトランスフェラーゼ遺伝子についてのプロモーターおよびSV40後期遺伝子についてのプロモーター)において、その開始部位自身上に重なる別個のエレメントが、開始の場所の固定を助ける。

#### 【0099】

さらなるプロモーターエレメントが、転写開始の頻度を調節する。代表的には、これらは、開始部位の30~110bp上流の領域に位置するが、多くのプロモーターが、同様に開始部位の下流に機能的エレメントを含むことが最近示されている。プロモーターエレメント間の間隔は、しばしば順応性があり、その結果、プロモーター機能が、エレメントが互いに関して逆転または移動される場合に保持される。tkプロモーターにおいて、プロモーターエレメント間の間隔は、活性が低下し始める前に、50bpまで離れて増大され得る。このプロモーターに依存して、個々のエレメントが、協同的または独立的のいずれかで機能して、転写を活性化し得るようである。

10

#### 【0100】

特定の実施形態において、このネイティブカルサルシンプロモーターが利用されて、対応するカルサルシン核酸、異種カルサルシン核酸、スクリーニング可能もしくは選択可能なマーカー核酸、または目的の任意の他の核酸のいずれかの発現を駆動する。

#### 【0101】

他の実施形態において、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)前初期遺伝子プロモーター、SV40初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルス、長い末端反復配列、ラットインスリンプロモーターおよびグリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼが使用されて、目的のコード配列の高レベルの発現を獲得し得る。発現のレベルが、所定の目的に十分であれば、当該分野で周知であり、目的のコード配列の発現を達成する他のウイルスプロモーターまたは哺乳動物細胞性プロモーターまたは細菌性ファージプロモーターの使用が、同様に意図される。

20

#### 【0102】

周知の性質を有するプロモーターを利用することによって、トランスフェクションまたは形質転換後の目的のタンパク質発現のレベルおよびパターンが最適化され得る。さらに、特定の生理学的シグナルに応答して調節されるプロモーターの選択は、遺伝子産物の誘導可能な発現を可能にし得る。表2および3は、いくつかの調節エレメントを列挙し、これは、本発明の文脈において利用されて、目的の遺伝子の発現を調節し得る。この一覧表は、遺伝子発現の促進に関与するすべての可能なエレメントの包括であることが意図されないが、単にその例示として意図される。

30

#### 【0103】

エンハンサーは、DNAの同じ分子上の異なる位置に位置するプロモーターからの転写を増大する遺伝子エレメントである。エンハンサーは、プロモーターのように編成される。すなわち、エンハンサーは、多くの個々のエレメントから構成され、これらの各々は、1つ以上の転写タンパク質に結合する。

#### 【0104】

エンハンサーとプロモーターとの間の基本的な差異は、操作である。全体としてのエンハンサー領域は、少し離れて転写を刺激し得なければならない；これは、プロモーター領域またはその成分エレメントにも該当する必要はない。一方、プロモーターは、1つ以上のエレメントを有さなければならない、このエレメントは、特定の部位および特定の配向で、RNA合成の開始を指向し、一方、エンハンサーは、これらの特異性を欠如する。プロモーターおよびエンハンサーは、頻繁に重複および連続し、頻繁に、極めて類似のモジュラー編成を有するようである。

40

#### 【0105】

以下は、ウイルスプロモーター、細胞性プロモーター/エンハンサーおよび誘導性プロモーター/エンハンサーの一覧表であり、これは、発現構築物において、目的の遺伝子をコードする核酸と組み合わせて使用され得る(表2および表3)。さらに、任意のプロモーター/エンハンサーの組み合わせ(真核生物プロモーターデータベース、EPDBによっ

50

て示される通り) がまた使用されて、遺伝子の発現を駆動し得る。真核生物細胞は、適切な細菌ポリメラーゼが、送達複合体の一部、またはさらなる遺伝子発現構築物のいずれかとして提供される場合、特定の細菌プロモーターからの細胞質転写を支持し得る。

【 0 1 0 6 】

【 表 2 】

プロモーター／エンハンサー	参考文献
免疫グロブリン重鎖	Banerji <i>et al.</i> , 1983; Gilles <i>et al.</i> , 1983; Grosschedl <i>et al.</i> , 1985; Atchinson <i>et al.</i> , 1986, 1987; Imler <i>et al.</i> , 1987; Weinberger <i>et al.</i> , 1984; Kiledjian <i>et al.</i> , 1988; Porton <i>et al.</i> ; 1990
免疫グロブリン軽鎖	Queen <i>et al.</i> ; 1983; Picard <i>et al.</i> , 1984
T細胞レセプター	Luria <i>et al.</i> , 1987; Winoto <i>et al.</i> , 1989; Redondo <i>et al.</i> ; 1990
HLA DQ $\alpha$ および/またはDQ	Sullivan <i>et al.</i> , 1987
インターフェロン	Goodbourn <i>et al.</i> , 1986; Fujita <i>et al.</i> , 1987; Goodbourn <i>et al.</i> , 1988
インターロイキン-2	Greene <i>et al.</i> , 1989
インターロイキン-2レセプター	Greene <i>et al.</i> , 1989; Lin <i>et al.</i> , 1990
MHCクラスII 5	Koch <i>et al.</i> , 1989
MHCクラスII HLA-DR $\alpha$	Sherman <i>et al.</i> , 1989
アウチン	Kawamoto <i>et al.</i> , 1988; Ng <i>et al.</i> ; 1989
筋クレアチンキナーゼ(MCK)	Jaynes <i>et al.</i> , 1988; Horlick <i>et al.</i> , 1989; Johnson <i>et al.</i> ; 1989
プレアルブミン(トランスチレチン)	Costa <i>et al.</i> , 1988
エラスターゼI	Omitz <i>et al.</i> , 1987
メタロチオネイン(MTII)	Karin <i>et al.</i> , 1987; Culotta <i>et al.</i> , 1989
コラゲナーゼ	Pinkert <i>et al.</i> , 1987; Angel <i>et al.</i> , 1987a
アルブミン	Pinkert <i>et al.</i> , 1987; Tronche <i>et al.</i> , 1989, 1990
フェトトロポニン	Godbout <i>et al.</i> , 1988; Campere <i>et al.</i> , 1989
ヒラゴピン	Bodine <i>et al.</i> , 1987; Perez-Stable <i>et al.</i> , 1990

10

20

ヒラゴピン	Trudel <i>et al.</i> , 1987
c-fos	Cohen <i>et al.</i> , 1987
c-HA-ras	Triesman, 1986; Deschamps <i>et al.</i> , 1985
インスリン	Edlund <i>et al.</i> , 1985
神経細胞接着分子(NCAM)	Hirsh <i>et al.</i> , 1990
T-アンチトリプシン	Latimer <i>et al.</i> , 1990
H2B (TH2B) ヒストン	Hwang <i>et al.</i> , 1990
マウスおよび/またはI型コラーゲン	Ripe <i>et al.</i> , 1989
グルコース調節タンパク質 (GRP94およびGRP78)	Chang <i>et al.</i> , 1989
ラット成長ホルモン	Larsen <i>et al.</i> , 1986
ヒト血清アミロイドA(SAA)	Edbrooke <i>et al.</i> , 1989
トロポニンI(TNI)	Yutzey <i>et al.</i> , 1989
血小板由来増殖因子(PDGF)	Pech <i>et al.</i> , 1989
デュシェーヌ筋ジストロフィ	Klamut <i>et al.</i> , 1990
SV40	Banerji <i>et al.</i> , 1981; Moreau <i>et al.</i> , 1981; Sleight <i>et al.</i> , 1985; Firak <i>et al.</i> , 1986; Herr <i>et al.</i> , 1986; Imbra <i>et al.</i> , 1986; Kadesch <i>et al.</i> , 1986; Wang <i>et al.</i> , 1986; Ondek <i>et al.</i> , 1987; Kuhl <i>et al.</i> , 1987; Schaffner <i>et al.</i> , 1988
ポリオーマ	Swartzendruber <i>et al.</i> , 1975; Vasseur <i>et al.</i> , 1980; Katinka <i>et al.</i> , 1980, 1981; Tyndell <i>et al.</i> , 1981; Dandolo <i>et al.</i> , 1983; de Villiers <i>et al.</i> , 1984; Hen <i>et al.</i> , 1986; Satake <i>et al.</i> , 1988; Campbell and/or Villarreal, 1988
ヒトロウイルス	Kriegler <i>et al.</i> , 1982, 1983; Levinson <i>et al.</i> , 1982; Kriegler <i>et al.</i> , 1983, 1984a, b, 1988; Bosze <i>et al.</i> , 1986; Miksicek <i>et al.</i> , 1986; Celander <i>et al.</i> , 1987; Thiesen <i>et al.</i> , 1988; Celander <i>et al.</i> , 1988; Choi <i>et al.</i> , 1988; Reisman <i>et al.</i> , 1989

30

40

50

パピローマウイルス	Campo <i>et al.</i> , 1983; Lusk <i>et al.</i> , 1983; Spandidos and/or Wilkie, 1983; Spalholz <i>et al.</i> , 1985; Lusk <i>et al.</i> , 1986; Cripe <i>et al.</i> , 1987; Gloss <i>et al.</i> , 1987; Hirochika <i>et al.</i> , 1987; Stephens <i>et al.</i> , 1987; Giue <i>et al.</i> , 1988
B型肝炎ウイルス	Bulla <i>et al.</i> , 1986; Jameel <i>et al.</i> , 1986; Shaul <i>et al.</i> , 1987; Spandau <i>et al.</i> , 1988; Vannice <i>et al.</i> , 1988
ヒト免疫不全症ウイルス	Muesing <i>et al.</i> , 1987; Hauber <i>et al.</i> , 1988; Jakobovits <i>et al.</i> , 1988; Feng <i>et al.</i> , 1988; Takebe <i>et al.</i> , 1988; Rosen <i>et al.</i> , 1988; Berkhout <i>et al.</i> , 1989; Laspia <i>et al.</i> , 1989; Sharp <i>et al.</i> , 1989; Braddock <i>et al.</i> , 1989
サイトメガロウイルス(CMV)	Weber <i>et al.</i> , 1984; Boshart <i>et al.</i> , 1985; Foecking <i>et al.</i> , 1986
テナガザル(gibbon ape)白血病ウイルス	Holbrook <i>et al.</i> , 1987; Quinn <i>et al.</i> , 1989

10

【 0 1 0 7 】

【 表 3 】

エレメント	導入物質	参考文献
MT II	ホルボールエステル(TPA) 重金属	Palmiter <i>et al.</i> , 1982; Haslinger <i>et al.</i> , 1985; Searle <i>et al.</i> , 1985; Stuart <i>et al.</i> , 1985; Imagawa <i>et al.</i> , 1987; Karin <i>et al.</i> , 1987; Angel <i>et al.</i> , 1987b; McNeall <i>et al.</i> , 1989
MMTV(マウス乳房主要ウイルス)	グルココルチコイド	Huang <i>et al.</i> , 1981; Lee <i>et al.</i> , 1981; Majors <i>et al.</i> , 1983; Chandler <i>et al.</i> , 1983; Lee <i>et al.</i> , 1984; Ponta <i>et al.</i> , 1985; Sakai <i>et al.</i> , 1988
インターフェロン	ポリ(rI) x ポリ(rc)	Tavernier <i>et al.</i> , 1983
アデノウイルス5 E2	E1A	Imperiale <i>et al.</i> , 1984
コラゲナーゼ	ホルボールエステル(TPA)	Angel <i>et al.</i> , 1987a
ストロメライシン	ホルボールエステル(TPA)	Angel <i>et al.</i> , 1987b

20

SV40	ホルボールエステル(TPA)	Angel <i>et al.</i> , 1987b
マウスMX遺伝子	インターフェロン、ニューカッスル病ウイルス	Hug <i>et al.</i> , 1988
GRP78遺伝子	A23187	Resendez <i>et al.</i> , 1988
2-マクログロブリン	IL-6	Kunz <i>et al.</i> , 1989
ピメンチン	血清	Ritting <i>et al.</i> , 1989
MHCクラスII遺伝子H-2b	インターフェロン	Blonar <i>et al.</i> , 1989
HSP70	E1A, SV40ラージT抗原	Taylor <i>et al.</i> , 1989, 1990a, 1990b
プロリフェリン	ホルボールエステル-TPA	Mordacq <i>et al.</i> , 1989
腫瘍壊死因子	PMA	Hensel <i>et al.</i> , 1989
甲状腺刺激ホルモン遺伝子	甲状腺ホルモン	Chatterjee <i>et al.</i> , 1989

30

特に興味深いのは、筋特異的プロモーターであり、そしてより特に、心筋特異的プロモーターである。これらとしては、ミオシン軽鎖 - 2 プロモーター (Franzら、1994 ; Kellyら、1995)、アクチンプロモーター (Mossら、1996)、トロポニン1プロモーター (Bhavsarら、1996)、 $Na^+ / Ca^{2+}$  交換輸送体プロモーター (Barnesら、1997)、ジストロフィンプロモーター (Kimuraら、1997)、クレアチンキナーゼプロモーター (Ritchie、1996)、7インテグリンプロモーター (ZioberおよびKramer、1996)、大脳ナトリウム利尿ペプチドプロモーター (LaPointeら、1996) および B-クリスタリン / 低分子量熱ショックタンパク質プロモーター (Gopal-Srivastavaら、1995) が挙げられる。

40

【 0 1 0 8 】

cDNA挿入物が利用される場合、代表的には、ポリアデニル化シグナルを含むことが所

50

望されて、遺伝子転写物の適切なポリアデニル化を達成する。このポリアデニル化シグナルの性質は、本発明の首尾良い実行に決定的であるとは考えられず、そして任意のこのような配列（例えば、ヒト成長ホルモンおよびSV40ポリアデニル化シグナル）が利用され得る。また、発現カセットのエレメントとして意図されるのは、ターミネーターである。これらのエレメントが、メッセージレベルの増強、および他の配列へのカセットからの通読の最小化に役立ち得る。

【0109】

((ii) 選択マーカー)

本発明の特定の実施形態においては、細胞は、本発明の核酸構築物を含み、細胞は、発現構築物中にマーカーを含むことによって、インビトロまたはインビボで同定され得る。このようなマーカーは、発現構築物を含有している細胞の容易な同定を可能にする同定可能な変化を細胞に対して付与する。通常は、薬剤選択マーカーの包含が、クローニングおよび形質転換体の選択を補助する。例えば、ネオマイシン、プロマイシン、ハイグロマイシン、DHFR、GPT、ゼオシン、およびヒスチジノールに対する耐性を付与する遺伝子が、有用な選択マーカーである。あるいは、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(tk)、またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)のような酵素が使用され得る。免疫学的マーカーもまた、使用され得る。使用される選択マーカーは、それが遺伝子産物をコードする核酸と同時に発現され得る限りは、重要であるとは考えられない。選択マーカーのさらなる例は、当業者に周知である。

10

【0110】

((iii) 多遺伝子構築物およびIRES)

本発明の特定の実施形態においては、内部リボソーム結合部位(IRES)エレメントの使用が、多遺伝子または多シストロン性メッセージを作製するために使用される。IRESエレメントは、5'がメチル化されたCap依存性の翻訳のリボソームスキャンモデルをバイパスすることが可能であり、そして内部部位で翻訳を開始する(PelletierおよびSonenberg, 1988)。ピカノウイルスファミリーの2つのメンバー(ポリオおよび脳心筋炎)に由来するIRESエレメント(PelletierおよびSonenberg, 1988)、ならびに哺乳動物のメッセージ(MacejakおよびSarnow, 1991)に由来するIRESが記載されている。IRESエレメントは、異種オープンリーディングフレームに連結され得る。複数のオープンリーディングフレームがともに転写され、IRESによって互いに分離され、それによって多シストロン性のメッセージを作製する。IRESエレメントのおかげで、それぞれのオープンリーディングフレームが十分な翻訳のためにリボソームに接近することが可能である。複数の遺伝子が、単一のメッセージを転写するための単一のプロモーター/エンハンサーを使用して効率良く発現され得る。

20

30

【0111】

任意の異種オープンリーディングフレームがIRESエレメントに連結され得る。これは、分泌されたタンパク質、別々の遺伝子によってコードされる多サブユニットのタンパク質、細胞内タンパク質または膜結合タンパク質、および選択マーカーについての遺伝子を含む。この方法で、いくつかのタンパク質の発現が、単一の構築物および単一の選択マーカーを用いて細胞中に同時に操作され得る。

40

【0112】

((iv) 2方向性プロモーター)

本発明の他の実施形態においては、2方向性プロモーターが、多種のメッセージを作製するために利用される。例えば、アルデヒドレダクターゼの2方向性プロモーター(Barskiら, 1999)は、化学量論レベルにまで反対方向の転写物を作製することが可能である。従って、当業者は、2つの種のメッセージを同時に作製するために2方向性のアルデヒドレダクターゼプロモーターのようなプロモーターを利用することができ、一方では、発現ベクター中に存在するかまたはその中にクローン化されることを必要とする空間を付随して保存する。2方向性プロモーターによって作製された遺伝子産物はRNAまた

50

はタンパク質であり得、そして2方向性プロモーターは目的の任意の配列に加えて、レポーター遺伝子のメッセージ、およびカルサルシンメッセージ、カルシニューリンメッセージ、または - アクチニンメッセージを転写することができる。

【0113】

( (v) レポーター配列 )

用語「レポーター配列」は、本明細書中で使用される場合には、発現が検出され得るヌクレオチド配列として定義される。発現された産物自体（例えば、RNAまたはタンパク質）が検出され得るか、あるいは、レポーター産物によって2次的な影響を受ける代謝産物またはそれに特徴的である他のものが、検出され得る。当業者は、経皮性のモニタリングによって、UV光での視覚化によって、赤外線での視覚化によって、または他の画像化技術（例えば、X線またはMRI）での視覚化によって検出され得る任意のレポーター遺伝子が明らかに有用であることを認識する。任意の組織または体液または細胞培養物または無細胞抽出物が、使用されるマーカーに依存して採取される。例えば、蛍光、比色アッセイ、分泌されたタンパク質、組織学的マーカー、トランスジェニック動物における視覚的な変化、および当業者によって使用される他のマーカーが、特異的な核酸の発現を反映するために利用され得る。レポーター配列の例には、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT)、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、増強型 GFP、青色蛍光タンパク質、 - ガラクトシダーゼ、 - グルクロニダーゼ、およびルシフェラーゼが含まれる。特異的な実施形態においては、エピトープタグを含有しているレポーター遺伝子がモニターされる。

10

20

【0114】

( (vi) 発現ベクターの送達 )

本発明によって意図される治療的な実施形態の1つは、心不全に関係している事象への分子レベルでの介入である。詳細には、本発明者らは、心臓細胞に対して、その細胞にカルサルシンを提供することができる発現構築物を提供することを意図する。発現ベクターおよびその中で使用される遺伝子エレメントの長い考察は、参照によってこの節で引用される。特に好ましい発現ベクターは、ウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、およびレトロウイルス）である。リボソームでカプセル化された発現ベクターもまた好ましい。

【0115】

当業者は、インビボの状況に遺伝子を送達するための方法を十分に認識している。ウイルスベクターについては、一般的には、ウイルスベクターのストックを調製する。ウイルスの種類および到達可能な力価に依存して、 $1 \times 10^4$ 、 $1 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 、または $1 \times 10^{12}$ 個の感染性粒子を患者に与える。同様の計算が、相対的な取り込み効率を比較することによって、リボソームまたは他の非ウイルス性処方物について推定され得る。薬学的に受容可能な組成物としての処方物が、以下で議論される。種々の経路が意図されるが、心臓への局所的な供給および全身的な供給（動脈内または静脈内）が好ましい。

30

【0116】

発現ベクターが細胞内に導入され得る方法は多数存在する。本発明の特定の実施形態においては、発現構築物は、ウイルス、またはウイルスゲノムから誘導された操作された構築物を含む。レセプターによって媒介されるエンドサイトーシスによって細胞に入り込む、宿主細胞のゲノム中に組み込まれてウイルス遺伝子を安定かつ効率的に発現する、特定のウイルスの能力は、それらを哺乳動物細胞中への外来遺伝子の導入のための魅力的な候補にする (Ridgeway, 1988; Nicolas および Rubenstein, 1988; Baichwal および Sugden, 1986; Temin, 1986)。遺伝子ベクターとして使用された最初のウイルスは、パポウイルス (シミアンウイルス40、ウシ乳頭腫ウイルス、およびポリオーマ) (Ridgeway, 1988; Baichwal および Sugden, 1986) ならびにアデノウイルス (Ridgeway, 1988; Baichwal および Sugden, 1986) を含むDNAウイルスであ

40

50

った。これらは、外来DNA配列について比較的低い能力を有し、そして限定された宿主種を有する。さらに、許容細胞中でのそれらの腫瘍形成遺伝子の能力および細胞変性作用は、安全性の問題を生じる。これらは、わずか8kBまでの外因性遺伝子材料にしか適応することができないが、種々の細胞株および実験動物中に容易に導入され得る(NicolasおよびRubenstein, 1988; Temin, 1986)。

#### 【0117】

インピボでの送達のための1つの好ましい方法は、アデノウイルス発現ベクターの使用を含む。「アデノウイルス発現ベクター」は、(a)構築物のパッケージングをサポートするため、および(b)その中にクローン化されているアンチセンスポリヌクレオチドを発現するために十分なアデノウイルス配列を含有しているそのような構築物を含むように意味される。この状況では、発現には遺伝子産物が合成されることは必要ではない。

10

#### 【0118】

発現ベクターは、アデノウイルスの遺伝的に操作された形態を含む。アデノウイルスの遺伝子構造についての知見(36kB、直鎖状、二本鎖のDNAウイルス)から、7kBまでの外来配列でのアデノウイルスDNAの大きな断片の置換が可能である(GrunhausおよびHorwitz, 1992)。レトロウイルスとは対照的に、宿主細胞のアデノウイルス感染は染色体の組込みを生じない。なぜなら、アデノウイルスDNAは強力な遺伝子毒性の可能性を伴わずにエピソーム様式で複製することができるからである。また、アデノウイルスは構造的に安定であり、そして多量の増幅後のゲノムの再配置は検出されていない。アデノウイルスは、それらの細胞周期の段階にかかわらず実質的に全ての上皮細胞に感染することができる。これまでのところ、アデノウイルス感染は、ヒトの急性呼吸器疾患のような穏やかな疾患とのみ関連しているようである。

20

#### 【0119】

アデノウイルスは、その中程度の大きさのゲノム、操作の容易さ、高力価、広い標的細胞の範囲、および高い感染性に起因して、遺伝子導入ベクターとしての使用に特に適切である。ウイルスのゲノムの両方の末端は、100~200塩基対の逆反復(ITR)を含む。これは、ウイルスDNAの複製およびパッケージングに不可欠なcisエレメントである。ゲノムの初期(E)および後期(L)領域は、ウイルスDNAの複製の開始によって分類される異なる転写ユニットを含む。E1領域(E1AおよびE1B)は、ウイルスゲノムおよび数個の細胞性遺伝子の転写調節にตอบสนองするタンパク質をコードする。E2領域(E2AおよびE2B)の発現は、ウイルスのDNA複製のためのタンパク質の合成を生じる。これらのタンパク質は、DNA複製、後期遺伝子の発現、および宿主細胞の停止に関係している(Renan, 1990)。後期遺伝子の産物(ウイルスカプシドタンパク質の大部分を含む)は、主要な後期プロモーター(MLP)によって与えられる単一の主要な転写物の重要なプロセッシング後のみ発現される。MLP(16.8m.u.に存在する)は、感染の後期の間に特に有効であり、そしてこのプロモーターから与えられる全てのmRNAは、それらを翻訳に好ましいmRNAにする5'-3'者間リーダー(TPL)配列を有する。

30

#### 【0120】

現在のシステムでは、組換えアデノウイルスはシャトルベクターとプロウイルスベクターとの間での相同組換えによって作製される。2つのプロウイルスベクター間での組換えの可能性に起因して、野生型アデノウイルスがこのプロセスによって作製され得る。従って、個々のプラークからウイルスの単一のクローンを単離し、そしてそのゲノム構造を試験することが重要である。

40

#### 【0121】

複製欠損である現在のアデノウイルスベクターの作製および増殖は、293と呼ばれる特有のヘルパー細胞株に依存する。これは、Ad5 DNAフラグメントによるヒトの胚性腎臓細胞から形質転換され、そしてE1タンパク質を構成的に発現する(Grahamら、1977)。E3領域はアデノウイルスゲノムには必ずしも必要ではない(JonesおよびShenk, 1978)ので、現在のアデノウイルスベクターは、293細胞の助

50

けを用いて、E1、D3のいずれか、または両方の領域中に外来DNAを保有する(GrahamおよびPrevac、1991)。天然の状態では、アデノウイルスは、約2 kbの余分なDNAの能力と仮定すれば、野生型ゲノムの約105%をパッケージすることができる(Ghosh-Choudhuryら、1987)。E1およびE3領域中に再配置することが可能な約5.5 kbのDNAと組合せると、現在のアデノウイルスベクターの最大能力は、7.5 kb以下、またはベクターの全長の約15%である。アデノウイルスのウイルスゲノムの80%より多くがベクター骨格中に残っており、そしてこれはベクターが保有する細胞毒性の供与源である。また、E1欠失ウイルスの複製欠損は不完全である。例えば、ウイルス遺伝子の発現の漏出が、高い感染多重度(MOI)で現在利用可能なベクターを用いた場合に観察されている(Mulligan、1993)。

10

#### 【0122】

ヘルパー細胞株は、ヒトの胚性腎臓細胞、筋肉細胞、造血細胞、または他のヒトの胚性間葉細胞もしくは上皮細胞のようなヒト細胞から誘導され得る。あるいは、ヘルパー細胞は、ヒトのアデノウイルスに許容性である他の哺乳動物種の細胞から誘導され得る。このような細胞には、例えば、Vero細胞、または他のサル胚性間葉細胞もしくは上皮細胞が含まれる。上記のように、好ましいヘルパー細胞株は293である。

#### 【0123】

Racherら(1995)は、293細胞を培養するため、およびアデノウイルスを増殖させるための改良方法を開示した。1つの形式では、天然の細胞凝集物を、100~200 mlの培地を含有している1リットルのシリコナイズされたスピナーフラスコ(Technique, Cambridge, UK)中に個々の細胞を接種することによって増殖させる。40 rpmでの攪拌後、細胞の生存性がトリパンブルーを用いて概算される。別の形式では、Fibra-Cellマイクロキャリア(Bibby Sterlin, Stone, UK)(5 g/l)が以下のように使用される。細胞接種物(5 mlの培地中に再懸濁される)が250 mlの三角フラスコ中のキャリア(50 ml)に添加され、そして必要に応じて攪拌しながら、1~4時間固定して静置される。次いで培地が、50 mlの新しい培地と交換され、そして振盪が開始される。ウイルスの産生のためには、細胞は約80%のコンフルエンスにまで増殖させられ、その後培地が交換され(25%の最終容量まで)、そしてアデノウイルスが0.05のMOIで添加される。培養物は一晩固定して静置させられ、その後、容量が100%にまで増大させられ、そして振盪がさらに72時間開始される。

20

30

#### 【0124】

アデノウイルスベクターが複製欠損であるかまたは少なくとも条件的に欠損であるという要件以外に、本発明の良好な実施のために重要であると考えられるアデノウイルスベクターの性質はない。アデノウイルスは、42個の異なる公知の血清型または亜群A~Fのいずれかであり得る。亜群Cの5型アデノウイルスは、本発明での使用のための条件的複製欠損アデノウイルスベクターを得るための好ましい出発材料である。これは、5型アデノウイルスが、生化学的および遺伝的情報の詳細の多くが公知であるヒトアデノウイルスであり、そしてこれがベクターとしてアデノウイルスを使用するほとんどの構築物に歴史的に使用されていることに起因する。

40

#### 【0125】

上記のように、本発明の典型的なベクターは複製欠損であり、そしてアデノウイルスE1領域は有さない。従って、これは、E1をコードする配列が除去されている位置に目的の遺伝子をコードするポリヌクレオチドを導入するために最も便利である。しかし、アデノウイルス配列中の構築物の挿入の部位は、本発明には重要ではない。目的の遺伝子をコードするポリヌクレオチドはまた、Karlssoonら(1986)によって記載されているようなE3再配置ベクター中の欠失させられたE3領域の代わりに、またはE4領域(ここでは、ヘルパー細胞株またはヘルパーウイルスがE4欠損を相補する)中に挿入される場合がある。

#### 【0126】

50

アデノウイルスは増殖させることおよび操作することが容易であり、そして広いインビトロおよびインビボの宿主範囲を示す。この群のウイルスは、高力価（例えば、 $10^9 \sim 10^{12}$  のプラーク形成単位/ml）で得ることが可能であり、そしてこれらは感染性が高い。アデノウイルスの生存サイクルは、宿主細胞のゲノム中への組込みには必要ない。アデノウイルスベクターによって送達される外来遺伝子はエピソームであり、従って宿主細胞に対して低い遺伝子毒性を有する。野生型のアデノウイルスを用いたワクチン接種の研究においては副作用は報告されておらず（Couchら、1963；Topら、1971）、これは、それらの安全性およびインビボでの遺伝子導入ベクターとしての治療上の潜在能力を示している。

#### 【0127】

アデノウイルスベクターは、真核生物での遺伝子発現に（Levreroら、1991；Gomez-Foixら、1992）、およびワクチンの開発に（GrunhausおよびHorwitz、1992；GrahamおよびPrevec、1991）使用されている。最近、動物実験によって、組換えアデノウイルスを遺伝子治療に使用することができることが示唆された（Straford-PerricaudetおよびPerricaudet、1991；Straford-Perricaudetら、1990；Richら、1993）。種々の組織に対して組換えアデノウイルスを投与する実験には、気管への点滴投与（Rosenfeldら、1991；Rosenfeldら、1992）、筋肉注射（Ragotら、1993）、末梢静脈内注射（HerzおよびGerard、1993）、および脳への定位的接種が含まれる（LeGalLaSalleら、1993）。

#### 【0128】

レトロウイルスは、1本鎖のRNAウイルスの群であり、逆転写のプロセスにより感染した細胞中でそれらのRNAを二本鎖のDNAに転換する能力によって特徴付けられる（Coffin、1990）。次いで、得られたDNAは、プロウイルスとして細胞の染色体中に安定に組み込まれ、そしてウイルスタンパク質の合成を指示する。組込みは、レシピエント細胞およびその子孫中でのウイルスの遺伝子配列の保持を生じる。レトロウイルスのゲノムは3個の遺伝子（gag、pol、およびenv）を含み、これらはキャプシドタンパク質、ポリメラーゼ酵素、およびエンベロープ成分をそれぞれコードする。gag遺伝子上流に見られる配列は、ビリオン中へのゲノムのパッケージングのためのシグナルを含む。2つの長末端反復（LTR）配列がウイルスゲノムの5'および3'末端に存在する。これらは強力なプロモーター配列およびエンハンサー配列を含み、そして、宿主細胞のゲノムへの組込みにもまた必要である（Coffin、1990）。

#### 【0129】

レトロウイルスベクターを構築するためには、目的の遺伝子をコードする核酸が、複製欠損であるウイルスを産生するための特定のウイルス配列の代わりにウイルスゲノム中に挿入される。ビリオンの産生のためには、gag、pol、およびenv遺伝子を含むが、LTRおよびパッケージング成分を有さないパッケージング細胞株が構築される（Mannら、1983）。レトロウイルスLTRおよびパッケージング配列とともにcDNAを含有している組換えプラスミドがこの細胞株中に（例えば、リン酸カルシウム沈澱法によって）導入される場合には、パッケージング配列は、ウイルス粒子中にパッケージされる組換えプラスミドのRNAの転写を可能にし、次いでこれは、培養培地中に分泌される（NicolasおよびRubenstein、1988；Temin、1986；Mannら、1983）。次いで、組換えレトロウイルスを含有している培地が回収され、必要に応じて濃縮され、そして遺伝子導入に使用される。レトロウイルスベクターは、広範囲の種々の細胞型に感染することができる。しかし、組込みおよび安定な発現には、宿主細胞の分裂が必要である（Paskindら、1975）。

#### 【0130】

レトロウイルスベクターの特異的な標的化を可能にするように設計された新規のアプローチが、ウイルスのエンベロープへのラクトース残基の化学的な付加によるレトロウイルス

10

20

30

40

50

の化学的改変に基づいて、最近開発された。この改変による、シアロ糖タンパク質レセプターを介する肝細胞の特異的な感染が可能となり得る。

【0131】

レトロウイルスエンベロープタンパク質に対するピオチニル化抗体および特異的細胞レセプターに対するピオチニル化抗体を使用する、組換えレトロウイルスの標的化のための種々のアプローチが設計された。抗体は、ストレプトアビジンの使用によってピオチン成分を介してカップリングされた(Rouxら、1989)。主要組織適合性複合体クラスIおよびクラスII抗原に対する抗体を使用して、彼らは、それらの表面抗原を生じる種々のヒト細胞の、インビトロでのエコトロピックウイルスでの感染を実証した(Rouxら、1989)。

10

【0132】

本発明の全ての局面において、レトロウイルスベクターの使用についての特定の制限が存在する。例えば、レトロウイルスベクターは通常は、細胞ゲノム中のランダムな位置に組み込まれる。これは、宿主遺伝子の離断(interruption)により、または隣接している遺伝子の機能を妨害することができるウイルス調節配列の挿入により、挿入変異誘発を導くことができる(Varmusら、1981)。欠損型レトロウイルスベクターの使用に付随する別の問題点は、パッケージング細胞中の野生型の複製能力のあるウイルスの出現の可能性である。これは、gag、pol、env配列の上流の組換えウイルス挿入物によるインタクたな配列が宿主細胞のゲノム中に組み込まれる組換え事象によって生じ得る場合がある。しかし、新しいパッケージング細胞が現在利用可能であり、これは、組換えの可能性を大きく減少させるはずである(Markowitzら、1988; Hersdorfferら、1990)。

20

【0133】

他のウイルスベクターが、本発明の発現構築物として使用され得る。ワクシニアウイルス(Ridgeway、1988; BaichwalおよびSugden、1986; Couparら、1988)、アデノ随伴ウイルス(AAV)(Ridgeway、1988; BaichwalおよびSugden、1986; HermonatおよびMuzyska、1984)、およびヘルペスウイルスのようなウイルス由来のベクターが使用されることがある。これらは、種々の哺乳動物細胞にいくつかの魅力的な特徴を付与する(Friedmann、1989; Ridgeway、1988; BaichwalおよびSugden、1986; Couparら、1988; Horwichら、1990)。

30

【0134】

欠損型B型肝炎ウイルスについての最近の認識を用いて、種々のウイルス配列の構造-機能の関係についての新しい知見が得られた。インビトロでの研究は、ウイルスがそのゲノムの80%までの欠失にもかかわらず、ヘルパー依存性のパッケージングおよび逆転写の能力を保持することができたことを示した(Horwichら、1990)。このことは、ゲノムの大部分を外来の遺伝子材料と置きかえることが可能であることを示唆した。肝臓向性および持久性(組込み)は、肝臓を指向する遺伝子導入のために特に魅力的な特性であった。Changらは最近、ポリメラーゼ、表面、および前表面コード配列の代わりに、アヒルのB型肝炎ウイルスのゲノム中にクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子を導入した。これを、鳥類肝ガン細胞株中に野生型ウイルスとともに同時トランスフェクトした。高力価の組換えウイルスを含有している培養培地を、アヒルの子の初代肝細胞を感染させるために使用した。安定なCAT遺伝子の発現が、トランスフェクションの少なくとも24日後に検出された(Changら、1991)。

40

【0135】

センスまたはアンチセンス遺伝子構築物の発現を達成するためには、発現構築物は細胞中に送達されなければならない。この送達は、細胞株の形質転換のための研究室用手順の場合にはインビトロで、または特定の疾患状態の処置の場合にはインビボもしくはエキソビボで達成され得る。送達のための1つの機構はウイルス感染により、ここでは、発現構築物が感染性ウイルス粒子中にキャプシド化される。

50

## 【0136】

培養された哺乳動物細胞中への発現構築物の導入のためのいくつかの非ウイルス性の方法もまた、本発明によって意図される。これらには、リン酸カルシウム沈澱法 (Graham および Van Der Eb, 1973; Chen および Okayama, 1987; Rippe ら, 1990)、DEAE-デキストラン (Gopal, 1985)、エレクトロポレーション (Tur-Kaspar, 1986; Potter ら, 1984)、直接的なマイクロインジェクション (Harland および Weintraub, 1985)、DNA 充填リポソーム (Nicolaou および Sene, 1982; Fraley ら, 1979)、およびリポフェクタミン-DNA 複合体、細胞の超音波処理 (Fechheimer ら, 1987)、高速マイクロプロジェクティルを使用する遺伝子衝突 (Yang ら, 1990)。およびレセプター媒介性トランスフェクション (Wu および Wu, 1987; Wu および Wu, 1988) が含まれる。これらの技術のいくつかは、インビボまたはエキソビボでの使用に良好に適應させられ得る。

## 【0137】

一旦、発現構築物が細胞中に送達されると、目的の遺伝子をコードする核酸が種々の部位に配置されそして発現され得る。特定の実施形態においては、遺伝子をコードする核酸は細胞のゲノム中に安定に組み込まれ得る。この組み込みは、相同組換えによって同族 (cognate) の位置および方向 (遺伝子置換) であり得るか、またはこれはランダムな非特異的な位置で組み込まれ得る (遺伝子の増加)。なおさらなる実施形態においては、核酸は DNA の別のエピソームセグメントとして細胞中で安定に維持され得る。このような核酸のセグメントまたは「エピソーム」は、宿主の細胞周期に独立するかまたはそれと同調している、維持および複製を可能にするために十分な配列をコードする。発現構築物が細胞に送達され、そしてその細胞中に核酸が留まる場所は、使用される発現構築物の型に依存する。

## 【0138】

本発明のなお別の実施形態においては、発現構築物は、単純に裸の組換え DNA またはプラスミドから構成され得る。構築物の導入は、細胞膜を物理的または化学的に透過させる上記の方法のいずれかによって行われ得る。これは、インビトロでの導入に特に適用可能であるが、インビボでも使用にも十分に適應させることができる。Dubensky ら (1984) は、ポリオーマウイルス DNA を、成体および新生児のマウスの肝臓、脾臓中に、リン酸カルシウム沈澱物の形態で良好に注射し、これによって、活性なウイルスの複製および急性の感染を実証した。Benvenisty および Neshif (1986) もまた、リン酸カルシウムで沈澱させたプラスミドの直接的な腹腔内注射がトランスフェクトされた遺伝子の発現を生じることを実証した。目的の遺伝子をコードする DNA がまた、インビボで同様の様式で導入され得、そして遺伝子産物を発現することが予想される。

## 【0139】

裸の DNA 発現構築物を細胞中に導入するための本発明のなお別の実施形態には、粒子衝突が含まれることがある。この方法は、DNA をコーティングしたマイクロプロジェクティルを、それらが細胞膜を貫き、そして細胞を死滅させることなく細胞内に侵入することを可能にする高速に加速する能力による (Klein ら, 1987)。小さい粒子を加速するためのいくつかのデバイスが開発されている。1つのこのようなデバイスは、電流を生じる高電圧の放電により、次いでこれは、動力を提供する (Yang ら, 1990)。使用されるマイクロプロジェクティルは、タングステンまたは金ビーズのような生物学的に不活性な物質から構成されている。

## 【0140】

ラットおよびマウスの肝臓、皮膚、および筋肉組織を含む選択された器官が、インビボで衝突させられている (Yang ら, 1990; Zelenin ら, 1991)。これは、銃と標的器官との間に存在するあらゆる組織を排除するために、組織または細胞の外科的な露出 (すなわち、エキソビボでの処置) を必要とする場合がある。再び、特定の遺伝子

をコードするDNAがこの方法によって送達され得、そしてさらに本発明によって取り込まれ得る。

【0141】

本発明のさらなる実施形態においては、発現構築物は、リポソーム中に捕捉され得る。リポソームは、リン脂質二重膜および内部の水性の媒体によって特徴付けられる小胞性構造である。多層のリポソームは、水性の媒体によって分離されている複数の脂質層を有する。これらは、リン脂質が過剰の水溶液中に懸濁された場合に自発的に形成する。脂質成分は閉じた構造の形成の前に自己再配置を受け、そして水を捕捉し、そして脂質二重層の間に溶質を溶解させる (G h o s h および B a c h h a w a t、1991)。リポフェクタミン-DNA複合体もまた意図される。

10

【0142】

インビトロでのリポソームによって媒介される核酸の送達および外来DNAの発現は、非常に好結果を有している。W o n g ら (1980) は、培養されたニワトリの胚、H e L a、および肝ガン細胞中でのリポソームによって媒介される送達および外来DNAの発現の実現可能性を示した。N i c o l a u ら (1987) は、静脈内注射後のラットにおいて、リポソームによって媒介される遺伝子導入の成功を達成した。

【0143】

本発明の特定の実施形態においては、リポソームは、血球凝集ウイルス (H V J) と複合体を形成し得る。これは、細胞膜との融合を促進すること、およびリポソームにカプセル化されたDNAの細胞への侵入を促進することを示している (K a n e d a ら、1989)。他の実施形態においては、リポソームは、核のヒストンではない染色体タンパク質 (H M G - 1) と複合体化され得るかまたはそれと組合せて使用され得る (K a t o ら、1991)。なおさらなる実施形態においては、リポソームは、H V J および H M G - 1 の両方と複合体化され得るかまたはそれと組み合わせ使用され得る。このような発現構築物が、インビトロおよびインビボでの核酸の導入および発現において良好に使用されている点で、これらは、本発明に適応可能である。細菌性プロモーターがDNA構築物中で使用される場合には、適切な細菌性ポリメラーゼをリポソーム中に含むこともまた所望される。

20

【0144】

細胞中へ特定の遺伝子をコードする核酸を送達するために使用され得る他の発現構築物は、レセプターによって媒介される送達ビヒクルである。これらは、ほぼ全ての真核生物細胞中でのレセプターによって媒介されるエンドサイトーシスによる高分子の選択的な取り込みを利用する。種々のレセプターの細胞型特異的分布に起因して、送達は高度に特異的であり得る (W u および W u、1993)。

30

【0145】

レセプターによって媒介される遺伝子標的化ビヒクルは、一般的には2つの構成要素から構成される：細胞レセプター特異的リガンドおよびDNA結合因子。いくつかのリガンドは、レセプターによって媒介される遺伝子の導入のために使用されている。最も広く特徴付けられたリガンドは、アシアロオロソムコイド (A S O R) (W u および W u、1987) およびトランスフェリン (W a g n e r ら、1990) である。最近、合成のネオ糖タンパク質 (n e o g l y c o p r o t e i n) (これは、A S O R と同じレセプターを認識する) が、遺伝子送達ビヒクルとして使用されており (F e r k o l ら、1993; P e r a l e s ら、1994)、そして上皮成長因子 (E G F) もまた、扁平上皮細胞ガン細胞に遺伝子を送達するために使用されている (M y e r s, E P O 第 0 2 7 3 0 8 5 号)。

40

【0146】

他の実施形態においては、送達ビヒクルは、リガンドおよびリポソームを含むことがある。例えば、N i c o l a u ら (1987) は、リポソーム中に取り込まれたラクトシルセラミド、ガラクトース末端アシアロガングリオシドを使用し、そして肝細胞によるインシュリン遺伝子の取り込みの増大を観察した。従って、特定の遺伝子をコードする核酸も

50

また、リポソームとともにまたはリポソームを伴わずに、任意の数のレセプター-リガンド系によって1つの細胞型に対して特異的に送達することができることが、実行可能である。例えば、上皮成長因子(EGF)は、EGFレセプターのアップレギュレーションを示す細胞中への核酸の媒介された送達のためのレセプターとして使用され得る。マンノースは、肝細胞上のマンノースレセプターを標的化するために使用され得る。CD5(CLL)、CD22(リンパ腫)、CD25(T細胞白血病)、およびMAA(黒色腫)に対する抗体もまた、標的化部分として同様に使用され得る。

#### 【0147】

特定の実施形態においては、遺伝子導入は、エキソピボの条件下でより容易に行われ得る。エキソピボでの遺伝子治療は、動物からの細胞の単離、インビトロでのその細胞中への核酸の送達、およびそれに次ぐ、動物に改変した細胞を戻すことをいう。これは、動物からの組織/器官の、または細胞および組織の初代培養物の外科手術による採取を含む場合がある。

10

#### 【0148】

(F. 核酸の検出)

使用される核酸は、標準的な方法論に従うと、生物学的サンプル中に含まれる細胞から単離される(Sambrookら、1989)。核酸は、ゲノムDNAであり得るか、または分画されたRNAもしくは全細胞RNAであり得る。RNAが使用される場合は、RNAを相補性DNAに転換することが所望されることがある。1つの実施形態においては、RNAは、全細胞RNAであり；別の実施形態においては、ポリ-A RNAである。通常は、核酸は増幅させられる。

20

#### 【0149】

形式に依存して、目的の特定の核酸が、増幅を使用して直接、または増幅後に第2の既知の核酸を用いて、サンプル中で同定される。次に、同定された産物が検出される。特定の適用においては、検出は、視覚的な手段(例えば、ゲルのエチジウムブロマイド染色)によって行われる場合がある。あるいは、検出は、放射標識もしくは蛍光標識の化学発光、放射活性シンチグラフィ、またはさらに、電気的もしくは熱性のインパルスシグナルを使用するシステムによる間接的な生成物の同定を含む場合がある(Affymax Technology; Bellus, 1994)。

#### 【0150】

(i) プライマーおよびプローブ

用語プライマーは、本明細書中で定義される場合には、鋳型依存性のプロセスにおいて発生しようとしている核酸の合成を感作する(prime)ことができる任意の核酸を含むように意味される。典型的には、プライマーは、10~20塩基対の長さまでのオリゴヌクレオチドであるが、より長い配列を使用することができる。プライマーは、2本鎖または1本鎖の形態で提供され得るが、1本鎖の形態が好ましい。プローブは、別に定義されるが、これらはプライマーとして作用する場合がある。プローブは、おそらく感作することが可能であるが、標的DNAまたはRNAに結合するように設計され、そして必ずしも増幅プロセスにおいて使用される必要はない。

30

#### 【0151】

好ましい実施形態においては、プローブまたはプライマーは、放射性核種( $^{32}\text{P}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^3\text{H}$ 、または他の標識)で、蛍光団(ローダミン、フルオレセイン)で、または化学発光団(ルシフェラーゼ)で標識される。

40

#### 【0152】

(ii) 鋳型依存性の増幅方法

多数の鋳型依存性のプロセスを、所定の鋳型サンプル中に存在しているマーカー配列を増幅するために利用することができる。1つの最も良く知られている増幅方法は、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR<sup>TM</sup>と呼ばれる)である。これは、米国特許第4,683,195号、同第4,683,202号、および同第4,800,159号、ならびにInnisら、1990に詳細に記載されている。これらのそれぞれが、本明細書中で参考としてそ

50

の全体が援用されている。

【0153】

簡潔には、PCRにおいては、2つのプライマー配列が調製され、これらはマーカ配列の反対側の相補鎖上の領域に対して相補的である。過剰のデオキシヌクレオシド三リン酸が、DNAポリメラーゼ（例えば、Taqポリメラーゼ）とともに反応混合物に添加される。マーカ配列がサンプル中に存在する場合は、プライマーはマーカに結合し、そしてポリメラーゼによって、プライマーが、ヌクレオチドへの付加によるマーカ配列に沿った伸張を生じる。反応混合物の温度を上昇および低下させることによって、伸張されたプライマーが反応産物を形成するようにマーカから解離し、過剰のプライマーはマーカおよび反応産物に結合し、そしてプロセスが繰り返される。

10

【0154】

逆転写酵素PCR増幅手順は、増幅されたmRNAの量を定量するために行われ得る。RNAをcDNAに逆転写する方法は周知であり、そしてSambrookら（1989）に記載されている。逆転写のための別の方法は、熱安定性RNA依存性DNAポリメラーゼを利用する。これらの方法は、1990年12月21日に提出されたWO 90/07641号に記載されている。ポリメラーゼ連鎖反応方法は当該分野で周知である。

【0155】

別の増幅方法は、リガーゼ連鎖反応（「LCR」）である。これは、その全体が本明細書中で参考として援用されている、EPA第320308号で開示されている。LCRにおいては、2つの相補的なプローブの対が調製され、そして標的配列の存在下では、それぞれの対は、これらが隣接するように標的の反対側の相補鎖に結合する。リガーゼの存在下では、2つのプローブの対は単一のユニットを形成するように連結する。PCRの場合のように、温度の循環によって、結合し連結したユニットが標的から解離し、次いで過剰なプローブ対の連結のための「標的配列」として作用する。米国特許第4,883,750号は、標的配列に対するプローブ対の結合のためのLCRと同様の方法を記載している。

20

【0156】

「ジオリゴヌクレオチド」を生じる配列を有している核酸の存在下での2つ（またはそれ以上）のオリゴヌクレオチドの連結、それによるジオリゴヌクレオチドの増幅に基づく方法はまた、本発明の増幅工程においても使用され得る。Wuら（1989）は、その全体が本明細書中で参考として援用されている。

30

【0157】

(iii) サザン/ノーザンブロットティング

ブロットティング技術は当業者に周知である。サザンブロットティングは、標的としてのDNAの使用を含むが、一方、ノーザンブロットティングは、標的としてのRNAの使用を含む。それぞれが異なるタイプの情報を提供するが、cDNAブロットティングは、多くの局面において、ブロットティングまたはRNA種と同様である。

【0158】

簡潔には、プローブが、適切なマトリックス（多くの場合は、ニトロセルロースのフィルター）上に固定されているDNAまたはRNA種を標的化するために使用される。種々の種が分析を容易にするために空間的に分離されるべきである。これは多くの場合は、核酸種のゲル電気泳動、それに続くフィルターへの「ブロットティング」によって行われる。

40

【0159】

続いて、プロットされた標的は、変性および再ハイブリダイゼーションを促進する条件下でプローブ（通常は標識されている）とともにインキュベートされる。プローブは標的と塩基対合するように設計されているので、プローブは再生（renature）条件下で標的配列の一部に結合する。次いで、結合していないプローブが除去され、そして検出が上記のように達成される。

【0160】

(iv) 分離方法

通常は、1段階でまたはそれ以外で、特異的な増幅が生じたかどうかを決定する目的のため

50

めに、鋳型および過剰なプライマーから増幅産物を分離することが所望される。1つの実施形態においては、増幅産物は、標準的な方法を使用して、アガロースゲル、アガロース-アクリルアミドゲル、またはポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離される。Sambrookら、1989を参照のこと。

#### 【0161】

あるいは、クロマトグラフィー技術が、分離を達成するために使用され得る。多種のクロマトグラフィー（吸着、分配、イオン交換、および分子量ふるい）が、本発明において使用され得る。そして、それらを使用する多くの専門的な技術には、カラムクロマトグラフィー、ペーパークロマトグラフィー、および薄層クロマトグラフィー、ならびにガスクロマトグラフィーが含まれる（Freifelder、1982）。

10

#### 【0162】

##### （v）検出方法

産物は、マーカ配列の増幅を確認するために視覚化され得る。1つの典型的な視覚化方法には、エチジウムブロマイドでのゲルの染色、およびUV光下での視覚化が含まれる。あるいは、増幅産物が放射標識ヌクレオチドまたは蛍光標識ヌクレオチドで一体的に標識されている場合は、増幅産物は分離後に、x線フィルムに曝されるか、または適切な刺激スペクトル下で視覚化され得る。

#### 【0163】

1つの実施形態においては、視覚化は間接的に行われる。増幅産物の分離後、標識された核酸プローブは増幅されたマーカ配列と接触させられる。プローブは好ましくは、発色団（しかし、放射標識である場合がある）に結合させられる。別の実施形態においては、プローブは結合パートナー（例えば、抗体またはビオチン）に結合され、そして結合対の他のメンバーが検出可能な部分を保有する。

20

#### 【0164】

1つの実施形態においては、検出は標識されたプローブによる。関係する技術は当業者に周知であり、そして分子プロトコールについての多くの標準的な文献中に見ることができる。Sambrookら（1989）を参照のこと。例えば、発色団または放射標識プローブまたはプライマーは、増幅の間または増幅後に標的を同定する。

#### 【0165】

上記の一例は、本明細書中で参考として援用されている米国特許第5,279,721号に記載されている。これは、核酸の自動的な電気泳動および移動のための装置および方法を開示している。この装置は、外部から操作することなくゲルの電気泳動およびプロテイングが可能であり、そして本発明の方法を実行するために理想的に適している。

30

#### 【0166】

さらに、上記の増幅産物は、標準的な配列分析技術を使用して特異的な種のバリエーションを同定するための配列分析に供され得る。特定の方法においては、遺伝子の徹底的な分析が、最適な配列決定のために設計されたプライマーのセットを使用する配列分析によって行われる（Pignoneら、1994）。本発明は、これらのタイプの分析のいずれかまたは全てが使用され得る方法を提供する。本明細書中に開示されている配列を使用して、次いで直接的な配列決定によって分析され得るカルサルシン遺伝子全体の配列の増幅を可能にするオリゴヌクレオチドプライマーが設計され得る。

40

#### 【0167】

##### （vi）キットの成分

カルサルシンおよびその改変体の検出および配列決定に必要な全ての必須の材料および試薬が、キット中に一緒にまとめられ得る。これは一般的には、予め選択されたプライマーおよびプローブを含む。増幅に必要な反応混合物を提供するための、種々のポリメラーゼ（RT、Taq、Sequenase（登録商標）など）を含む核酸の増幅に適切な酵素、デオキシヌクレオチド、および緩衝液もまた、含まれ得る。このようなキットはまた、一般的には、適切な手段で、個々の試薬および酵素、ならびに各プライマーまたはプローブについての別々の容器を含む。

50

## 【0168】

( I I I . カルサルシンと反応する抗体の作成 )

別の局面においては、本発明は、本発明のカルサルシン分子またはその任意の部分と免疫反応性である抗体を含む。抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体であり得る。好ましい実施形態においては、抗体はモノクローナル抗体である。抗体の調製および特徴付けのための手段は当該分野で周知である（例えば、HarlowおよびLane、1988を参照のこと）。

## 【0169】

簡潔には、ポリクローナル抗体は、本発明のポリペプチドを含有している免疫原で動物を免疫し、そしてその免疫した動物から抗血清を回収することによって調製される。広範囲の動物種が、抗血清の産生のために使用され得る。典型的には、抗血清の産生のために使用される動物は、ウサギ、マウス、ラット、ハムスター、ブタ、またはウマを含むヒト以外の動物である。ウサギの血液量は比較的多いので、ウサギがポリクローナル抗体の産生のための好ましい選択肢である。

10

## 【0170】

アイソフォーム抗原に特異的な抗体（ポリクローナルおよびモノクローナルの両方）は、当業者に公知の従来免疫化技術を使用して調製され得る。本発明の化合物の抗原性エピトープを含有している組成物が、ウサギまたはマウスのような1つ以上の実験動物を免疫するために使用され得る。次いでこれは、本発明の化合物に対する特異的な抗体を産生するように処理される。ポリクローナル抗血清は、単純に動物を放血させ、そして全血から血清サンプルを調製することによって、抗体産生のための時間後に得ることができる。

20

## 【0171】

本発明のモノクローナル抗体が、ELISAおよびウェスタンブロット法のような標準的な免疫化学的手順、ならびに組織染色のような免疫組織化学的手順、ならびにカルサルシン関連抗原エピトープに特異的な抗体を利用し得る他の手順において、有用な適用を有することが提起される。さらに、異なる種の特定のカルサルシンに特異的なモノクローナル抗体が他の有用な適用において利用され得ることが提起される。

## 【0172】

一般的には、カルサルシンに対するポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の両方が、種々の実施形態において使用され得る。例えば、これらは、他のカルサルシンをコードするcDNAまたは遺伝子を得るための抗体クローニングプロトコールにおいて使用され得る。これらはまた、細胞または動物中のカルサルシン関連ペプチドの作用を分析するための阻害研究において使用される場合がある。カルサルシン抗体はまた、種々の細胞性の事象の間のカルサルシンの分布を分析するため（例えば、細胞周期の異なる時点で、カルサルシンポリペプチドの細胞特異的分布または組織特異的分布をそれぞれ決定するため）の免疫局在化研究において有用である。このような抗体の特に有用な適用は、例えば、抗体親和性カラムを使用する、天然のまたは組換えのカルサルシンの精製においてである。全てのこのような免疫学的技術の操作は、本発明の開示を参照して当業者に公知である。

30

## 【0173】

抗体の調製および特徴付けのための手段は当該分野で周知である（例えば、HarlowおよびLane、1988；本明細書中で参考として援用されている）。モノクローナル抗体の調製のより特異的な例は、以下の実施例に提供される。

40

## 【0174】

当該分野で周知であるように、所定の組成物は、その免疫原性において多様であり得る。従って、しばしば、キャリアに対してペプチドまたはポリペプチド免疫原をカップリングさせることによって達成され得るように、宿主免疫システムを追加免疫することが必要である。例示的でありそして好ましいキャリアは、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）およびウシ血清アルブミン（BSA）である。他のアルブミン（例えば、オボアルブミン、マウス血清アルブミン、またはウサギ血清アルブミン）もまた、キャリアとして

50

使用することができる。キャリアタンパク質に対してポリペプチドを結合させるための手段は当該分野で周知であり、そしてグルタルアルデヒド、m-マレイミドベンコイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、カルボジイミド、およびビス-ビアゾチド化(bis-biazotized)ベンジジンが含まれる。

【0175】

当該分野で周知であるように、特定の免疫原性組成物の免疫原性は、アジュバントとして公知である免疫応答の非特異的刺激因子の使用によって増強することができる。例示的でありそして好ましいアジュバントには、完全なフロイトのアジュバント(死滅したMycobacterium tuberculosisを含有している免疫応答の非特異的刺激因子)、不完全なフロイトのアジュバント、および水酸化アルミニウムアジュバントが含まれる。

10

【0176】

ポリクローナル抗体の産生に使用される免疫原性組成物の量は、免疫原の性質、ならびに免疫化のために使用される動物に依存して変化する。種々の経路(皮下、筋肉内、経皮、静脈内、および腹腔内)が、免疫原の投与のために使用され得る。ポリクローナル抗体の産生は、免疫化後の種々の時点で免疫化した動物の血液をサンプリングすることによってモニターされ得る。第2回目の追加免疫の注射もまた与えられ得る。追加免疫および力価測定のプロセスは、適切な力価が達成されるまで繰り返される。所望されるレベルの免疫原性が得られると、免疫化された動物は放血させられ、血清が単離されて保存され、そして/またはmAbを作成するためにこの動物が使用され得る。

20

【0177】

mAbは、本明細書中で参考として援用されている米国特許第4,196,265号中で説明されているような周知の技術の使用を通じて容易に調製され得る。典型的には、この技術は、選択された免疫原性組成物(例えば、精製されたかもしくは部分的に精製されたカルサルシンタンパク質、ポリペプチド、もしくはペプチド、または高レベルのカルサルシンを発現する細胞)で適切な動物を免疫することを含む。免疫用組成物は、抗体産生細胞を刺激するために有効な様式で投与される。マウスおよびラットのようなげっ歯類が好ましい動物であるが、ウサギ、ヒツジ、カエルの細胞の使用もまた可能である。ラットの使用によっては特定の利点が提供されることがある(Godding, 1986)が、マウスが好ましく、BALB/cマウスが、最も日常的に使用されそして通常は安定な融合体を高い割合で生じるので、最も好ましい。

30

【0178】

本発明の抗体は、ELISAおよびウェスタンブロットティングのような技術を通じて、健康組織および疾患組織のカルサルシン内容物を特徴付けることにおいて使用され得る。これは、心筋症の存在もしくは非存在についてのスクリーニングを提供するか、または心疾患の予測を提供する場合がある。

【0179】

本発明の抗体のELISAアッセイにおける使用が意図される。例えば、抗カルサルシン-1または抗カルサルシン-2抗体が、選択された表面(好ましくは、タンパク質親和性を示す表面(例えば、ポリスチレンマイクロタイタープレートのウェル))上に固定される。不完全に吸着した物質を除去するための洗浄後、アッセイプレートのウェルを、ウシ血清アルブミン(BSA)、カゼイン、または粉ミルクの溶液のような試験抗血清に関して抗原的に中性であることが公知の非特異的タンパク質と結合させるかまたはそれでコーティングすることが所望される。これによって、固定表面上の非特異的部位をブロックし、従って表面上への非特異的抗原の結合によって生じるバックグラウンドを減少させる。

40

【0180】

ウェルへの抗体の結合、バックグラウンドを減少させるための非反応性材料でのコーティング、および結合していない材料を除去するための洗浄後、固定表面が免疫複合体(抗原/抗体)の形成を助ける様式で試験されるサンプルと接触させられる。

【0181】

50

試験サンプルと結合した抗体との間での特異的な免疫複合体の形成、およびそれに続く洗浄後、免疫複合体の形成の発生およびその量が、カルサルシン - 1 に対して 1 次抗体とは異なる特異性を有している 2 次抗体に対してそれらを供することによって決定され得る。適切な条件には、好ましくは、BSA、ウシ グロブリン ( B G G )、およびリン酸緩衝生理食塩水 ( P B S ) / T w e e n ( 登録商標 ) のような希釈剤でのサンプルの希釈が含まれる。これらの添加された試薬もまた、非特異的なバックグラウンドの減少を助ける傾向にある。次いで、層をなした抗血清が約 2 ~ 4 時間、好ましくは約 25 から約 27 程度の温度でインキュベートされる。インキュベーション後、抗血清でコーティングされた表面が、免疫複合体化されていない材料を除去するために洗浄される。好ましい洗浄手順には、P B S / T w e e n ( 登録商標 ) またはホウ酸塩緩衝液のような溶液での洗浄が含まれる。

10

#### 【 0 1 8 2 】

検出手段を提供するためには、好ましくは、2 次抗体は、適切な色素形成性基質とのインキュベーションの際に発色を生じる連結された酵素を有する。従って、例えば、2 次抗体に結合した表面をウレアーゼまたはペルオキシダーゼが結合した抗ヒト I g G とともに、免疫複合体の形成を生じるために好ましい時間および条件下で接触させるかまたはそれとともにインキュベートする ( 例えば、P B S / T w e e n ( 登録商標 ) のような P B S を含有している溶液中で室温にて 2 時間のインキュベーション ) ことが所望される。

#### 【 0 1 8 3 】

酵素標識がペルオキシダーゼの場合には、2 次酵素タグ化抗体とのインキュベーション、それに続く結合していない材料を除去するための洗浄後、標識の量が、尿素およびプロモクレゾールパープル、または 2 , 2 ' - アジノ - ジ - ( 3 - エチル - ベンズチアゾリン ) - 6 - スルホン酸 ( A B T S ) および H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> のような色素形成性基質とのインキュベーションによって定量される。次いで、定量は、例えば、可視スペクトル分光光度計を使用して色素形成の程度を測定することによって達成される。

20

#### 【 0 1 8 4 】

上記の形式は、最初にアッセイプレートにサンプルを結合させることによって変更され得る。次いで 1 次抗体がアッセイプレートとともにインキュベートされ、続いて 1 次抗体について特異性を有している標識された 2 次抗体を使用して、結合した 1 次抗体が検出される。

30

#### 【 0 1 8 5 】

本発明の抗体組成物は、イムノプロットまたはウェスタンプロット分析の使用において重要な用途を提供する。抗体は、固体支持マトリックス ( 例えば、ニトロセルロース、ナイロン、またはそれらの組合せ ) 上に固定されたタンパク質の同定のための高親和性の一次的な試薬として使用され得る。免疫沈降、続くゲル電気始動と組合せて、これらは、抗原の検出において使用されるそれに対する 2 次的な試薬が有害なバックグラウンドを生じる抗原の検出における使用のために一工程の試薬として使用され得る。ウェスタンプロットティングと組合せた使用のための免疫学に基づく検出方法には、これに関する特定の用途が考慮される毒素部分に対する、酵素タグ化、放射標識タグ化、または蛍光タグ化 2 次抗体が含まれる。

40

#### 【 0 1 8 6 】

##### ( I V . 組合せ治療 )

多くの臨床的な状況では、異なる治療の組合せの使用が賢明である。従って、本明細書中に記載されている治療に加えて、より「標準的な」薬学的な心臓の治療方法を患者に提供することもまた望まれることが想定される。標準的な治療方法の例には、いわゆる「プロロッカー」、抗高血圧薬、強心剤、抗血栓薬、血管拡張剤、ホルモンアンタゴニスト、エンドセリンアンタゴニスト、カルシウムチャンネルプロロッカー、ホスホジエステラーゼインヒビター、アンジオテンシン 2 型アンタゴニスト、およびサイトカインプロロッカー/インヒビターが含まれる。本明細書中に記載されているスクリーニング方法に従って同定された医薬品との組合せもまた想定される。

50

## 【0187】

組合せは、両方の試薬を含有している単一の組成物または薬学的処方物と心臓細胞を接触させることによって、あるいは、細胞を同時に2つの異なる組成物または処方物と接触させることによって達成され得る。ここでは、一方の組成物が発現構築物を含有し、そして他方が試薬を含有する。あるいは、数分から数週間の範囲の間隔で他の薬剤での処置に対して、遺伝子治療が先行するかまたはそれに続く場合がある。他の試薬および発現構築物が細胞に対して別々に適用される1つの実施形態においては、一般的には、それぞれの送達時間の間の有意な時点では失活せず、その結果、試薬および発現構築物はなお細胞に対して有利な組合せ作用を発揮することが可能であることを確実にさせられる。このような例では、細胞が互いに12～24時間以内に（好ましくは、互いに約6～12時間以内に）両方の種類と接触させられ、わずかに約12時間の遅延時間が最も好ましい。一部の状況では、処理時間を有意に延長することが所望される場合があるが、それぞれの投与の間は数日（2、3、4、5、6、または7日）から数週間（1、2、3、4、5、6、7、または8週間）の経過である。

## 【0188】

カルサルシンまたは他の試薬の1回以上の投与が所望されることもまた、想定される。以下に示すような種々の組合せが使用され得る。ここでは、カルサルシンは「A」であり、そして他の試薬は「B」である：

A / B / A    B / A / B    B / B / A    A / A / B    B / A / A    A / B / B    B / B /  
 B / A    B / B / A / B    A / A / B / B /    A / B / A / B    A / B / B / A    B / B    20  
 / A / A    B / A / B / A    B / A / A / B    B / B / B / A    A / A / A / B    B / A  
 / A / A    A / B / A / A    A / A / B / A    A / B / B / B    B / A / B / B    B / B  
 / A / B。

他の組合せも同様に意図される。

## 【0189】

（V．患者への投与のための処方物および経路）

臨床的な適用が意図される場合には、薬学的組成物 - 発現ベクター、ウイルスストック、および薬物 - を、意図される適用に適切な形態で調製することが必要である。一般的には、これは、本質的には発熱性物質、ならびにヒトまたは動物に対して有害であり得る他の不純物を含まない組成物を調製することを必然的に伴う。

## 【0190】

一般的には、ベクターの送達を安定にし、そして標的細胞による取り込みを可能にする適切な塩および緩衝液を使用することが所望される。緩衝液はまた、組換え細胞が患者に導入される際にも使用される。本発明の水溶性組成物は、薬学的に受容可能なキャリアまたは水性の媒体中に溶解されたかまたは分散された細胞に対する有効量のベクターを含有する。このような組成物は、接種原とも呼ばれる。句「薬学的にまたは薬理的に受容可能な」は、動物またはヒトに投与された場合に、有害な、アレルギー性の、または他の所望されない反応を生じない分子構成要素および組成物をいう。本明細書中で使用される場合は、「薬学的に受容可能なキャリア」は、任意のおよびすべての溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張化剤、および吸収遅延剤などを含む。このような媒体および試薬の薬学的に活性な物質についての使用は当該分野で周知である。任意の従来の媒体または試薬が本発明のベクターまたは細胞と不適合である場合を除いて、治療用組成物中でのその使用が意図される。補助的な有効成分もまた、組成物中に取り込むことが可能である。

## 【0191】

本発明の活性な組成物は、古典的な薬学的調製物を含み得る。本発明のこれらの組成物の投与は、標的組織がその経路を通じて利用可能である限りは、任意の一般的な経路による。これには、経口、鼻、バツカル剤、直腸、膣、または局所が含まれる。あるいは、投与は、正常位、皮内、皮下、筋肉内、腹膜内、または静脈内注射によることがある。このような組成物は、通常は、上記のような薬学的に受容可能な組成物として投与される。

## 【0192】

活性な化合物もまた、非経口的にまたは腹膜内で投与され得る。遊離の塩または薬学的に受容可能な塩としての活性な化合物の溶液は、ヒドロキシプロピルセルロースのような界面活性剤と適切に混合された水中で調製され得る。分散剤はまた、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびそれらの混合物中で、ならびに油中で調製され得る。通常の保存および使用条件下では、これらの調製物は、微生物の増殖を妨げるための保存料を含む。

## 【0193】

注射可能薬物の用途に適切な薬学的形態には、滅菌の水溶液または分散物、ならびに滅菌の注射可能薬物の溶液または分散物の即座の調製のための滅菌粉末が含まれる。全ての場 10  
合において、この形態は滅菌でなければならず、そして容易に注射器中に存在する程度に液性でなければならない。これは製造および保存条件下で安定でなければならず、そして微生物（例えば、細菌および真菌）の混入作用を防がなければならない。キャリアは例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、それらの適切な混合物、ならびに植物油を含む溶媒または分散媒体であり得る。適切な液性は、例えば、コーティング（例えば、レシチン）の使用によって、分散物の場合には必要な粒子の大きさの維持によって、そして界面活性剤の使用によって維持することができる。微生物の作用の防御は、種々の抗菌剤、抗真菌剤（例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなど）によってもたらされ得る。多くの場合、等張化剤（例えば、糖および塩化ナトリウム 20  
）を含むことが好ましい。注射可能薬物の組成物の吸収の延長は、組成物中での吸収遅延剤（例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン）の使用によってもたらされ得る。

## 【0194】

滅菌の注射可能薬物の溶液は、上記に列挙された種々の他の成分とともに適切な溶媒中に必要量の活性な化合物を取り込むこと、必要である場合には、続いて濾過滅菌することによって、調製される。一般的には、分散物は、塩基性分散媒体および上記に列挙されたものからの必要な他の成分を含有している滅菌のビヒクル中に、種々の滅菌の有効成分を取り込むことによって調製される。滅菌の注射可能薬物溶液の調製のための滅菌の粉末の場合には、好ましい調製方法は、真空乾燥および凍結乾燥技術である。これによって、その 30  
予め滅菌濾過された溶液から、有効成分および任意のさらなる所望される成分の粉末が得られる。

## 【0195】

本明細書中で使用される場合は、「薬学的に受容可能なキャリア」は、溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張化剤、ならびに吸収遅延剤などのいずれかおよび全てを含む。薬学的に活性な物質についてのこのような媒体および試薬の使用は当該分野で周知である。任意の従来媒体または試薬が有効成分と不適合でない限りは、治療用組成物中でのその使用が意図される。補助的な有効成分もまた、組成物中に取り込むことができる。

## 【0196】

経口投与のためには、本発明のポリペプチドは賦形剤とともに取り込まれ得、そして摂取不可能なうがい薬および歯磨き剤の形態で使用され得る。うがい薬は、適切な溶媒（例えば、ホウ酸ナトリウム溶液（D o b e l l ' s S o l u t i o n））中に必要量の有効成分を取り込むことによって調製され得る。あるいは、有効成分は、ホウ酸ナトリウム、グリセリン、および重炭酸カリウムを含有している防腐剤洗浄液中に取り込まれ得る。有効成分はまた、ゲル、ペースト、粉末、およびスラリーを含む歯磨剤中に分散され得る。有効成分は、水、結合剤、研磨剤、甘味料、発泡剤、および湿潤剤を含み得るペースト状の歯磨剤に対して治療有効量で添加され得る。

## 【0197】

本発明の組成物は、中性または塩の形態で処方され得る。薬学的に受容可能な塩には、酸 50

添加塩（タンパク質の遊離のアミノ基により形成される）が含まれ、そしてこれは、例えば、塩酸またはリン酸のような無機酸、あるいは酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などの有機酸を用いて形成される。遊離のカルボキシル基を用いて形成される塩はまた、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、または水酸化第二鉄のような無機塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなどの有機塩基に由来し得る。

【0198】

処方の際には、溶液は、投与量処方物と適合性の様式で、そして治療的に有効である場合にはそのような量で、投与される。処方物は、注射可能薬物の溶液、薬物放出カプセルなどの種々の投薬形態で容易に投与される。水溶液中での非経口投与については、例えば、溶液は、必要な場合には適切に緩衝化されるべきであり、そして液体希釈剤は、最初に、十分な生理食塩水またはグルコースで等張性にされるべきである。これらの特定の水溶液は、静脈内、筋肉内、皮下、および腹腔内投与に特に適切である。この関係においては、使用され得る滅菌の水性媒体は、本発明の開示を参照して当業者に公知である。例えば、1つの投与量は、1mlの等張性のNaCl溶液中に溶解され得、そして1000mlの皮下注入用の液体に添加され得るか、または提起された注入部位で注射され得るかのいずれかである（例えば、「Remington's Pharmaceutical Sciences」第15版、1035-1038頁および1570-1580頁を参照のこと）。投与量のいくつかのバリエーションが、処置される被験体の症状に依存して必然的に生じる。投与する医師が、任意の症例において、個々の被験体について適切な用量を決定する。さらに、ヒトへの投与については、調製物は、FDA Office of Biologics standardによって要求される滅菌性、発熱性、一般的な安全性、および純度の基準を満たされるべきである。

10

20

【0199】

（VI．トランスジェニックマウスの作成方法）

本発明の特定の実施形態は、カルサルシン関連構築物を含むトランスジェニック動物を提供する。カルサルシンを発現するトランスジェニック動物、このような動物に由来する細胞株、およびトランスジェニック胚は、カルサルシンと相互作用し、それぞれ、-アクチニン、テレットニン、またはカルシニューリンに対するカルサルシンの結合を調節する薬剤、あるいは、カルサルシンの利用による心肥大または心不全に影響を与える薬剤を、スクリーニングおよび同定するための方法において有用であり得る。構成的に発現されるカルサルシンの使用は、正常な基底レベルの発現と比較して過剰発現またはアップレギュレートされた発現についてのモデルを提供する。また、カルサルシンについて「ノックアウト」されたトランスジェニック動物が、例えば、スクリーニング方法に、または候補化合物についての治療的アッセイのためのモデルとして利用される。

30

【0200】

（A．トランスジェニックを産生する方法）

一般的な局面においては、トランスジェニック動物は、導入遺伝子の発現を可能にする様式でのゲノム中への所定の導入遺伝子の組込みによって産生される。トランスジェニック動物を産生する方法は、一般的には、WagnerおよびHoppe（米国特許第4,873,191号；これは本明細書中で参考として援用されている）、Brinsterら、1985（これはその全体において本明細書中で参考として援用されている）、および「Manipulating the Mouse Embryo; A Laboratory Manual」第2版（Hogan、Beddington、ConstantiniおよびLong編、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1994；これはその全体において本明細書中で参考として援用されている）によって記載されている。

40

【0201】

典型的には、ゲノム配列によって隣接されている遺伝子が、受精卵中へのマイクロインジェクションによって導入される。マイクロインジェクションされた卵は宿主の雌に移植さ

50

れ、そして子孫が導入遺伝子の発現についてスクリーニングされる。トランスジェニック動物は、爬虫類、両生類、鳥類、哺乳類、および魚類を含むがこれらに限定されない多数の動物由来の受精卵から産生され得る。

#### 【0202】

マイクロインジェクションのためのDNAクローンは、当該分野で公知の任意の手段によって調製することができる。例えば、マイクロインジェクションのためのDNAクローンは、細菌のプラスミド配列を除去するために適切な酵素で切断することができ、そしてDNAフラグメントが標準的な技術を使用してTBE緩衝液中の1%アガロースゲル上で電気泳動される。DNAのバンドがエチジウムブロマイドでの染色によって視覚化され、そして発現配列を含有しているバンドが切り出される。次いで、切り出されたバンドは、0.3 Mの酢酸ナトリウム(pH 7.0)を含有している透析バッグ中に入れられる。DNAは透析バッグ中に電氣的に溶出され、1:1のフェノール:クロロホルム溶液で抽出され、そして2倍容量のエタノールで沈澱させられる。DNAは、1 mlの低塩緩衝液(0.2 MのNaCl、20 mMのTris(pH 7.4)、および1 mMのEDTA)中に再溶解させられ、そしてElutip-D<sup>TM</sup>カラム上で精製される。このカラムは、3 mlの高塩緩衝液(1 MのNaCl、20 mMのTris(pH 7.4)、および1 mMのEDTA)で最初に準備され、続いて5 mlの低塩緩衝液で洗浄される。DNA溶液は、DNAをカラムマトリックスに結合させるために、3回カラムを通過させられる。3 mlの低塩緩衝液で1回の洗浄後、DNAは0.4 mlの高塩緩衝液で溶出され、そして2倍容量のエタノールによって沈澱させられる。DNA濃度が、UV分光光度計で260 nmでの吸光度によって測定される。マイクロインジェクションのために、DNA濃度が、5 mMのTris(pH 7.4)および0.1 mMのEDTA中で3 µg/mlに調整される。

#### 【0203】

マイクロインジェクションのためのDNAの他の精製方法は、Hoganら、Manipulating the Mouse Embryo (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1986)、Palmiterら、Nature 300:611 (1982); The Qiagenologist, Application Protocols, 第3版(Qiagen, Inc., Chatsworth, CA.によって出版されている); および Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989)に記載されている。これらの全てが、本明細書中で参考として援用されている。

#### 【0204】

例示的なマイクロインジェクション手順においては、雌性の6週齢のマウスが、妊娠している成熟した雌の血清のゴナドトロピン(PMSG; Sigma)の5 IUの注射(0.1 cc, ip)、48時間後のヒト柔毛膜ゴナドトロピン(hCG; Sigma)の5 IUの注射(0.1 cc, ip)で過排卵に誘導される。雌は、hCGの注射の直後に雄と一緒にされる。hCGの注射の21時間後、交尾した雌はCO<sub>2</sub>での窒息または頸部脱臼によって屠殺され、そして胚が摘出された卵管から取り出され、そして0.5%のウシ血清アルブミン(BSA; Sigma)を含むダルベッコリン酸緩衝化生理食塩水中に入れられる。周辺の卵丘細胞がヒアルロニダーゼ(1 mg/ml)で除去される。次いで、前核胚が洗浄され、そして注射時まで、0.5%のBSA(EBSS)を含有しているEarleの平衡化塩溶液中で、5%のCO<sub>2</sub>、95%の空気の加湿環境を有する37.5のインキュベーター中に置かれる。胚は、2細胞段階で移植することができる。

#### 【0205】

無作為に動き回っている成体の雌性マウスは、精管切除した雄と対にされる。C57BL/6マウスもしくはSwissマウスまたは他の相当する株を、この目的のために使用することができる。レシピエントの雌はドナーの雌と同時に交尾させられる。胚の導入時に

、レシピエントの雌は、体重1グラムあたり0.015mlの2.5%アベルチンの腹腔内注射で麻酔される。卵管が1本の背側正中線切開によって露出させられる。次いで、切開が体壁を通過して卵管にわたって直接行われる。次いで、卵巣嚢に、時計用ピンセットを用いて穴を空ける。導入される胚は、DPBS（ダルベッコリン酸緩衝化生理食塩水）中に入れられ、そして導入ピペットのチップの中に入れられる（約10～12個の胚）。ピペットのチップが漏斗に挿入され、そして胚が導入される。導入後、切開が2つの縫合で閉じられる。

【0206】

（V I I . スクリーニングアッセイ）

従って、本発明はまた、カルシニューリン、テレトニン、または - アクチニンと相互作用する、および/またはそれらのカルサルシンとの結合に影響を与える種々の能力について化合物をスクリーニングすることを意図する。特に好ましい化合物は、カルシニューリンへのカルサルシンの結合の阻害または促進に有用な化合物である。本発明のスクリーニングアッセイにおいては、候補物質は最初に、基本的な生化学的活性（例えば、標的分子への結合）についてスクリーニングされ得、次いで、細胞レベル、組織レベル、または動物全体レベルで発現の調節を阻害するその能力について試験され得る。

【0207】

（A . モジュレーターおよびアッセイ形式）

用語「調節する」は、本明細書中で使用される場合には、任意の様式でカルシニューリンポリペプチドの活性に影響する、活性を調節する、反映する、調整する、または制御するとして定義される。好ましい実施形態においては、セリン/スレオニンプロテインホスファターゼとして作用するカルシニューリンの機能は、カルサルシンの投与によって調節される。

【0208】

本明細書中で使用される場合、用語「候補物質」は、カルサルシンの活性、またはカルシニューリン、テレトニン、もしくは - アクチニンへのカルサルシンの結合を潜在的に調節し得る任意の分子をいう。候補物質は、タンパク質またはそのフラグメント、低分子インヒビター、またはさらに核酸分子であり得る。最も有用な薬理的化合物が、カルサルシンと天然において相互作用する化合物と構造的に関係している化合物であることがこの場合が証明され得る。このような分子を作成し、そしてその作用を試験することは、「合理的な薬物設計」として公知であり、そして標的分子の構造への関係の予測を行うことを含む。

【0209】

合理的な薬物の設計の目的は、生物学的に活性なポリペプチドまたは標的化合物の構造的なアナログを生成することである。このようなアナログを作成することによって、天然の分子よりも活性であるかまたは安定である薬物を作ることが可能である。この薬物は、変更に対して種々の感受性を有するか、または種々の他の分子の機能に影響を与え得る。1つのアプローチにおいては、カルサルシンと同様の分子の3次構造を作成し、次いでカルサルシン、 - アクチニン、またはテレトニンの分子と相互作用するその能力について分子を設計する。あるいは、カルサルシンの部分的に機能的な（結合するが活性でない）フラグメントを設計し、これによって競合インヒビターを作成することができる。これは、x線結晶学、コンピューターモデリング、または両方のアプローチの組合せによって達成することができる。

【0210】

標的化合物またはインヒビターの構造を確認するために抗体を使用することもまた可能である。原則的には、このアプローチは、続く薬物の設計が基づき得る薬種（pharmacore）を生じる。機能的な薬理的に活性な抗体に対する抗イディオタイプ抗体を作成することによって、タンパク質を結晶学的に完全にバイパスすることが可能である。鏡像の鏡像の場合には、抗イディオタイプの結合部位は、もともとの抗原のアナログであると予想される。次いで、抗イディオタイプは、化学的に産生されたかまたは生物学的に産

生されたペプチドのバンクからペプチドを同定しそして単離するために使用され得る。次いで、選択されたペプチドは、薬種として作用する。抗イディオタイプは、抗原として抗体を使用して、抗体の産生について本明細書中に記載されている方法を使用して作成され得る。

#### 【0211】

この場合には、カルシニューリン、テレットニン、または - アクチニンへのカルサルシンの結合を実証する十分な証拠が存在している。カルサルシンのこの標的分子への結合の分析によって、カルシニューリン、テレットニン、または - アクチニンを認識するカルサルシンの能力についての多くの情報を収集することができる。この情報を用いて、カルシニューリン活性の潜在的インヒビターまたは活性化因子、あるいはカルシニューリンまたは - アクチニンへのカルサルシンの結合の促進因子の構造に関して、予測を行うことができる。

10

#### 【0212】

一方、有用な化合物の同定を「強引に行う (brute force)」試みにおいて有用な薬物の基本的な基準を満たすと考えられる低分子ライブラリーを、種々の商業的な供給源から簡単に獲得することができる。このようなライブラリー (組合せによって作成されたライブラリー (例えば、ペプチドライブラリー) を含む) のスクリーニングは、活性について多数の関連している (および無関係な) 化合物をスクリーニングするための迅速かつ効率的な方法である。組合せアプローチはまた、活性についてモデル化された第2、第3、および第4世代の化合物 (そうでなければ、所望されない化合物) の作成によって、潜在的な薬物の迅速な進化に、自身を適合させる。

20

#### 【0213】

候補化合物は、天然に存在している化合物のフラグメントまたは一部を含み得るか、あるいはそうでなければ不活性である既知の化合物の活性な組み合わせとして見出され得る。天然の供給源 (例えば、動物、細菌、真菌、植物供給源 (葉および樹皮を含む)) から単離された化合物、および海洋性サンプルは、潜在的に有用な薬学的薬剤の存在について、候補としてアッセイされ得る。スクリーニングされる薬学的薬剤はまた、化学的組成物または人工化合物から誘導または合成することも可能であることが理解される。従って、本発明によって同定される候補物質は、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、低分子インヒビター、または肥大性応答の既知のインヒビターから開始する、合理的な薬物設計によって設計され得る任意の他の化合物であり得ることが理解される。

30

#### 【0214】

他の適切なインヒビターには、アンチセンス分子、リボザイム、および抗体 (単鎖抗体を含む) が含まれる。これらのそれぞれは、カルシニューリン経路内に位置する標的について特異的である。このような化合物は、この文書において別の場所でより詳細に記載される。

#### 【0215】

もちろん、本発明の全てのスクリーニング方法が、有効な候補が見出されないかもしれないという事実にもかかわらず、それ自体が有用であることが理解される。本発明は、このような候補を発見する方法だけではなく、これらをスクリーニングする方法をも提供する。

40

#### 【0216】

本発明の目的に従うと、カルシニューリンへのカルサルシンの結合のモジュレーターをスクリーニングするための方法が存在する。この方法は、カルサルシンおよびカルシニューリンをそれぞれ提供する工程、これらを候補モジュレーターの存在下で混合する工程、カルサルシン/カルシニューリンの結合を測定する工程、ならびに候補モジュレーターの非存在下での、カルサルシンおよびカルシニューリンのそれぞれの結合と、この結合を比較する工程を包含する。候補モジュレーターの非存在下に対する、その存在下でのカルサルシンとカルシニューリンとの結合の差異によって、それぞれ、カルシニューリンに対するカルサルシンの結合のモジュレーターとして候補モジュレーターを同定する。当業者は、

50

これを無細胞系において、またはインタクトな細胞内で行うことができることを認識している。特定の実施形態においては、インタクトな細胞は、筋細胞、H9C2細胞、C2C12細胞、3T3細胞、293細胞、新生児心筋細胞または筋管細胞である。好ましくは、この細胞は、動物中にある。モジュレーターは、カルシニューリンに対するカルサルシンの結合を増大または減少させることができるが、候補モジュレーターがカルシニューリンへのカルサルシンの結合を増大させることが好ましい。

**【0217】**

本発明の他の特定の実施形態においては、この結合は、容易に検出することができる手段によって測定される。これには、蛍光、放射活性、物理的に近い接近の検出、免疫学的検出、比色アッセイ、またはレポーター遺伝子のトランス活性化が含まれる。適用可能である場合は、カルサルシンおよび/またはカルシニューリンの両方が、蛍光アッセイのように、例えば、クエンチ可能な標識およびクエンチング剤で標識される。候補モジュレーターの存在または非存在下での結合をアッセイするためのこのような方法は、特定の実施形態においては、ツーハイブリッドアッセイの前提を利用し得る。

10

**【0218】**

(B. インビトロアッセイ)

実行が迅速で、安価かつ容易なアッセイは、結合アッセイである。標的への分子の結合は、立体的、アロステリック、または電荷-電荷相互作用に起因する、それ自体におけるそしてそれ自体の阻害であり得る。これは、溶液または固相中で行うことが可能であり、そして特定の化合物を迅速に排除するための第1回目のスクリーニングとして利用され得、その後、より洗練されたスクリーニングアッセイに移動させられ得る。この種の1つの実施形態においては、カルシニューリンもしくはカルサルシン分子またはこれらのフラグメントに結合する化合物のスクリーニングが提供される。

20

**【0219】**

標的は、溶液中で遊離であるか、支持体に固定されるか、細胞内もしくは細胞表面上で発現されるかのいずれかであり得る。支持体の例には、ニトロセルロース、カラム、またはゲルが含まれる。標的または化合物のいずれかが標識され得、それによって結合の検出が可能になり得る。別の実施形態においては、アッセイは、天然もしくは人工的な基質もしくは結合パートナー(例えば、カルサルシン)への標的の結合の阻害を測定し得る。試薬の一方(例えば、カルサルシン)が標識される、競合結合アッセイを行うことができる。通常は、標的は、標識が結合部分の機能を妨害する機会を減少させる、標識された種である。結合または結合の阻害を決定するために結合させられた標識に対する、結合していない標識の量を測定し得る。

30

**【0220】**

化合物の高スループットスクリーニングのための技術は、WO84/03564に記載されている。多数の小ペプチド試験化合物が、固体基材(例えば、プラスチックピンまたはいくつかの他の表面)上で合成される。ペプチド試験化合物は、例えば、カルサルシンと反応させられ、そして洗浄される。結合したポリペプチドは種々の方法によって検出される。

**【0221】**

精製された標的(例えば、カルシニューリン、 - アクチニン、テレットニン、カルサルシン-1、カルサルシン-2、またはカルサルシン-3)を、上記の薬物スクリーニング技術での使用のために、プレートまたは支持体上に直接コーティングすることができる。しかし、ポリペプチドに対する非中和抗体を、固相へのポリペプチドの固定のために使用することができる。また、反応性領域(好ましくは、末端領域)を含む融合タンパク質が、固相または支持体に、活性な領域(例えば、アミノ酸105~176)を連結するために使用され得る。

40

**【0222】**

従って、カルサルシンポリペプチドまたはそのフラグメントのそれぞれを支持体に付着させる工程、このポリペプチドまたはフラグメントを候補ペプチドに曝す工程、そしてこの

50

ポリペプチドまたはフラグメントへの候補ペプチドの結合をアッセイする工程による、カルサルシンに結合するペプチドを同定するための方法が、本明細書中で提供される。結合は、当該分野の任意の標準的な手段によって（例えば、放射活性、免疫学的検出、蛍光、ゲル電気泳動、または比色手段を通じて）アッセイされる。特定の実施形態においては、さらなるカルサルシンが同定される。ここでは、カルサルシンは、支持体に付着させられ、そして同様のアッセイに供される。

【0223】

(C. 細胞中 (in cyto) アッセイ)

カルサルシンを発現する種々の細胞株が、候補物質のスクリーニングに利用され得る。例えば、操作された指示物質とともにカルサルシンを含有している細胞は、候補化合物の種々の機能的特性を研究するために使用され得る。このようなアッセイでは、化合物は、その生化学的性質を考慮して、そして標的細胞と接触するように適切に処理される。

10

【0224】

アッセイに依存して、培養が必要とされ得る。上記で議論されるように、細胞は、次いで、多数の異なる生理学的アッセイ（増殖、大きさ、 $Ca^{++}$ の影響）によって試験され得る。あるいは、カルサルシンまたは関連する経路の機能が研究され得る分子分析が行われ得る。これには、タンパク質の発現、酵素の機能、基質の利用、mRNAの発現（全細胞RNAまたはポリA RNAのディファレンシャルディスプレイ）などのようなアッセイが含まれる。

【0225】

従って、本発明に従うと、機能的なカルサルシンポリペプチドを欠く細胞を提供する工程、細胞を候補物質と接触させる工程、そして細胞に対する候補物質の影響を決定する工程による、抗心筋肥大活性または抗心不全活性について候補物質をスクリーニングする方法が、本明細書中で提供される。機能的なカルサルシンポリペプチドを欠く細胞は、本明細書中で別の場所に記載されており、そして細胞株として、この細胞を含むトランスジェニック非ヒト動物から誘導され得る。この細胞は、好ましくは筋肉細胞であり、そしてカルサルシンの調節領域中に変異（例えば、欠失変異、挿入変異、または点変異）を、あるいはコード領域中に変異（例えば、欠失変異、挿入変異、フレームシフト変異、ナンセンス変異、ミスセンス変異、またはスプライシング変異）を有し得る。この細胞は、当該分野で周知の方法によってインビトロまたはインビボで接触させられ得、そして特定の実施形態においては、非ヒトトランスジェニック動物中に配置される。

20

30

【0226】

(D. インビボアッセイ)

本発明は特に、種々の動物モデルの使用を意図する。トランスジェニック動物は、カルサルシンの発現および活性が制御およびモニターされることを可能にする構築物を用いて作成され得る。これらの動物の作成は、本明細書中で別の場所で記載されている。

【0227】

これらの動物の試験化合物での処置には、動物への適切な形態の化合物の投与が含まれる。投与は、臨床的な目的または臨床以外の目的に利用され得る任意の経路（経口、鼻、頬、またはさらに局所的経路を含むがこれらに限定されない）によって行われる。あるいは、投与は、気管内点滴、気管支内点滴、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内、または静脈内注射によるものであり得る。全身的な静脈内注射、血液またはリンパの供給を介する局所投与が特に意図される。

40

【0228】

(E. ツーハイブリッドスクリーニング)

用語「ツーハイブリッドスクリーニング」は、本明細書中で使用される場合、相互作用する他のタンパク質の同定による、タンパク質の機能の解明または特徴付けのためのスクリーニングをいう。未知の機能のタンパク質（本明細書中では、「ベイト」という）は、さらにGAL4のDNA結合ドメインを含むキメラタンパク質として産生される。このキメラタンパク質を発現するヌクレオチド配列を含むプラスミドが、酵母細胞中に形質転換さ

50

れる。酵母細胞はまた、異なる潜在的な標的タンパク質をコードする異なるヌクレオチド配列に融合された GAL4 活性化ドメインを含むライブラリー由来の代表的なプラスミドを含む。ベイトタンパク質が標的タンパク質と物理的に相互作用する場合、GAL4 活性化ドメインと GAL4 DNA 結合ドメインが繋がれ、それによってレポーター遺伝子の転写を促進するように共同で作用することが可能になる。特定の細胞中でベイトタンパク質と潜在的な標的タンパク質との間での相互作用が生じない場合には、GAL4 成分は分離したままであり、そしてそれら自体でレポーター遺伝子の転写を促進することはできない。当業者は、*-*ガラクトシダーゼ、HIS3、ADE2、またはURA3を含む異なるレポーター遺伝子を利用することができることを認識している。さらに、それぞれが異なる誘導性プロモーターの制御下にある複数のレポーター配列が、GAL4 成分（従って、特異的なベイトおよび標的タンパク質）の相互作用を示すために同じ細胞中で利用され得る。当業者は、複数のレポーター配列の使用が、偽陽性の候補が得られる機会を減少させることを認識している。また、代替の DNA 結合ドメイン/活性化ドメインの成分（例えば、LexA）が使用され得る。当業者は、任意の活性化ドメインが、それらがレポーター遺伝子のトランス活性化を生じることが可能である限りは、任意の DNA 結合ドメインと対にさせられ得ることを認識している。さらに、当業者は、他の成分が存在しそして、それらが LexA 系のように、共同してレポーター遺伝子をトランス活性化させる限りは、2つの成分のいずれかが原核生物起源であり得ることを認識している。

10

## 【0229】

ツーハイブリッド実験用試薬およびその設計は、当業者に周知であり（「The Yeast Two-Hybrid System」、P. L. Bartel および S. Fields（編）（Oxford University Press, 1997を参照のこと）、系の最も更新された改良（Fashenaら、2000）が含まれる。当業者は、Clontech（Palo Alto, CA）による Matchmaker<sup>TM</sup> System または HybridZAP（登録商標）2.1 Two Hybrid System（Stratagene; La Jolla, CA）のような市販のベクター、あるいは研究社会を通じて入手することができるベクター（Yangら、1995; Jamesら、1996）を認識している。代替の実施形態においては、酵母以外の生物体（例えば、哺乳動物（Stratagene（La Jolla, CA）による Mammalian Two Hybrid Assay Kit）または E. coli（Huら、2000））がツーハイブリッド分析に使用される。

20

30

## 【0230】

代替の実施形態においては、タンパク質-タンパク質相互作用が細胞質に基づくアッセイで検出されるツーハイブリッド系が利用される。この実施形態においては、タンパク質は、細胞質中で発現され、このことは、翻訳後の変化が生じることを可能にし、または転写活性化因子およびインヒビターがスクリーニングにおいてベイトとして使用されることを可能にする。このような系の例は、Stratagene<sup>TM</sup>（La Jolla, CA）による CytoTrap（登録商標）Two-Hybrid System である。ここでは、標的タンパク質は、hSos（グアニルヌクレオチド交換因子）の酵母ホモログである cdc25 遺伝子中に温度感受性変異を含む酵母の細胞膜に繋がれる。標的へのベイトタンパク質の結合の際に、hSos は膜に局在化され、これにより、GDP/GTP 交換の促進による RAS の活性化が可能である。次いで、RAS は、変異体酵母 cdc25H の 37 での増殖を可能にするシグナル伝達カスケードを活性化する。この系についてのベクター（例えば、pMyr および pSos）および他の実験の詳細は、Stratagene（La Jolla, CA）を通じて当業者が入手することができる。（例えば、本明細書中で参考として援用されている米国特許第 5,776,689 号をもまた参照のこと）。

40

## 【0231】

従って、本発明の1つの実施形態に従うと、細胞中に、試験ペプチドをコードする DNA セグメントを含む第1の核酸（ここで、それぞれ、この試験ペプチドは DNA 結合ドメイ

50

ンに融合される)およびカルサルシンの少なくとも一部をコードするDNAセグメントを含む第2の核酸(ここで、カルサルシンの少なくとも一部は、それぞれDNA活性化ドメインに融合される)を導入する工程を包含する、カルサルシンと相互作用するペプチドをスクリーニングする方法が存在する。続いて、試験ペプチドとカルサルシンポリペプチドまたはそのフラグメントとの間での相互作用についての、DNA結合ドメインとDNA活性化ドメインとの間での相互作用をアッセイすることによるアッセイが存在する。好ましい実施形態においては、DNA結合ドメインと活性化ドメインとの間での相互作用についてのアッセイは、  
- ガラクトシダーゼの発現の活性化である。

#### 【0232】

(VII. 心臓に関係している医学的症状を処置するための方法) 10  
本明細書中で提供されるカルサルシン-1、カルサルシン-2、またはカルサルシン-3ポリペプチドは、カルシニューリンおよび  
- アクチニンに結合し、そして肥大性心筋症に関係している。カルサルシンに結合する能力は、カルサルシン-1、カルサルシン-2、またはカルサルシン-3を利用する治療を標的する機会、特に、心筋でのその高い発現レベル、骨格筋での低いレベルでの発現、および他の組織中で検出の欠乏を活用する機会を提供する。本発明によって使用される治療(例えば、シクロスポリンおよびFK506)によるカルシニューリンの活性の阻害は、免疫抑制に起因して所望されない副作用を有する。従って、当業者は、カルシニューリンの活性を調節するため、または心肥大、心不全、もしくはII型糖尿病を処置するための方法を、本明細書中で提供する。これは、そのような形態を罹患している生物体に、カルサルシンポリペプチド、またはカルサルシン 20  
ポリペプチドをコードする核酸を投与することによる。従って、好ましくは、正常な基底レベルを上回るレベルで存在するカルサルシンポリペプチドに対してそれを結合させることによるその機能または活性の妨害による、カルシニューリン活性を混乱させることが意図される。これは、カルサルシン活性を誤って局在化させそして阻害する可能性のある手段としての、カルサルシンの野生型または変異形態(例えば、ドミナントネガティブ形態)を投与することによって達成され得る。用語「ドミナントネガティブ」は、本明細書中で使用される場合には、同じ細胞中の野生型形態の機能を混乱させるカルサルシンの形態をいう。従って、カルサルシンのドミナントネガティブ形態はカルサルシンに結合して、 30  
亜細胞性の誤った局在化によるようなカルシニューリンの異常な活性を促進し得る。好ましい実施形態においては、投与されたカルサルシンは、細胞中のカルシニューリンに結合するかまたはそれを滴定し、それによって肥大性心筋症の促進のような、それに続くカルシニューリンの作用を軽減する。

#### 【0233】

特定の実施形態においては、カルサルシンポリペプチドまたはそのカルシニューリン結合フラグメントをコードする核酸は、例えば、筋特異的プロモーターを用いて、筋肉細胞中で特異的に発現される。特定の実施形態においては、カルサルシンのドミナントネガティブ形態が投与される。

#### 【0234】

他の方法においては、細胞中でのカルシニューリンによる遺伝子の転写の活性化の阻害が存在する。これは、それがその機能を発揮する場所以外の亜細胞性の領域に融合タンパク質を局在化させる標的化ペプチドに融合された、カルサルシンまたはそのカルシニューリン結合フラグメントを含有している融合タンパク質を細胞に提供することによる。カルシニューリンは、収縮性の変化を強力に感知することができ、このことは、筋節へのその局在化が、それが収縮に起因するカルシウムの変化に応答することを可能にすることを示唆している。融合タンパク質は、本明細書中の別の場所で議論されている。このような方法によって達成される遺伝子の転写は、直接的な手段によって、または上流のエフェクターの阻害を用いるように間接的に、阻害され得る。特定の実施形態においては、阻害されるカルシニューリンによる遺伝子の転写には、IL-2のようなサイトカイン、心房性ナトリウム排泄増加性因子(ANF)のような胎児の心臓病遺伝子、b型ナトリウム排泄増加性ペプチド(BNP)、  
- 主要組織適合性複合体(MHC)、および  
- 骨格アクチン 40  
50

をコードする遺伝子が含まれるがこれらに限定されない。上記で議論されている N F A T 活性化の基本的なモデルは、多くの細胞型中でのカルシニューリンを介する  $Ca^{2+}$  シグナルの伝達、およびそれぞれの細胞環境に特有の異なるセットの標的遺伝子の転写の制御を示す ( Timmerman ら、1996 )。

【0235】

特定の実施形態においては、伝統的な薬物または化合物を用いる治療が、本明細書に記載されている方法に加えて利用される。これには、イオノトロープ ( ionotropes )、 $\beta$ -ブロッカー、不整脈治療薬、利尿剤、血管拡張剤、ホルモンアンタゴニスト、エンドセリンアンタゴニスト、アンジオテンシン2型アンタゴニスト、およびサイトカインインヒビター/ブロッカーからなる群より選択される化合物の動物への投与が含まれる。

10

【0236】

( X . 実施例 )

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を実証するために含まれる。以下の実施例に開示される技術は、本発明の実施において十分に機能することが本発明者らによって発見された技術を示し、従って、その実施のための好ましい様式を構成すると考えることができることが、当業者に理解されるはずである。しかし、当業者は、本発明の開示を参照して、開示される特定の実施形態において多くの変更を行うことが可能であり、そしてなお本発明の精神および範囲を逸脱することなく同様または類似の結果を得ることができることを理解すべきである。

【0237】

20

( 実施例 1 )

( 材料および方法 )

酵母のツーハイブリッドスクリーニング。GAL4 DNA結合ドメインに融合させた全長のマウス CnA - cDNA を、以前に記載されているように ( Molkentin ら、1998 )、ヒトの心臓の cDNA ライブラリー ( Clontech ) の約  $1.5 \times 10^6$  個のクローンのツーハイブリッドスクリーニングにおいておとりとして使用した。このスクリーニングによって、本発明者らは、カルサルシン - 1 をコードする cDNA を同定した。同じ cDNA ライブラリーのさらなるツーハイブリッドスクリーニングを、カルサルシン - 1 およびカルサルシン - 2 をおとりとして使用して行った。

【0238】

30

ノーザンブロット分析。ヒトおよびマウスの多組織由来の RNA ( Clontech )、ならびに C2C12 細胞抽出物由来の RNA のノーザンブロットを、記載されているように行った ( Spencer ら、2000 )。

【0239】

カルサルシン抗血清の作製およびウェスタンブロット。ウサギの抗血清を、GST とインフレームで融合させたカルサルシン - 1 のオープンリーディングフレーム全体に対して作製した。IgG をウサギの血清から精製し、そしてウェスタンブロットティングおよび免疫染色に使用した。

【0240】

放射活性インサイチュハイブリダイゼーション。カルサルシン - 1 およびカルサルシン - 2 cDNA のセンス鎖およびアンチセンス鎖に対応する RNA プローブを、T7 および T3 RNA ポリメラーゼ ( Roche ) および  $^{35}S$  標識 UTP を使用して調製した。マウスの胚および生体の後肢の切片を、以前に記載されているようにインサイチュハイブリダイゼーションに供した ( Lu ら、1998 )。

40

【0241】

細胞培養、トランスフェクション、および免疫沈降。Cos-7 細胞を、10% の FBS を含有している DMEM 中で維持した。  $2 \times 10^5$  個の細胞を、カルサルシン - 1 およびカルサルシン - 2、CnA、および  $\beta$ -アクトニン - 2 の全長形態および短縮型の  $1 \mu g$  の発現プラスミドで、FuGENE 6 試薬 ( Roche ) を使用してトランスフェクトした。カルサルシンペプチドを、N末端の HA エピトープまたは C末端の Myc エピトープ

50

ブと融合し、 $\alpha$ -アクチニン-2をN末端のMycエピトープまたはFLAGエピトープと融合し、そしてCnA構築物を、N末端のFLAGエピトープと融合した。トランスフェクションの48時間後、細胞を、50mMのHepes(pH7.0)、250mMのNaCl、5mMのEDTA、1mMのDTT、1mMのPMSF、およびプロテアーゼインヒビター(Complete; Roche)を含有しているELB緩衝液中に回収した。細胞を軽く超音波処理し、そして破片を遠心分離によって除去した、タグ化タンパク質を、プロテインA/Bアガロースおよび1 $\mu$ gの適切な抗体(モノクローナル抗FLAG、モノクローナル抗Myc、およびポリクローナル抗Myc)を使用して2~3時間4で免疫沈降させた。続いて、ペレットをELB緩衝液で洗浄し、そしてSDS-PAGEに供し、ポリビニリデン膜に移し、そしてそれぞれ、抗FLAG、抗Myc、または抗HA抗体を使用してイムノプロットした。

10

## 【0242】

免疫染色。カルサルシン-1、 $\alpha$ -アクチニン、およびCnAの細胞性局在化を、記載されているように(Molkentinら、1998)回収しそして維持した新生児ラットの心筋細胞中で決定した。免疫染色を、記載されているように行った(Spencerら、2000)。以下の抗体を使用した:それぞれ、テキサスレッドおよびFITCで標識(Vector Labs)した、抗カルサルシン-1、抗筋節 $\alpha$ -アクチニン(Sigma)、抗CnA(Sigma、Transduction Laboratories, Santa Cruz); 2次抗体; 抗マウス/ウサギ。マウスの心臓および骨格筋の細胞切片を、3.7%のホルマリン中で3分間固定し、0.3%のTriton X-100で5分間浸透させ、続いて上記に記載したように染色した。

20

## 【0243】

カルサルシン-1相互作用ドメインのマッピング。カルサルシン-1のいくつかのN末端およびC末端短縮型を、ベクターpAS1中のGAL4 DNA結合ドメインとインフレームで融合させた。CnAおよび $\alpha$ -アクチニンを、ツーハイブリッドベクターpACT2中のGAL4トランス活性化ドメインと融合させた。全長のCnAおよび構成的に活性なCnAの両方が、単独でトランスフェクトされた場合にバックグラウンドの $\alpha$ -ガラクトシダーゼ活性を示したので、酵素活性を欠失している変異型CnA(Shibasakiraら、1996)を続く実験で使用し、そしてこれはバックグラウンドのシグナルを全く示さなかった。カルサルシン-1構築物をCnA、 $\alpha$ -アクチニン、またはpACT2(ネガティブコントロールとして)とともに形質転換し、そして適切な選択培地上で3日間増殖させた。 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ活性を、記載されているような(FieldsおよびSong、1989)フィルター-リフトアッセイを用いて決定し、そして1~4時間モニターした。いくつかのカルサルシン-1のC末端短縮型が、pACT2とともに同時形質転換した場合に $\alpha$ -ガラクトシダーゼ活性を示したので、相補性同時免疫沈降実験を、CnAおよび $\alpha$ -アクチニンについてのカルサルシンの相互作用ドメインをさらに明確にするために上記に記載したように行った。

30

## 【0244】

(実施例2)

(カルシニューリン関連タンパク質の同定)

40

カルシニューリン(そして好ましくは、これは、心臓特異的である)に関係しているタンパク質を同定するために、マウスの心臓のcDNAライブラリーによってコードされるタンパク質についてのツーハイブリッド分析を酵母中に行った。特定の実施形態においては、カルシニューリンの触媒領域を酵母のGAL4のDNA結合ドメインに融合した。これらのスクリーニングによって、カルシニューリンと会合する筋特異的カルシニューリン関連タンパク質(カルサルシン)-1を同定した。続く哺乳動物細胞中での実験によって、カルサルシン-1とカルシニューリンとがインピボで複合体を形成することができることが示された(以下の実施例を参照のこと)。

## 【0245】

マウスのカルサルシン-1 cDNA配列を用いて、公開されている発現された配列タグ

50

(EST)データベースを検索することによって、ヒトのカルサルシン - 1 cDNA クローン、ならびに関連する遺伝子であるカルサルシン - 2 およびカルサルシン - 3 についてのヒトおよびマウスの配列を同定した。当業者は、タンパク質および核酸配列の両方のそのような検索のために利用可能なデータベース (GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankSearch.html>) または商業的に入手することができるデータベース (Celera Genomics, Inc.; Rockville, MD; [www.celera.com](http://www.celera.com)) を含む) を認識している。カルサルシン - 1 ~ 3 のアラインメントを図 13 に示す。

**【0246】**

ヒトのカルサルシン - 1 の予想されるアミノ酸配列 (図 1A)、マウスのカルサルシン - 1 の予想されるアミノ酸配列 (図 1B)、ヒトのカルサルシン - 2 の予想されるアミノ酸配列 (図 1C)、およびマウスのカルサルシン - 2 の予想されるアミノ酸配列 (図 1D) を、マウスのタンパク質のアミノ酸アラインメント (図 1E) とともに示す。ヒトのカルサルシン - 1 の DNA 配列 (図 2A)、マウスのカルサルシン - 1 の DNA 配列 (図 2B)、ヒトのカルサルシン - 2 の DNA 配列 (図 2C)、およびマウスのカルサルシン - 2 の DNA 配列 (図 2D) もまた提供する。カルサルシン - 1 およびカルサルシン - 2 は、それらのアミノ末端およびカルボキシ末端近くで最も高い相同性を示すが、間のアミノ酸はあまり十分には保存されていない。両方のタンパク質配列を用いた BLAST 検索によっては、既知のタンパク質に対する有意な相同性は全く明らかにならなかった。

**【0247】**

カルサルシン - 2 を、カルサルシン - 1 の配列を用いた EST データベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html>) の検索によって同定した。3 個のマウスのカルサルシン - 2 EST を同定した: GenBank 登録番号 (AA036142、AW742494、W29466)。さらに、4 個のヒトのカルサルシン - 2 EST を同定した: GenBank 登録番号 (AW964108、AA197193、AW000988、AA176945)。マウスのカルサルシン - 2 EST は以下である: GenBank 番号 AA036142; GenBank 番号 AW742494; および GenBank 番号 W29466。ヒトのカルサルシン - 2 EST は以下である: GenBank 番号 AW964108; GenBank 番号 AA197193; GenBank 番号 AW000988; および GenBank No. AA176945。

**【0248】**

カルサルシン - 3 を、カルサルシン - 1 およびカルサルシン - 2 の配列のデータベースとの比較によって「インシリコ (in silico)」で発見した。いくつかの相同配列を含有しているヒトのゲノム DNA (AC008453.3; 公開されていない Celera データベース) を、カルサルシン - 3 のエキソンであると確認した。プライマーを設計し、そしてヒトの骨格筋ライブラリーで、ヒトのカルサルシン - 3 の全長の cDNA をスクリーニングした (図 5)。同様に、マウスの骨格筋のライブラリーをスクリーニングし、そしてマウスのカルサルシン - 3 をコードしているいくつかの独立しそして重複しているクローンを同定した。

**【0249】**

ツーハイブリッド実験用試薬および設計は、本明細書中で別の場所で詳細に議論する。代替の実施形態では、酵母のワンハイブリッドシステム (Vidal および Legrain、1999; Sieweke、2000) を、カルサルシンの核酸配列との相互作用を決定するために利用するか、またはスリーハイブリッドシステムを、インビボで RNA - タンパク質の相互作用を検出するために利用する (Sengupta ら、1996)。

**【0250】**

他の実施形態では、当該分野で周知の他の方法を、カルシニューリンと相互作用するタンパク質またはペプチドを同定するために利用する。例えば、カルサルシンの標識された形態を、当該分野の標準的な手段によって作製し、可能性のある相互作用の候補のプールを

10

20

30

40

50

標識されたカルシニューリンに対して暴露し、そして得られた相互作用を同定する。あるいは、標識されていない形態のカルシニューリンが標識された候補に対して暴露され、そして標識されていないカルシニューリンへの暴露後に、得られた標識された相互作用因子の候補を特定する。代替の特定の実施形態においては、標識されていない形態のカルシニューリンを、例えば、細胞抽出物中に存在する、 $^{35}\text{S}$  標識メチオニンによる  $^{35}\text{S}$  標識タンパク質に対して暴露する。標識された相互作用因子の候補を単離し、そして例えば、Sanger 配列決定法によって同定する。別の実施形態においては、免疫沈降を、当該分野で周知の手段によって行う。ここでは、カルシニューリンに対する抗体は、候補の相互作用因子の供給源とともにインキュベートされ、そして抗体は、この抗体が結合するカルシニューリンの形態と相互作用する任意の遺伝子産物を単離するかまたは「引っ張り出す」ように作用する。当業者は、タンパク質-タンパク質相互作用に関する本明細書中に記載された方法が、任意のタンパク質またはポリペプチド（全てのカルシニューリンを含む）に対して同様に適用されることを認識している。タンパク質-タンパク質相互作用を決定するための他の方法は、当該分野で周知である。

10

#### 【0251】

従って、ツーハイブリッドシステムに加えて、タンパク質の相互作用を分析するためのさらなる方法には、本明細書中で他の場所でその免疫学的形態で記載される、相互作用の捕捉、親和性精製、ファージに基づく発現クローニング（相互作用クローニングとも呼ばれる）、表面プラズモン共鳴、および同時沈降が含まれる。

#### 【0252】

相互作用の捕捉（相互作用因子の捕獲とも呼ばれる）においては、酵母株は、2つの *LexA* オペレーター応答性レポーターを含む：染色体に組み込まれた *LEU2* 遺伝子、およびプラスミドが保有している *GAL1* プロモーター-*lacZ* 融合遺伝子。さらにこの株は、*LexA* DNA 結合ドメインおよび目的のタンパク質を含有している構成的に発現されるキメラタンパク質を含む。これは、レポーター遺伝子を別々に活性化することはできない。誘導性の酵母 *GAL1* プロモーターは、酵母中に導入された活性化ドメインに融合された *cDNA* ライブラリーの発現を駆動する。形質転換された酵母の、ロイシンをもまた欠失しているガラクトースを含有している培地上へのプレーティングによって、ライブラリーの発現を誘導する。おとりタンパク質の候補の標的タンパク質との相互作用が生じる場合、*LEU2* が発現され、そしてコロニーの増殖が可能となる。レポーター遺伝子の発現を、*X-gal* を含有している培地上へのプレーティングで確認する。

20

30

#### 【0253】

親和性精製（*GST* プルダウン精製としてもまた公知である）は、グルタチオン-アガロースビーズに結合されたグルタチオン-S-トランスフェラーゼ（*GST*）に融合されたタンパク質を利用する。候補の相互作用因子タンパク質（これは標識されるかまたは精製される場合がある）に対するビーズの暴露には、次の洗浄が続く。保持されている候補の相互作用因子タンパク質の量を、ビーズ/結合したタンパク質を *SDS*-ポリアクリルアミド電気泳動に供するか、またはグルタチオンもしくは塩で溶出するかのいずれかによって決定する。候補の相互作用因子タンパク質の特定の実施形態が公知であるが、この方法はまた、候補の相互作用因子タンパク質に対する抗体を使用するような、他の技術または試薬と組合せて行われる場合には、タンパク質の複雑な混合物（例えば、粗細胞溶解物）を試験するために使用することもできる。

40

#### 【0254】

相互作用クローニング（発現クローニングとも呼ばれる）においては、おとりタンパク質（目的のタンパク質）および適切な発現ライブラリーをコードする核酸（例えば、心臓または筋肉組織由来）は、*gt11* のようなバクテリオファージ発現ベクター中に存在する。特定の実施形態においては、融合タンパク質は、おとりタンパク質および *GST* から構成されるが、環状アデノシン  $3'$ ,  $5'$ -ホスフェート（*cAMP*）依存性プロテインキナーゼ A（*PKA*）部位の認識部位をもまたそれらの間に含む。*cDNA* を、 $^{32}\text{P}$  で放射標識する。おとり融合タンパク質を、*PKA* および（ $^{32}\text{P}$ ）*ATP* によって酵

50

素的にリン酸化する。標識したプローブを、インフレイムで遺伝子融合体を含有している  
 - ガラクトシダーゼ融合タンパク質を発現する、バクテリオファージ由来 cDNA 発  
 現ライブラリーをスクリーニングするために利用する。融合タンパク質を、ファージおよ  
 びプラークの形成による細胞の溶解後に、ニトロセルロース膜上に吸着させる。相互作用  
 因子のクローンを、例えば、オートラジオグラフィによって視覚化する。

#### 【0255】

表面プラズモン共鳴 (SPR) を、特定の相互作用する可能性のある分析物とともに相互  
 作用を決定するために利用する。従って、特定のタンパク質が目的のタンパク質と相互作  
 用すると予想される場合には、これを最も良く使用する。表面プラズモン共鳴においては  
 、タンパク質を連続的に流れている緩衝液に対して曝されるチップ上に固定する。潜在的  
 な結合分析物を含有しているサンプルの「プラグ」を、タンパク質の表面上を連続して流  
 す場合には、緩衝液の流れを遮断する。SPR デバイス上の感知装置 (例えば、BIAc  
 ore 機器) によって、目的のタンパク質と相互作用する可能性のある分析物の会合の際  
 に生じる界面からの最少反射角の変化を検出する。従って、分子の相互作用の視覚化は、  
 コンピューターモニター上で見られるように、実時間で生じる。

10

#### 【0256】

(実施例 3)

(カルシニューリン関連タンパク質をコードする核酸の発現)

カルシニューリン - 1 およびカルシニューリン - 2 がどの組織中で発現されるかを決定す  
 るために、ノーザン分析を行った。図 3 では、示したマウス組織由来のポリ A + RNA を  
 、当該分野で周知の方法によって、カルシニューリン - 1 およびカルシニューリン - 2 転  
 写物の発現について分析した。データは、カルサルシン - 1 およびカルシニューリン - 2  
 について、多くの平行に走る、筋特異的発現パターンを示す。カルサルシン - 1 は、心臓  
 および骨格筋で特異的に発現され、ヒト組織中では 1.6 kb および 2.6 kb の 2 つの  
 mRNA があり、そしてマウス中には 1.3 kb の単一の転写物のみが存在する。カルサ  
 ルシン - 1 のかすかな発現もまた、マウスの肺および肝臓で検出した。1.6 kb および  
 1.3 kb のカルサルシン - 2 転写物を、成体のヒトおよびマウスの骨格筋中だけでそれ  
 ぞれ検出した。ヒトとマウスの骨格筋との間でのカルサルシン - 1 の発現レベルの相対的  
 な差異は、速い単収縮繊維組成物に対する遅い単収縮繊維組成物中での差異を反映し得る  
 。

20

30

#### 【0257】

特定の実施形態においては、カルサルシン - 3 の発現パターンを、類似の方法によって決  
 定した (図 9)。RNA を分析するための方法は周知である。簡潔には、RNA を、標準  
 的な技術を使用して目的の組織から単離し、続いてアガロースゲル上で分画し、膜に移し  
 、そして膜に架橋した。標識プローブを膜にハイブリダイズさせ、そしてハイブリダイゼ  
 ーションを検出する。

#### 【0258】

骨格筋の肥大症および遅い繊維遺伝子の発現の調節におけるカルシニューリンの重要な役  
 割を仮定すると、カルサルシン - 2 は骨格筋の機能の調節において重要な役割を果たすよ  
 うである。

40

#### 【0259】

(実施例 4)

(カルシニューリン関連タンパク質をコードする核酸の発現の局在化、ならびに骨格筋中  
 のカルサルシン - 1 およびカルサルシン - 2 の繊維型特異性)

時間的および空間的なカルサルシン - 1 の発現パターンを特徴付けるために、インサイチ  
 ュハイブリダイゼーションを行った。胚日齢 (E) 9.5 では、比較的弱いカルサルシン  
 - 1 の発現が心臓中で観察されたが、E 12.5 および E 15.5 では、強いシグナルを  
 、心筋組織および骨格筋組織の両方で検出した。対照的に、カルサルシン - 2 でプローブ  
 した同じ胚に由来する隣接する切片は、E 9.5 で有意な心臓での発現を示し、これは E  
 12.5 でもなお検出可能であった。舌の骨格筋中でのカルサルシン - 2 の低レベルの発

50

現はまた、この段階でも見ることができた。E15.5では、カルサルシン - 2の心臓での発現はダウンレギュレートされ、そして心房中のごく弱く検出されたが、骨格筋での発現はより強くなった。全ての心臓のチャンパー中でのカルサルシン - 1の発現は、成体期まで維持された(図4B)。従って、カルサルシン - 1は、全ての平行して走っている筋組織中で発達の間中発現されるが、カルサルシン - 2は初期の胚形成の間は心臓中で一時的に発現され、そして後期には骨格筋に限定されるようになる。

#### 【0260】

当業者は、組織のインサイチュハイブリダイゼーション(Ausubelら、1994)(例えば、蛍光インサイチュハイブリダイゼーション(FISH))を使用することによる核酸の発現を決定するための標準的な方法を認識している。インサイチュハイブリダイゼーションのために、特異的に標識した核酸プローブを、それぞれの細胞性の核酸(例えば、サンプル(例えば、組織切片または個々の細胞)中のRNA)にハイブリダイズさせる。特定の実施形態においては、サンプルを適切な時間固定し、そして段階的なエタノール系列を通して脱水する。次いで、サンプルをパラフィンワックス中に含浸させ、ブロックに鑄造し、そしてマイクローム上で切片にした。特異的に標識したプローブを、例えば、ピオチン、ジゴキシゲニンを用いて、または蛍光色素タグ化デオキシヌクレオチドを用いて調製した。次に、プローブをサンプルにハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション条件は、標識プローブおよび試験するサンプルの性質に依存して変化し得る。特定の実施形態においては、ハイブリダイゼーション後、サンプルを37の50%のホルムアミド/2×SSC中で37で15分間、2×SSC中で37で15分間、そして室温の1×SSC中で15分間洗浄した。スライドを、4×SSC中で5分間、室温で平衡化させた。スライドの水気を切り、そして風乾させた。次に、検出溶液を添加した。検出溶液中での45分のインキュベーション後、スライドを洗浄した。DAPIまたはヨウ化プロピジウム染色溶液のような対比染色を、このスライドに添加した。スライドを、蛍光顕微鏡を使用して観察した。

10

20

#### 【0261】

他の実施形態においては、他のカルサルシンでのインサイチュハイブリダイゼーションを同様に行う。当業者は、代替の実施形態においては、ポリペプチドまたはタンパク質の免疫組織化学的局在化を、垂細胞性のまたは組織内の特定の細胞型へのその局在化を決定するために使用する。別の実施形態においては、インサイチュハイブリダイゼーションおよび免疫組織化学的局在化を、細胞または組織内での局在化を決定することと組合せて使用し、それによって問題のペプチドまたはタンパク質の機能の性質に関する情報を提供する。

30

#### 【0262】

カルサルシンが骨格筋で発現の繊維型特異性を示し得るかどうかを決定するために、本発明者らは、カルサルシン - 1およびカルサルシン - 2プローブを使用して、成体のマウスの後肢の切片を用いてインサイチュハイブリダイゼーションを行った(図4C)。カルサルシン - 1の発現は、ヒラメ筋および足底筋に局在化し、これは主に遅い単収縮繊維を含む。対照的に、カルサルシン - 2の発現は、腓腹筋中で豊富であり、これは主に、速い単収縮筋型である。

40

#### 【0263】

種々の組織抽出物のカルサルシン - 1抗血清を使用するウェスタンブロットは、心臓およびヒラメ筋中で単一の32kDaのタンパク質を明らかにした(図4D)。肝臓または他の筋肉以外の組織では発現は検出されなかった。カルサルシン - 1抗血清は、トランスフェクトしたCos細胞由来の抽出物中では組換えカルサルシン - 2を認識しなかった。このことは、抗血清の有意な交差反応性がないことを示す(データは示さない)。ごくわずかなカルサルシン - 1タンパク質の発現を、腓腹筋由来の抽出物中で検出することができた(図4D)。これによって、カルシニューリン - 1の遅い繊維に限定された発現が確認された。

#### 【0264】

50

カルサルシン - 1 転写物は、増殖している筋芽細胞の分化培地への移動後の C 2 骨格筋細胞株の分化の間にアップレギュレートされた ( 図 3 E ) 。対照的に、カルサルシン - 2 の発現は、C 2 細胞中では検出されなかった。

【 0 2 6 5 】

( 実施例 5 )

( カルサルシン - 1 および  $\alpha$  - アクチニンの共局在 )

カルサルシン - 1 および  $\alpha$  - アクチニンが相互作用することを示すツ-ハイブリッド実験を考慮して、2つの遺伝子産物の共局在を試験した。カルサルシン - 1 の垂細胞性の局在を、新生児ラットの心筋細胞、ならびに成体のマウスの心臓および骨格筋の凍結切片の免疫染色によって決定した。図 5 に示すように、カルサルシンの染色は、新生児の心筋細胞の筋節に局在化され、そして z 線の特異的に標示する  $\alpha$  - アクチニンの染色と重複した。同様の染色パターンを、成体のマウスの心臓および骨格筋の切片において観察した。興味深いことに、アミノ酸 2 4 7 ~ 4 4 9 に対する抗体 ( Transductions Laboratories ) で検出したカルシニューリンもまた、z 線に共局在化し、このことは、酵素の筋特異的垂細胞性局在化を示している。後者の知見を、2次 C n A 抗体 ( Sigma ) によって確認した。C n A 染色もまた核内で検出され、これは、カルシニューリンもまた他の垂細胞性領域に局在化されることを示唆している。別の実施形態においては、同様の実験を、 $\alpha$  - アクチニンのようなポリペプチドとの共局在を試験するために、カルサルシン - 2 抗体またはカルサルシン - 3 抗体を用いて行う ( 図 1 1 ) 。さらに、C 2 C 1 2 筋芽細胞中でのカルサルシン - 1 の過剰発現が、初期 ( 分化の 1 日後 ) に生じ、そして筋節の形成を増進した ( 図 1 2 ) 。

【 0 2 6 6 】

( 実施例 6 )

( カルシニューリン関連タンパク質と相互作用するタンパク質の同定 )

カルサルシン - 1 の機能をさらに理解するために、実施例 1 および本明細書中で別の場所に記載した方法と同様に、これを、筋肉の c D N A ライブラリーのツ-ハイブリッドスクリーニングにおいてベイトとして使用した。このスクリーニングによって、 $\alpha$  - アクチニンの一部をコードする多数の別々の c D N A を同定した。特定な実施形態においては、カルサルシン - 2 および / またはカルサルシン - 3 を、カルサルシン - 2 またはカルサルシン - 3 と相互作用するポリペプチドを検出するための同様の方法においてそれぞれベイトとして使用する。 $\alpha$  - アクチニンは、通常は、筋節の Z 線条に関係している。

【 0 2 6 7 】

カルサルシン - 1 および  $\alpha$  - 2 の  $\alpha$  - アクチニンとの会合を、トランスフェクトした C o s 細胞中のエピト-プタグ化タンパク質、および新生児の心筋細胞由来の天然のタンパク質の同時免疫沈降によってさらに試験した。図 6 A に示すように、C 末端の M y c タグ化カルサルシン - 1 は、F L A G タグ化 C n A および  $\alpha$  - アクチニンを免疫沈降させた。カルシニューリンの触媒活性は、触媒的に不活性な C n A 変異体を免疫沈降させるカルサルシン - 1 の能力によって示されるように、カルサルシンの相互作用には必要ではない。M y c タグ化  $\alpha$  - アクチニン、H A タグ化カルサルシン、および F L A G タグ化カルシニューリンでの三重免疫沈降アプローチ ( 図 6 B ) を使用して、本発明者らは、C n A だけがカルサルシン - 1 の存在下で M y c -  $\alpha$  - アクチニンによって沈降させられ得ることを示した。これは、三量体複合体を示している。さらに、 $\alpha$  - アクチニンはまた、心筋細胞抽出物由来の天然のカルサルシン - 1 で同時免疫沈降させられ得た ( 図 6 C ) 。さらに、カルサルシン 1 ~ 3 は、図 1 0 に示すように、筋節タンパク質のテレトニンとともに同時免疫沈降した。テレトニンは、肢帯の筋ジストロフィーに関係している疾患遺伝子であり、そして心筋および骨格筋の両方で平行して走る筋肉の攣縮応答において役割を果たし得る。

【 0 2 6 8 】

( 実施例 7 )

(  $\alpha$  - アクチニンとのカルサルシン - 1 の相互作用のためのドメインの同定 )

カルサルシン - 1 の N 末端および C 末端短縮型を、C n A および - アクチニン相互作用ドメインを特徴付けるために使用した。酵母のツーハイブリッドアッセイおよび補体免疫沈降実験によって、アミノ酸 153 ~ 200 が - アクチニンとのカルサルシンの相互作用に必要であることを明らかにした (図 7)。この領域の 27 個の残基は、マウスおよびヒトのカルサルシン - 1 および - 2 の間で高度に保存されており、このことは、この領域が最少相互作用ドメインを構成し得ることを示唆している。アミノ酸 245 ~ 250 の間のモチーフは、N F A T ( P x I x I T ) および M C I P ( P x I x x I T ) 上の既知のカルシニューリンドッキング部位と似ているので、本発明者らは、これらの残基の両方を欠失している C 末端短縮型を試験した。しかし、これらのアミノ酸を欠失しているカルサルシンはなおも、ツーハイブリッドアッセイ ( G A L 4 - カルサルシン 85 ~ 240 ) および同時免疫沈降 ( M y c - カルサルシン 1 ~ 240 ) の両方によって結合することが可能であった。対照的に、残基 217 ~ 264 を欠失しているカルサルシン - 1 変異体は、C n A に結合することができず、このことは、残基 217 ~ 240 が結合に不可欠であることを意味している。C n A 上への相互作用ドメインのマッピングは、カルサルシン相互作用ドメインが触媒領域中にあることを明らかにしたが、 - アクチニンのカルサルシン - 1 相互作用ドメインは、第 2 および第 3 のスペクトリン様反復にマップされる。

10

## 【 0 2 6 9 】

特定の実施形態においては、同様の実験を、タンパク質結合を用いる相互作用のためのカルサルシンドメインの同定において、他のカルサルシンを用いて行う。

## 【 0 2 7 0 】

20

## ( 実施例 8 )

( 心筋症および筋ジストロフィーにおけるカルシニューリン関連タンパク質の有意性 )  
インビボでのそれらの相互作用および共局在に基づいて、カルサルシン - 1 が Z 線条に対してカルシニューリンと連結し、ここではこれは、筋細胞におけるカルシウムのシグナル伝達における変化を意味し得、そして肥大性シグナルを伝達する可能性があり得ることを、本明細書中で提案する ( 図 8 )。カルサルシン - 1 および / または他のカルサルシントタンパク質 ( 例えば、カルサルシン - 2 またはカルサルシン - 3 ) はまた、Z 線条の調節および細胞中の他のタンパク質とのその会合を通じて、心筋細胞および骨格筋細胞中で構造的小および / または機械的感覚的役割を果たし得る。Z 線条は、筋肉細胞の構造および機能の調節において重要な役割を果たすことが示されている。従って、カルサルシン - 1 はおそらく、これらのプロセスに親密に関係しており、そしてヒトの心筋症および筋ジストロフィーに関係している遺伝子についての有力な候補である。

30

## 【 0 2 7 1 】

## ( 参考文献 )

以下の参考文献は、それらが本明細書中に示されているものについて補充する、例示的手順のまたは他の詳細を提供する程度に、本明細書中で参考として詳細に援用されている。

## 【 0 2 7 2 】

## 【 表 4 】

米国特許第 4,196,265 号、April 1, 1980 発行  
米国特許第 4,554,101 号、November 19, 1985 発行  
米国特許第 4,683,195 号、July 28, 1987 発行  
米国特許第 4,683,202 号、July 28, 1987 発行  
米国特許第 4,800,159 号、January 24, 1989 発行  
米国特許第 4,873,191 号、October 10, 1989 発行  
米国特許第 4,883,750 号、November 28, 1989 発行  
米国特許第 5,279,721 号、January 18, 1994 発行  
米国特許第 5,354,855 号、October 11, 1994 発行  
米国特許第 5,776,689 号、July 7, 1998 発行  
EPO 0273085, July 6, 1988 発行  
WO 84/03564, September 13, 1984 発行  
WO 90/07641 December 21, 1990 出願

10

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (eds.) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc. (1994).

Barany, G. and Merrifield, R.B. A chromatographic method for the quantitative analysis of the deprotection of dithiasuccinoyl (Dts) amino acids. Anal. Biochem. May;95(1):160-70 (1979).

Barnes KV, Cheng G, Dawson MM, Menick DR. Cloning of cardiac, kidney, and brain promoters of the feline *ncx1* gene. J Biol Chem. Apr 25;272(17):11510-7 (1997).

20

Baron MD, Davison MD, Jones P, Patel B, Critchley DR. Isolation and characterization of a cDNA encoding a chick alpha-actinin. J Biol Chem. Feb 25;262(6):2558-61 (1987).

Barski OA, Gabbay KH, Bohren KM. Characterization of the human aldehyde reductase gene and promoter. Genomics 60(2):188-98 (1999).

Beggs AH, Byers TJ, Knoll JH, Boyce FM, Bruns GA, Kunkel LM. Cloning and characterization of two human skeletal muscle alpha-actinin genes located on chromosomes 1 and 11. *J Biol Chem.* May 5;267(13):9281-8 (1992).

Bennett JP, Zaner KS, Stossel TP. Isolation and some properties of macrophage alpha-actinin: evidence that it is not an actin gelling protein. *Biochemistry.* Oct 9;23(21):5081-6 (1984).

Bhavsar PK, Brand NJ, Yacoub MH, Barton PJR. Isolation and characterization of the human cardiac troponin I gene (TNNI3). *Genomics.* Jul 1;35(1):11-23 (1996).

Burridge K, Feramisco JR. Microinjection and localization of a 130K protein in living fibroblasts: a relationship to actin and fibronectin. *Cell.* Mar;19(3):587-95 (1980).

10

Capaldi RA, Bell RL, Branchek T. Changes in order of migration of polypeptides in complex III and cytochrome C oxidase under different conditions of SDS polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochem Biophys Res Commun.* Jan 24;74(2):425-33 (1977).

Chin ER, Olson EN, Richardson JA, Yang Q, Humphries C, Shelton JM, Wu H, Zhu W, Bassel-Duby R, Williams RS. A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev.* Aug 15;12(16):2499-509 (1998).

Crabtree GR. Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca<sup>2+</sup>, calcineurin, and NF-AT. *Cell.* Mar 5;96(5):611-4 (1999).

20

de Arruda MV, Watson S, Lin CS, Leavitt J, Matsudaira P. Fimbrin is a homologue of the cytoplasmic phosphoprotein plastin and has domains homologous with calmodulin and actin gelation proteins. *J Cell Biol.* Sep;111(3):1069-79 (1990).

Ding B, Price RL, Borg TK, Weinberg EO, Halloran PF, Lorell BH. Pressure overload induces severe hypertrophy in mice treated with cyclosporine, an inhibitor of calcineurin. *Circ Res.* Apr 2;84(6):729-34 (1999).

Duhaiman AS, Bamberg JR. Isolation of brain alpha-actinin. Its characterization and a comparison of its properties with those of muscle alpha-actinins. *Biochemistry.* Apr 10;23(8):1600-8 (1984).

30

Dunn SE, Burns JL, Michel RN. Calcineurin is required for skeletal muscle hypertrophy. *J Biol Chem.* Jul 30;274(31):21908-12 (1999).

Fashena SJ, Serebriiskii I, Golemis EA. The continued evolution of two-hybrid screening approaches in yeast: how to outwit different preys with different baits. *Gene* 2000 May 30;250(1-2):1-14

Fields, S & Song, O. *Nature* 340:245-247 (1989).

Forster AC, Symons RH. Self-cleavage of virusoid RNA is performed by the proposed 55-nucleotide active site. *Cell.* Jul 3;50(1):9-16 (1987).

Franz WM, Brem G, Katus HA, Klingel K, Hofschneider PH, Kandolf R. Characterization of a cardiac-selective and developmentally upregulated promoter in transgenic mice. *Cardioscience.* Dec;5(4):235-43 (1994).

Fyrberg C, Ketchum A, Ball E, Fyrberg E. Characterization of lethal *Drosophila melanogaster* alpha-actinin mutants. *Biochem Genet.* Oct;36(9-10):299-310 (1998).

Gopal-Srivastava R, Haynes II 2nd, Piatigorsky J. Regulation of the murine alpha B-crystallin/small heat shock protein gene in cardiac muscle. *Mol Cell Biol.* Dec;15(12):7081-90 (1995).

Graef IA, Mermelstein PG, Stankunas K, Neilson JR, Deisseroth K, Tsien RW, Crabtree GR. L-type calcium channels and GSK-3 regulate the activity of NF-ATc4 in hippocampal neurons. *Nature.* Oct 14;401(6754):703-8 (1999).

Harlow, E. *Using antibodies: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999, 495 pp.

Hill JA, Karimi M, Kutschke W, Davisson RL, Zimmerman K, Wang Z, Kerber RE, Weiss RM. Cardiac hypertrophy is not a required compensatory response to short-term pressure overload. *Circulation.* 2000 Jun 20;101(24):2863-9.

Ho IC, Hodge MR, Rooney JW, Glimcher LH. The proto-oncogene c-maf is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4. *Cell.* Jun 28;85(7):973-83 (1996).

10

20

30

Izumo S, Aoki H. Calcineurin--the missing link in cardiac hypertrophy. *Nat Med.* Jun;4(6):661-2 (1998).

James P, Halladay J, Craig EA. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 1996 Dec;144(4):1425-36.

Kashishian A, Howard M, Loh C, Gallatin WM, Hoekstra MF, Lai Y. AKAP79 inhibits calcineurin through a site distinct from the immunophilin-binding region. *J Biol Chem.* Oct 16;273(42):27412-9 (1998).

Kelly R, Alonso S, Tajbakhsh S, Cossu G, Buckingham M. Myosin light chain 3F regulatory sequences confer regionalized cardiac and skeletal muscle expression in transgenic mice. *J Cell Biol.* Apr;129(2):383-96 (1995).

10

Kimura S, Abe K, Suzuki M, Ogawa M, Yoshioka K, Kaname T, Müike T, Yamamura K. A 900 bp genomic region from the mouse dystrophin promoter directs lacZ reporter expression only to the right heart of transgenic mice. *Dev Growth Differ.* Jun;39(3):257-65 (1997).

Klee CB, Ren H, Wang X. Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J Biol Chem.* May 29;273(22):13367-70 (1998).

Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol.* May 5;157(1):105-32 (1982).

Lai MM, Burnett PE, Wolosker H, Blackshaw S, Snyder SH. Cain, a novel physiologic protein inhibitor of calcineurin. *J Biol Chem.* Jul 17;273(29):18325-31 (1998).

20

Landon F, Gache Y, Touitou H, Olomucki A. Properties of two isoforms of human blood platelet alpha-actinin. *Eur J Biochem.* Dec 2;153(2):231-7 (1985).

LaPointe MC, Wu G, Garami M, Yang XP, Gardner DG. Tissue-specific expression of the human brain natriuretic peptide gene in cardiac myocytes. *Hypertension.* Mar;27(3 Pt 2):715-22 (1996).

Lim HW, De Windt LJ, Steinberg L, Taigen T, Witt SA, Kimball TR, Molkenkin JD. Calcineurin expression, activation, and function in cardiac pressure-overload hypertrophy. *Circulation.* 2000 May 23;101(20):2431-7.

30

Lim HW, De Windt LJ, Mante J, Kimball TR, Witt SA, Sussman MA, Molkentin JD. Reversal of cardiac hypertrophy in transgenic disease models by calcineurin inhibition. *J Mol Cell Cardiol.* 2000 Apr;32(4):697-709.

Liu YC, Elly C, Langdon WY, Altman A. Ras-dependent, Ca<sup>2+</sup>-stimulated activation of nuclear factor of activated T cells by a constitutively active Cbl mutant in T cells. *J Biol Chem.* Jan 3;272(1):168-73 (1997).

Lu, J., Richardson, J., Gan, L., Olson, E. *Mech Dev* 73:23-32 (1998).

Luther PK. Three-dimensional reconstruction of a simple Z-band in fish muscle. *J Cell Biol.* Jun;113(5):1043-55 (1991).

10

Macejak DG, Sarnow P. Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA. *Nature.* Sep 5;353(6339):90-4 (1991).

Mao Z, Wiedmann M. Calcineurin enhances MEF2 DNA binding activity in calcium-dependent survival of cerebellar granule neurons. *J Biol Chem.* Oct 22;274(43):31102-7 (1999).

Mao Z, Bonni A, Xia F, Nadal-Vicens M, Greenberg ME. Neuronal activity-dependent cell survival mediated by transcription factor MEF2. *Science.* Oct 22;286(5440):785-90 (1999).

Marban E, Kitakaze M, Kusuoka H, Porterfield JK, Yue DT, Chacko VP. Intracellular free calcium concentration measured with <sup>19</sup>F NMR spectroscopy in intact ferret hearts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug;84(16):6005-9 (1987).

20

Merrifield B. Solid phase synthesis. *Science.* Apr 18;232(4748):341-7 (1986).

Mesaeli N, Nakamura K, Zvaritch E, Dickie P, Dziak E, Krause KH, Opas M, MacLennan DH, Michalak M. Calreticulin is essential for cardiac development. *J Cell Biol.* Mar 8;144(5):857-68 (1999).

Michel F, Westhof E. Modelling of the three-dimensional architecture of group I catalytic introns based on comparative sequence analysis. *J Mol Biol.* Dec 5;216(3):585-610 (1990).

Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*. Apr 17;93(2):215-28 (1998).

Musaro A, McCullagh KJ, Naya FJ, Olson EN, Rosenthal N. IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. *Nature*. Aug 5;400(6744):581-5 (1999).

Olson EN, Molkentin JD. Prevention of cardiac hypertrophy by calcineurin inhibition: hope or hype? *Circ Res*. 1999 Apr 2;84(6):623-32 (1999).

Parr T, Waites GT, Patel B, Millake DB, Critchley DR. A chick skeletal-muscle alpha-actinin gene gives rise to two alternatively spliced isoforms which differ in the EF-hand Ca(2+)-binding domain. *Eur J Biochem*. Dec 15;210(3):801-9 (1992).

10

Pelletier J, Sonenberg N. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature*. 1988 Jul 28;334(6180):320-5.

Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol*;15:707-47 (1997).

Reinhold-Hurek B, Shub DA. Self-splicing introns in tRNA genes of widely divergent bacteria. *Nature*. May 14;357(6374):173-6 (1992).

20

Ritchie ME. Characterization of human B creatine kinase gene regulation in the heart in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. Oct 11;271(41):25485-91 (1996).

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory (1989).

Schroeter JP, Bretauidiere JP, Sass RL, Goldstein MA. Three-dimensional structure of the Z band in a normal mammalian skeletal muscle. *J Cell Biol*. May;133(3):571-83 (1996).

Seidman CE, Seidman JG. Molecular genetic studies of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol*;93 Suppl 3:13-6 (1998).

Semsarian C, Wu MJ, Ju YK, Marcinicc T, Yeoh T, Allen DG, Harvey RP, Graham RM. Skeletal muscle hypertrophy is mediated by a Ca<sup>2+</sup>-dependent calcineurin signalling pathway. *Nature*. Aug 5;400(6744):576-81 (1999).

SenGupta DJ, Zhang B, Kraemer B, Pochart P, Fields S, Wickens M. A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proc Nat'l Acad Sci USA*. 1996 Aug 6;93(16):8496-501.

Shibasaki, F., Price, E., Milan, D. and McKeon, F. *Nature* 1996 382:370-373.

Shimoyama M, Hayashi D, Takimoto E, Zou Y, Oka T, Uozumi H, Kudoh S, Shibasaki F, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I. Calcineurin plays a critical role in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Circulation*. 1999 Dec 14;100(24):2449-54.

10

Sieweke M. Detection of transcription factor partners with a yeast one hybrid screen. *Methods Mol Biol* 2000;130:59-77.

Spencer, J., Eliazar, S., Ilaria, R., Richardson, J., Olson, E. *J Cell Biol* 2000 150:771-784.

Squire J. Muscle regulation: a decade of the steric blocking model. *Nature*. Jun 25;291(5817):614-5 (1981).

Sussman MA, Lim HW, Gude N, Taigen T, Olson EN, Robbins J, Colbert MC, Gualberto A, Wieczorek DF, Molkentin JD. Prevention of cardiac hypertrophy in mice by calcineurin inhibition. *Science*. 1998 Sep 11;281(5383):1690-3.

20

Taigen T, De Windt LJ, Lim HW, Molkentin JD. Targeted inhibition of calcineurin prevents agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Proc Nat'l Acad Sci U S A*. 2000 Feb 1;97(3):1196-201.

Timmerman LA, Clipstone NA, Ho SN, Northrop JP, Crabtree GR. Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca<sup>2+</sup> signals and immunosuppression. *Nature*. Oct 31;383(6603):837-40 (1996).

Vidal M, Lecrain P. Yeast forward and reverse 'n'-hybrid systems. *Nucleic Acids Res* 1999 Feb 15;27(4):919-29.

30

Vigoreaux JO. The muscle Z band: lessons in stress management. *J Muscle Res Cell Motil.* Jun;15(3):237-55 (1994).

Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, McKeon F, Bobo T, Franke TF, Reed JC. Ca<sup>2+</sup>-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science.* Apr 9;284(5412):339-43 (1999).

Yang M, Wu Z, Fields S. Protein-peptide interactions analyzed with the yeast two-hybrid system. *Nucleic Acids Res* 1995 Apr 11;23(7):1152-6.

Youn HD, Sun L, Prywes R, Liu JO. Apoptosis of T cells mediated by Ca<sup>2+</sup>-induced release of the transcription factor MEF2. *Science.* Oct 22;286(5440):790-3 (1999).

Zhang W, Kowal RC, Rusnak F, Sikkink RA, Olson EN, Victor RG. Failure of calcineurin inhibitors to prevent pressure-overload left ventricular hypertrophy in rats. *Circ Res.* Apr 2;84(6):722-8 (1999).

Zhuo M, Zhang W, Son H, Mansuy I, Sobel RA, Seidman J, Kandel ER. A selective role of calcineurin  $\alpha$  in synaptic depotentiation in hippocampus. *Proc Nat'l Acad Sci U S A.* Apr 13;96(8):4650-5 (1999).

Ziober BI, Kramer RH. Identification and characterization of the cell type-specific and developmentally regulated  $\alpha$ 7 integrin gene promoter. *J Biol Chem.* Sep 13;271(37):22915-22 (1996).

10

20

#### 【図面の簡単な説明】

以下の図面は、本明細書の一部を形成し、そして本発明の特定の局面をさらに説明するために含まれる。本発明は、本明細書中に提示される特定の実施形態の詳細な説明と組み合わせ、1つ以上のこれらの図面を参照することによってより良好に理解され得る。

#### 【図1】

図1A～1Eは、ヒトおよびマウスのカルサルシン - 1およびカルサルシン - 2の推定アミノ酸配列を示す。ヒトカルサルシン - 1の推定アミノ酸配列(図1A)、マウスカルサルシン - 1の推定アミノ酸配列(図1B)、ヒトカルサルシン - 2の推定アミノ酸配列(図1C)およびマウスカルサルシン - 2の推定アミノ酸配列(図1D)を、マウスタンパク質のアミノ酸整列(図1E)とともに示す。

30

#### 【図2A】

図2Aは、ヒトカルサルシン - 1についてのヌクレオチド配列を示す。

#### 【図2B】

図2Bは、マウスカルサルシン - 1についてのヌクレオチド配列を示す。

#### 【図2C】

図2Cは、ヒトカルサルシン - 2についてのヌクレオチド配列を示す。

#### 【図2D】

図2Dは、マウスカルサルシン - 2についてのヌクレオチド配列を示す。

40

#### 【図3】

図3は、成体のヒトおよびマウスの組織におけるカルサルシン - 1およびカルサルシン - 2のノーザンプロット分析を示す。カルサルシン転写物は、示されるヒトおよびマウスの組織のノーザン分析によって検出された。カルサルシン - 1 mRNAは、心臓および骨格筋において優位に検出されるが、一方、カルサルシン - 2転写物は、両方の種の骨格筋において検出された。

#### 【図4A】

図4A～4Eは、カルサルシン - 1およびカルサルシン - 2の発生発現を示す。図4A：カルサルシン - 1およびカルサルシン - 2転写物は、上の各々のセットのパネルに示される胚の時点で、マウス胚矢状切片の放射性インサイチュハイブリダイゼーションによって

50

検出された ( b、脳 ; h、心臓 ; t、舌 )。

【図 4 B】

図 4 A ~ 4 E は、カルサルシン - 1 およびカルサルシン - 2 の発生発現を示す。図 4 B : カルサルシン - 1 転写物は、成体マウス心臓の前面切片の放射性インサイチュハイブリダイゼーションによって検出された。転写物は、房 ( a ) および室 ( v ) の至る所に検出される。

【図 4 C】

図 4 A ~ 4 E は、カルサルシン - 1 およびカルサルシン - 2 の発生発現を示す。図 4 C : カルサルシン転写物は、成体マウス後肢筋を通じた切片の放射性インサイチュハイブリダイゼーションによって検出された。カルサルシン - 1 転写物は、ヒラメ筋 ( s ) および足底筋 ( p ) に局在するが、一方カルサルシン - 2 転写物は、腓腹筋 ( g ) に局在する。

10

【図 4 D】

図 4 A ~ 4 E は、カルサルシン - 1 およびカルサルシン - 2 の発生発現を示す。図 4 D : カルサルシン - 1 および - チュープリンのタンパク質発現は、示される組織由来の抽出物のウェスタンブロット分析によって検出された。

【図 4 E】

図 4 A ~ 4 E は、カルサルシン - 1 およびカルサルシン - 2 の発生発現を示す。図 4 E : カルサルシン - 1 転写物は、示される日数について、増殖培地 ( G M ) または分化培地 ( D M ) において、C 2 細胞由来の R N A のノーザン分析によって検出された。棒目盛は、5 0 0 μ m である。

20

【図 5 A】

図 5 A は、カルサルシン - 1 の垂細胞局在を示す。新生児ラット心筋細胞を、カルサルシン - 1 抗血清ならびに - アクチニン ( 上部パネル ) および C n A ( 下部パネル ) に対して指向される抗体を用いた免疫染色によって分析した。オーバーレイは、カルサルシン - 1 が、 - アクチニンおよび C n A と共局在することを示す。棒目盛は、1 0 μ m である。

【図 5 B】

図 5 B は、カルサルシン - 1 の垂細胞局在を示す。新生児ラット心筋細胞を、カルサルシン - 1 抗血清ならびに - アクチニン ( 上部パネル ) および C n A ( 下部パネル ) に対して指向される抗体を用いた免疫染色によって分析した。オーバーレイは、カルサルシン - 1 が、 - アクチニンおよび C n A と共局在することを示す。棒目盛は、1 0 μ m である。

30

【図 6 A】

図 6 A ~ C は、カルシニューリンおよび - アクチニンをを用いたカルサルシンの同時免疫沈降を示す。図 6 A : C o s 細胞が、F L A G - c a n、F L A G - - アクチニン - 1 または M y c - カルサルシン - 1 ( C s - 1 ) をコードする発現ベクターを用いて一過性にトランスフェクトされ、そして免疫沈降が行われた。上部パネルは、抗 M y c 免疫沈降物の抗 F L A G イムノプロットを示し、そして C n A および - アクチニンの C s - 1 との結合を実証する。I g G 重鎖はまた、二次抗体によって認識される。中央のパネルは、細胞抽出物の抗 F L A G イムノプロットを示して、C n A および - アクチニンの存在を実証する。下部パネルは、細胞抽出物の抗 M y c イムノプロットを示して、カルサルシンの存在を実証する。

40

【図 6 B】

図 6 A ~ C は、カルシニューリンおよび - アクチニンをを用いたカルサルシンの同時免疫沈降を示す。図 6 B : C o s 細胞が、M y c - - アクチニン - 2、H A - C s - 1 または F L A G - C n A をコードする発現ベクターを用いて一過性にトランスフェクトされ、そして免疫沈降が、抗 M y c 抗体を用いて行われ、その後、F L A G 抗体を用いてイムノプロットが行われた。上部パネルは、抗 M y c 免疫沈降物の抗 F L A G イムノプロットを示し、そして C n A の C s - 1 との結合を実証する。上から 2 番目のパネルは、細胞抽出物の抗 F L A G イムノプロットを示して、c a n の存在を実証する。次のパネルは、それ

50

ぞれ、抗 Myc イムノプロットを示して、 $\alpha$ -アクチニンの存在を実証し、そして抗 HA イムノプロットを示して、Cs-1 の存在を実証する。

【図 6 C】

図 6 A ~ C は、カルシニューリンおよび  $\alpha$ -アクチニンをを用いたカルサルシンの同時免疫沈降を示す。図 6 C : 初代新生児ラット心筋細胞から調製される抽出物が、抗 Cs-1 抗体または免疫前血清を用いて免疫沈降され、そして抗  $\alpha$ -アクチニン抗体を用いたイムノプロットングによって分析された。 $\alpha$ -アクチニンは、抗 Cs-1 と特異的に免疫沈降する。

【図 7】

図 7 は、カルサルシン相互作用ドメイン、カルシニューリン相互作用ドメインおよび  $\alpha$ -アクチニン相互作用ドメインのマッピングを示す。N 末端および C 末端のカルサルシン-1 トランケーションが作製され、そして Gal4-DNA 結合ドメインに融合されて、酵母における Gal 活性によって評価されるように、CnA または  $\alpha$ -アクチニンと相互作用する能力を試験された。相補実験が、それぞれ FLAG タグ化 CnA または FLAG タグ化  $\alpha$ -アクチニンとの Myc タグ化カルサルシン-1 の同時免疫沈降によって行われた。総合すれば、アミノ酸 153 ~ 200 は、 $\alpha$ -アクチニンとの相互作用に不可欠であるようであるが、一方、アミノ酸 217 ~ 240 は、CnA とのカルサルシンの結合に必要である。

【図 8】

図 8 は、カルサルシン-1 の Z ディスクへの結合、およびカルシニューリン (CnA) とその結合を示す筋節の概略図である。

【図 9】

図 9 は、成体ヒトおよびマウスの組織におけるカルサルシン-3 のノーザンプロット分析を示す。カルサルシン転写物が、示されるヒトおよびマウスの組織のノーザン分析によって検出された。カルサルシン-3 mRNA は、両方の種の骨格筋において優位に検出される。

【図 10】

図 10 は、カルシニューリンおよび  $\alpha$ -アクチニン、テレットニンおよび  $\alpha$ -フィラミンとのカルサルシンの同時免疫沈降を示す。図 6 に示されるように、カルサルシン 1、カルサルシン 2 およびカルサルシン 3 は、カルシニューリンおよび  $\alpha$ -アクチニン、ならびに  $\alpha$ -フィラミンと相互作用した。さらに、同時免疫沈降によって、すべてのカルサルシンが、心臓の筋節タンパク質および骨格筋のテレットニンと相互作用した。テレットニンは、肢帯筋ジストロフィに關与する疾患遺伝子であり、そして心筋および骨格筋の両方における横紋筋の伸張応答における役割を果たし得る。

【図 11】

図 11 は、Z ディスク位置を確認する、抗カルサルシン-3 抗体を用いたマウス骨格筋の免疫染色を示す。抗体を、カルサルシン-3 に対して惹起し、これは、 $\alpha$ -アクチニンとの共局在によって証明される骨格筋における Z ディスク染色を示す。

【図 12】

図 12 は、C2C1 細胞におけるカルサルシン-1 の過剰発現が、(前)筋節形成を促進することを示す。C2C1 2 筋芽細胞におけるカルサルシン-1 の過剰発現は、早期(分化の 1 日後)および増強される筋節形成をもたらす。

【図 13】

図 13 は、カルサルシン 1 ~ 3 の整列を示す。





【 図 4 B 】



FIG. 4B

【 図 4 C 】

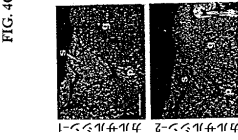


FIG. 4C

【 図 4 D 】

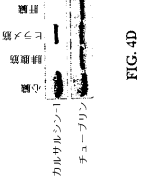


FIG. 4D

【 図 4 E 】

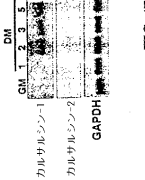
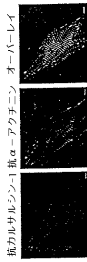


FIG. 4E

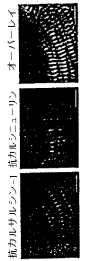
【 図 5 A 】

FIG. 5A



【 図 5 B 】

FIG. 5B



【 図 6 A 】

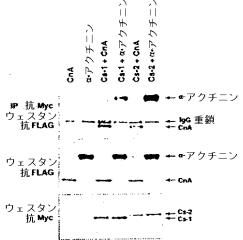


FIG. 6A

【 図 6 B 】

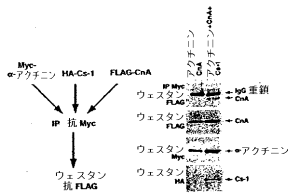


FIG. 6B

【 図 6 C 】

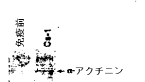


FIG. 6C

【 図 7 】

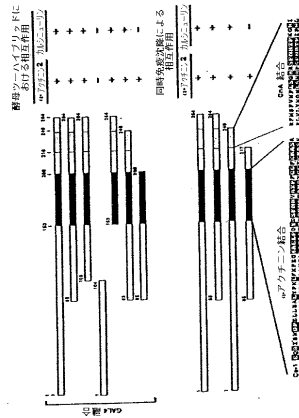


FIG. 7

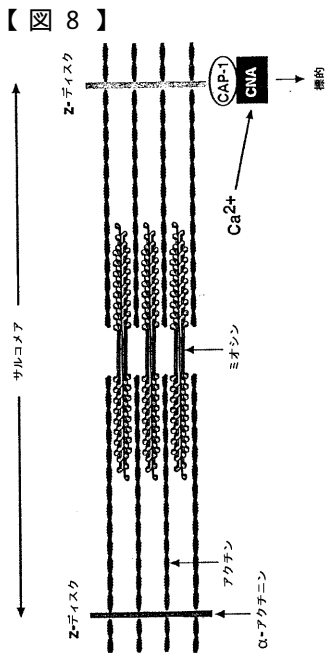


FIG. 8

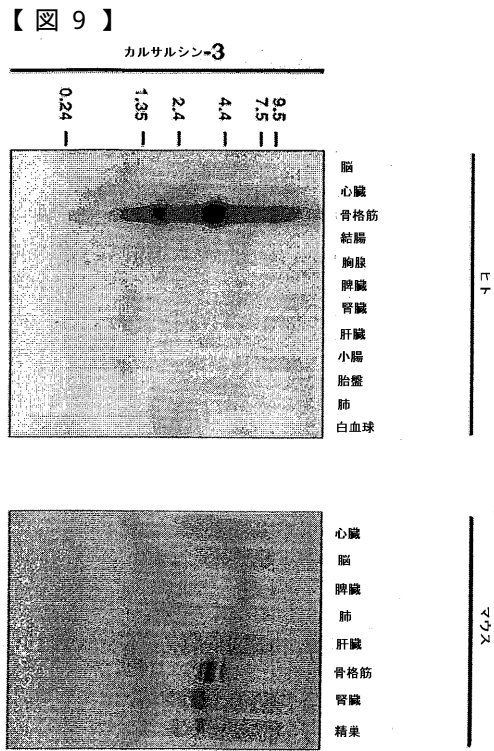


FIG. 9

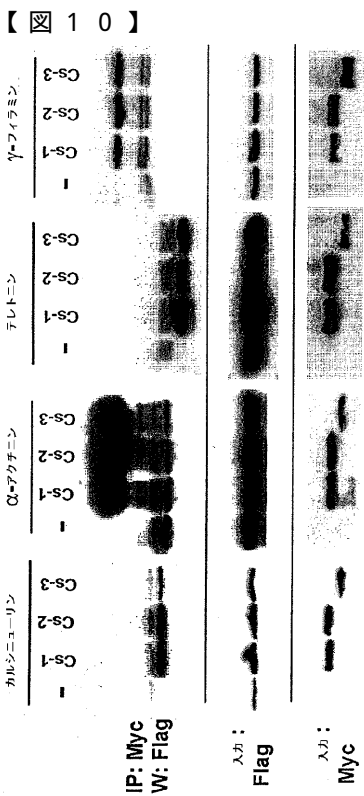


FIG. 10



FIG. 11

【  1 3 】

ClustalW 形式の配列

カルボシチン3 1 ... K K G K P M A A G L T F V F T D P G K N V F R D I M M I L L S R N R H 47  
 カルボシチン4 1 ... S L A A A S R T A G G G G K S G I N I G K K S A P E P D A I I F E L T I R R S 5  
 カルボシチン1 1 ... H P L A R N A N S Q S A S H . . . N Y D D I G K A S P R I A L L E R L E S D I R R S 3  
 カルボシチン3 46 ... R K R V S F I L A A S Q A M I G A R E V F G M S G T A A G P P E P P N Y 102  
 カルボシチン4 46 ... R K R V S F I L A A S Q A M I G A R E V F G M S G T A A G P P E P P N Y 102  
 カルボシチン1 54 ... A H M R E D I H I L N . . . . . P Q S P M I F M G I G O . . . . . 94  
 カルボシチン3 103 ... S L A A A S R T A G G G G K S G I N I G K K S A P E P D A I I F E L T I R R S 5  
 カルボシチン4 103 ... S L A A A S R T A G G G G K S G I N I G K K S A P E P D A I I F E L T I R R S 5  
 カルボシチン1 91 ... S M E G G S Q . . . . . P N P D P . . . . . D N G A S G I A G A A O A A C . . . 136  
 カルボシチン3 135 ... L A . . . . . N H T A V P Y S P V H A S N D P L E A Y F F K P G G A 177  
 カルボシチン4 135 ... L A . . . . . N H T A V P Y S P V H A S N D P L E A Y F F K P G G A 177  
 カルボシチン1 137 ... L A . . . . . N H T A V P Y S P V H A S N D P L E A Y F F K P G G A 177  
 カルボシチン3 184 ... T T G V E G S D Q A G E Q X I L E V E P A L W E G V D P N M P G I L A S G G A 233  
 カルボシチン4 184 ... T T G V E G S D Q A G E Q X I L E V E P A L W E G V D P N M P G I L A S G G A 233  
 カルボシチン1 178 ... D Y R S P N R V A T F G G E K A S K K I P P G P L S E L L N S R 255  
 カルボシチン3 232 ... S R R V A G G R N I P . . . . . S . . . . . 251  
 カルボシチン4 232 ... S R R V A G G R N I P . . . . . S . . . . . 251  
 カルボシチン1 230 ... R S R R I L E W S S E I P V I P T D D T T V P R H L 299 .

FIG. 13

## 【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  
13 June 2002 (13.06.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/46419 A2

- (51) International Patent Classification: C12N 15/12, C07K 14/47, 16/18, A01K 67/027, A61K 38/17, 48/00, G01N 33/68
- (52) International Application Number: PCT/US01/49861
- (22) International Filing Date: 7 November 2001 (07.11.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/246,629 7 November 2000 (07.11.2000) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application: US 60/246,629 (CON) Filed on 7 November 2000 (07.11.2000)
- (71) Applicant (for all designated States except US): BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM [US/US]; 201 West 7th Street, Austin, TX 78701 (US).
- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): OLSON, Eric, N. [US/US]; 3700 Southwestern, Dallas, TX 75225 (US).
- FREY, Norbert [US/US]; 5454 Amesbury Dr.#1813, Dallas, TX 75206 (US).
- (74) Agent: HIGHLANDER, Steven, I., Fulbright & Jaworski L.L.P., Suite 2400, 600 Congress Avenue, Austin, TX 78701 (US).
- (81) Designated States (national): 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, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, 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 02/46419 A2

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS RELATING TO MUSCLE SPECIFIC SARCOMERIC CALCINEURIN-BINDING PROTEINS (CALSARCINS)

(57) Abstract: The present invention relates to the polypeptides known as calcineurin associated protein (calsarcin). Calsarcins-1, -2, and 3 bind to calcineurin, telethonin, and  $\alpha$ -actinin, which provides a link between these molecules and the sarcomere. Sarcomeric dysfunction ultimately leads to activation of calcineurin and consequent hypertrophic cardiomyopathy. Thus, methods utilizing calsarcin as it regards these medical conditions are herein provided and include screening for peptides which interact with calsarcin, screening for modulators of calsarcin binding to calcineurin or  $\alpha$ -actinin, methods to modulate calcineurin activity, methods to inhibit calcineurin activation of gene transcription and methods for treating cardiac hypertrophy, heart failure and Type II diabetes.

WO 02/46419

PCT/US01/49861

**DESCRIPTION****METHODS AND COMPOSITIONS RELATING TO MUSCLE SPECIFIC  
SARCOMERIC CALCINEURIN-BINDING PROTEINS (CALSARCINS)**5 **BACKGROUND OF THE INVENTION**

The present application claims priority to co-pending U.S. Provisional Patent Application Serial No. 60/246,629 filed on November 7, 2000. The entire text of the above-referenced disclosure is specifically incorporated herein by reference without disclaimer. The government may own rights in the present invention pursuant to grant number HL53351-06  
10 from the National Institutes of Health.

**1. Field of the Invention**

The present invention relates generally to the fields of cell biology and molecular biology. Particularly, it concerns the regulation of activity of calcineurin through a calcineurin-associated sarcomeric protein (calsarcin). More particularly, it concerns the  
15 regulation of activity of calcineurin through CALSARCIN-1, which also interacts with the sarcomere-related  $\alpha$ -actinin.

**2. Description of Related Art**

Calcineurin is a serine/threonine protein phosphatase that plays a pivotal role in developmental and homeostatic regulation of a wide variety of cell types (Klee *et al.*, 1998;  
20 Crabtree, 1999). The interaction of calcineurin with transcription factors of the NFAT family following activation of the T cell receptor in leukocytes provides the best characterized example of how calcineurin regulates gene expression (Rao *et al.*, 1997). Changes in intracellular calcium promote binding of  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin to the catalytic subunit of calcineurin (CnA), thereby displacing an autoinhibitory region and allowing access of protein  
25 substrates to the catalytic domain. Dephosphorylation of NFAT by activated calcineurin promotes its translocation from the cytoplasm to the nucleus, where NFAT binds DNA cooperatively with an AP1 heterodimer to activate transcription of genes encoding cytokines,

WO 02/46419

PCT/US01/49861

such as IL-2. This basic model of NFAT activation has been shown to transduce  $Ca^{2+}$  signals via calcineurin in many cell types and to control transcription of diverse sets of target genes unique to each cellular environment (Timmerman *et al.*, 1996). In each case, NFAT acts cooperatively with other transcription factors that include proteins of the AP1 (Rao *et al.*, 1997), cMAF (Ho *et al.*, 1996), GATA (Mesacli *et al.*, 1999; Molkenin *et al.*, 1998; Musaro *et al.*, 1999), or MEF2 (Chin *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1997; Mao *et al.*, 1999; Mao and Wiedmann, 1999) families. In addition to T cell activation, cellular responses controlled by calcineurin signaling include synaptic plasticity (Mao *et al.*, 1999; Graef *et al.*, 1999; Zhuo *et al.*, 1999) and apoptosis (Wang *et al.*, 1999; Youn *et al.*, 1999).

Recent studies of calcineurin signaling in striated myocytes of heart and skeletal muscle have expanded the scope of important physiological and pathological events controlled by this ubiquitously expressed protein. Forced expression of a constitutively active form of calcineurin in hearts of transgenic mice promotes cardiac hypertrophy that progresses to dilated cardiomyopathy, heart failure, and death, in a manner that recapitulates features of human disease (Molkenin *et al.*, 1998, herein incorporated by reference). Moreover, hypertrophy and heart failure in these animals, and in certain other animal models of cardiomyopathy, are prevented by administration of the calcineurin antagonist drugs cyclosporin A or FK-506 (Sussman *et al.*, 1998). In skeletal muscles, calcineurin signaling is implicated both in hypertrophic growth stimulated by insulin-like growth factor-1 (Musaro *et al.*, 1999; Semsarian *et al.*, 1999), and in the control of specialized programs of gene expression that establish distinctive myofiber subtypes (Chin *et al.*, 1998; Dunn *et al.*, 1999). These observations have stimulated interest in the therapeutic potential of modifying calcineurin activity selectively in muscle cells while avoiding unwanted consequences of altered calcineurin signaling in other cell types (Sigal *et al.*, 1991).

The activity of calcineurin in mammalian cells can be modulated by interactions with other proteins. These include not only immunophilins that are the targets of the immunosuppressant drugs cyclosporin A and FK-506, but two unrelated proteins (AKAP79 and cabin-1/cain) that were identified recently. AKAP79 binds calcineurin in conjunction with protein kinase C and protein kinase A, serving as a scaffold for assembly of a large hetero-oligomeric signaling complex (Kashishian *et al.*, 1998). Cabin-1/cain binds both calcineurin and the transcription factor MEF2 (Sun *et al.*, 1998; Lai *et al.*, 1998). As a consequence of cabin-1 overexpression, calcineurin activity is inhibited and MEF2 is sequestered in an inactive state. Another calcineurin-binding protein is Rex1p (YKL159c) of

WO 02/46419

PCT/US01/49861

*Saccharomyces cerevisiae*. A preliminary report noted that this small 24 kDa protein inhibits calcineurin signaling when overexpressed in yeast (Kingsbury and Cunningham, 1998).

In muscle cells, the actin filaments of the cytoskeleton are stably anchored at the Z-disk of the sarcomere, and furthermore are required for the transmission of mechanical strain along the length of the muscle through the serially ordered sarcomeres. The Z-disk consists of the anti-parallel dimeric actin-binding protein  $\alpha$ -actinin (Luther, 1991). For a given actin filament, there is overlap of four filaments from the opposite sarcomere which results in the formation of a square grid cross-connected in a zig-zag pattern by the  $\alpha$ -actinin-composed Z filaments. The periodicity of  $\alpha$ -actinin in this grid is between 15 and 20 nm (Luther, 1991; Schroeter *et al.*, 1996) and, although the number of  $\alpha$ -actinin cross-links is variable, the total number is highly regulated in a given muscle fiber (Squire, 1981; Vigoreaux, 1994).

Sarcomeric  $\alpha$ -actinin, (s- $\alpha$ -actinin) and the  $\alpha$ -actinin present in non-muscle cells (non-s- $\alpha$ -actinin) are encoded by two different genes. Furthermore, isoforms of s- $\alpha$ -actinin are produced likely through alternative splicing schemes (Baron *et al.*, 1987; de Arruda *et al.*, 1990; Beggs *et al.*, 1992; Parr *et al.*, 1992). Actin binding of the non-s- $\alpha$ -actinin form is  $Ca^{2+}$ -sensitive, whereas actin binding of the s- $\alpha$ -actinin form is  $Ca^{2+}$ -insensitive (Burrige and Feramisco, 1980; Duhaiman and Banburg, 1984; Bennett *et al.*, 1984; Landon *et al.*, 1985).

*Drosophila*  $\alpha$ -actinin gene mutants are lethal, although the flies are able to survive beyond embryogenesis with detectable muscle dysfunction present at the hatching stage (Fyrberg *et al.*, 1998). In larval development, the mutation manifests through noticeable muscle degeneration which progressively limits mobility, and ultimately leads to death. Microscopic evaluation of mutant muscle fibers indicates that in as early as one-day old larvae, myofibrils are significantly perturbed with similar cellular pathologies to human nemaline myopathies.

Telethonin is sarcomeric protein of heart and skeletal muscle encoded by the gene involved in limb-girdle muscular dystrophy. Muscular dystrophy (MD) refers to a group of genetic diseases characterized by progressive weakness and degeneration of the skeletal or voluntary muscles which control movement. The muscles of the heart and some other involuntary muscles are also affected in some forms of MD, and a few forms involve other organs as well. The major forms of MD include myotonic, Duchenne, Becker, limb-girdle, facioscapulohumeral, congenital, oculopharyngeal, distal and Emery-Dreifuss. Duchenne is the most common form of MD affecting children, and myotonic MD is the most common

WO 02/46419

PCT/US01/49861

form affecting adults. MD can affect people of all ages. Although some forms first become apparent in infancy or childhood, others may not appear until middle age or later. There is no known cure for muscular dystrophy therefore, gene therapies with calsarcins may prove valuable.

5 Previous studies (Sussman *et al.*, 1998; Shimoyama *et al.*, 1999; Hill *et al.*, 2000; Lim *et al.*, 2000a; Lim *et al.*, 2000b; Taigen *et al.*, 2000) have demonstrated that sarcomeric dysfunction with resulting alterations in calcium handling results in activation of calcineurin and consequent hypertrophic cardiomyopathy. A link between calcineurin and the sarcomere, such as with a calcineurin associated protein or peptide, provides a therapeutic  
10 target. Identification of new, more suitable candidates having the ability to modulate calcineurin function in cardiac tissue is an important goal of current research efforts.

Since the time of the initial discovery of the central role of calcineurin in cardiac hypertrophy and heart failure (Molkentin *et al.*, 1998), there have been numerous follow-up studies that have confirmed the importance of this signaling pathway in hypertrophic growth  
15 of the heart in response to diverse intrinsic and extrinsic signals (reviewed in Olson and Molkentin, 1999; Izumo and Aoki, 1998). Inhibition or activation of this pathway in the heart can have profound consequences on cardiac cell growth and has important therapeutic implications. However, the importance of calcineurin for T-cell activation results in immunosuppression when calcineurin is globally inhibited in the entire organism. Thus, the  
20 identification of cardiac-specific calcineurin-binding proteins could allow for possible tissue-specific means of altering calcineurin activity in the heart through targeting the protein to specific subcellular sites or through modification of the cardiac-specific target proteins.

#### **SUMMARY OF THE INVENTION**

25 The invention employs a novel protein calsarcin, which links calcineurin to  $\alpha$ -actinin within the sarcomere. Using dominant negative mutant versions of calsarcin as "decoys," calcineurin can be misdirected within a cardiac myocyte to an inappropriate intracellular location, thereby disrupting calcineurin hypertrophic signaling. These decoys, which, in specific embodiment, could contain portions of calsarcin that associate with calcineurin but  
30 not with  $\alpha$ -actinin, could be expressed in cardiac myocytes *in vitro* by adenovirus-mediated gene delivery

WO 02/46419

PCT/US01/49861

In an embodiment of the present invention, there is an isolated and purified polypeptide comprising SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:10, or SEQ ID NO:12.

5 In an additional embodiment of the present invention, there is an isolated and purified nucleic acid comprising a nucleic acid segment encoding SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11. In a specific embodiment, a nucleic acid segment further comprises a promoter active in eukaryotic cells. In another specific embodiment, a nucleic acid further comprises a recombinant vector.

10 In another embodiment of the present invention there is an isolated and purified nucleic acid segment, wherein said nucleic acid segment encodes a fusion polypeptide comprising SEQ ID NO:2. In another embodiment of the present invention there is an isolated and purified nucleic acid segment, wherein said nucleic acid segment encodes a fusion polypeptide comprising SEQ ID NO:4, 6, 8, 10, or 12.

15 In an additional embodiment of the present invention, there is a knockout non-human animal comprising a defective allele of a nucleic acid encoding cal sarcin. In a specific embodiment, the animal further comprises two defective alleles of a nucleic acid encoding cal sarcin. In an additional specific embodiment, the animal is a mouse.

20 In an additional embodiment of the present invention, there is a transgenic non-human animal comprising an expression cassette, wherein said cassette comprises a nucleic acid encoding a cal sarcin polypeptide under the control of a promoter active in eukaryotic cells. In specific embodiments, the promoter is constitutive, tissue specific, or inducible. In another specific embodiment the animal is a mouse.

25 In another embodiment of the present invention, there is a monoclonal antibody that binds immunologically to a polypeptide comprising SEQ ID NO:2, or an antigenic fragment thereof. In another embodiment of the present invention, there is a monoclonal antibody that binds immunologically to a polypeptide comprising SEQ ID NO:4, 6, 8, 10, or 12, or an antigenic fragment thereof.

30 In an additional embodiment of the present invention, there is polyclonal antisera, antibodies of which bind immunologically to a polypeptide comprising SEQ ID NO:2, or an antigenic fragment thereof. In an additional embodiment of the present invention, there is polyclonal antisera, antibodies of which bind immunologically to a polypeptide comprising SEQ ID NO:4, 6, 8, 10, or 12, or an antigenic fragment thereof.

WO 02/46419

PCT/US01/49861

In an additional embodiment of the present invention, there is a method of modulating calcineurin activity in an animal comprising the step of administering to said organism a calsarcin polypeptide, or a calcineurin-binding fragment thereof.

5 In a further embodiment of the present invention, there is a method of modulating calcineurin activity in an animal comprising the step of administering to said organism a dominant-negative form of a calsarcin polypeptide, or a calcineurin-binding fragment thereof.

In an additional embodiment of the present invention, there is a method of modulating calcineurin activity in an animal comprising the step of administering to said animal a nucleic acid which encodes a calsarcin polypeptide, or a calcineurin-binding fragment thereof, said  
10 nucleic acid under the control of a promoter operable in cells of said animal. In specific embodiments, the promoter is a constitutive promoter or a muscle-specific promoter. In another specific embodiment, the muscle-specific promoter is myosin light chain-2 promoter,  $\alpha$  actin promoter, troponin 1 promoter,  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger promoter, dystrophin promoter, creatine kinase promoter,  $\alpha 7$  integrin promoter, brain natriuretic peptide promoter,  $\alpha$  B-crystallin/small heat shock protein promoter,  $\alpha$  myosin heavy chain promoter or atrial natriuretic factor promoter. In another specific embodiment, the nucleic acid comprises a  
15 viral vector.

In another embodiment of the present invention, there is a method of screening for a peptide which interacts with calsarcin comprising the steps of introducing into a cell a first  
20 nucleic acid comprising a DNA segment encoding a test peptide, wherein said test peptide is fused to a DNA binding domain; and a second nucleic acid comprising a DNA segment encoding at least a part of calsarcin, wherein said at least part of calsarcin is fused to a DNA activation domain; and assaying for an interaction between said test peptide and said at least part of calsarcin by assaying for an interaction between said DNA binding domain and said  
25 DNA activation domain. In a specific embodiment, a DNA binding domain and a DNA activation domain are selected from the group consisting of GAL4 and LexA.

In an additional embodiment of the present invention, there is a method of screening for a modulator of calsarcin binding to  $\alpha$ -actinin comprising providing a calsarcin and  $\alpha$ -actinin; admixing the calsarcin and  $\alpha$ -actinin in the presence of a candidate modulator;  
30 measuring calsarcin/ $\alpha$ -actinin binding; and comparing the binding in step (c) with the binding of calsarcin and  $\alpha$ -actinin in the absence of said candidate modulator, whereby a difference in the binding of calsarcin and  $\alpha$ -actinin in the presence of said candidate modulator, as compared to binding in the absence of said candidate modulator, identifies said candidate

WO 02/46419

PCT/US01/49861

modulator as a modulator of calsarcin binding to  $\alpha$ -actinin. In a specific embodiment, calsarcin and  $\alpha$ -actinin are part of a cell free system. In another specific embodiment, calsarcin and  $\alpha$ -actinin are located within an intact cell. In an additional specific embodiment, the cell is a myocyte. In a further specific embodiment, the cell is a H9C2 cell, a C2C12 cell, a 3T3 cell, a 293 cell, a neonatal cardiomyocyte cell, an adult cardiomyocyte or a myotube cell. In an additional specific embodiment, the intact cell is located in an animal. In a further specific embodiment the modulator increases or decreases calsarcin binding to  $\alpha$ -actinin. In another specific embodiment, either or both calsarcin and  $\alpha$ -actinin are labeled. In another specific embodiment, both calsarcin and  $\alpha$ -actinin are labeled, one with a quenchable label and the other with a quenching agent. In an additional specific embodiment, both calsarcin and  $\alpha$ -actinin are labeled, but said labels are not detectable unless brought into proximity of each other. In a further specific embodiment, the measuring comprises immunologic detection of calsarcin,  $\alpha$ -actinin or both. In another specific embodiment, the method further comprises measuring binding of calsarcin and  $\alpha$ -actinin in the absence of a modulator.

In another embodiment of the present invention, there is a method of screening for a modulator of calsarcin binding to calcineurin comprising providing a calsarcin and calcineurin; admixing the calsarcin and calcineurin in the presence of a candidate modulator; measuring calsarcin/calcineurin binding; and comparing the binding in step (c) with the binding of calsarcin and calcineurin in the absence of said candidate modulator, whereby a difference in the binding of calsarcin and calcineurin in the presence of said candidate modulator, as compared to binding in the absence of said candidate modulator, identifies said candidate modulator as a modulator of calsarcin binding to calcineurin. In a specific embodiment, the calsarcin and calcineurin are part of a cell free system. In another specific embodiment, the calsarcin and calcineurin are located within an intact cell. In an additional specific embodiment, the cell is a myocyte. In a further specific embodiment, the cell is a H9C2 cell, a C2C12 cell, a 3T3 cell, a 293 cell, a neonatal cardiomyocyte cell, an adult cardiomyocyte or a myotube cell. In a further specific embodiment, the intact cell is located in an animal. In another specific embodiment, the modulator increases or decreases calsarcin binding to calcineurin. In a further specific embodiment, both calsarcin and calcineurin are labeled. In another specific embodiment, both calsarcin and calcineurin are labeled, one with a quenchable label and the other with a quenching agent. In an additional specific embodiment, both calsarcin and calcineurin are labeled, but said labels are not detectable

WO 02/46419

PCT/US01/49861

unless brought into proximity of each other. In another specific embodiment, the measuring comprises immunologic detection of calsarcin, calcineurin or both. In an additional embodiment, the method further comprises measuring binding of calsarcin and calcineurin in the absence of a modulator.

5 In another embodiment of the present invention, there is a method of screening for a modulator of calsarcin binding to telethonin comprising providing a calsarcin and telethonin; admixing the calsarcin and telethonin in the presence of a candidate modulator; measuring calsarcin/telethonin binding; and comparing the binding in step (c) with the binding of calsarcin and telethonin in the absence of said candidate modulator, whereby a difference in  
10 the binding of calsarcin and telethonin in the presence of said candidate modulator, as compared to binding in the absence of said candidate modulator, identifies said candidate modulator as a modulator of calsarcin binding to telethonin. In a specific embodiment, the calsarcin and telethonin are part of a cell free system. In another specific embodiment, the calsarcin and telethonin are located within an intact cell. In an additional specific  
15 embodiment, the cell is a myocyte. In a further specific embodiment, the cell is a H9C2 cell, a C2C12 cell, a 3T3 cell, a 293 cell, a neonatal cardiomyocyte cell, an adult cardiomyocyte or a myotube cell. In a further specific embodiment, the intact cell is located in an animal. In another specific embodiment, the modulator increases or decreases calsarcin binding to telethonin. In a further specific embodiment, both calsarcin and telethonin are labeled. In  
20 another specific embodiment, both calsarcin and telethonin are labeled, one with a quenchable label and the other with a quenching agent. In an additional specific embodiment, both calsarcin and telethonin are labeled, but said labels are not detectable unless brought into proximity of each other. In another specific embodiment, the measuring comprises immunologic detection of calsarcin, telethonin or both. In an additional  
25 embodiment, the method further comprises measuring binding of calsarcin and telethonin in the absence of a modulator.

In another embodiment of the present invention, there is a method of treating cardiac hypertrophy, heart failure or Type II diabetes comprising the step of administering to an animal suffering therefrom a calsarcin polypeptide, or a calcineurin-binding fragment thereof,  
30 wherein said calsarcin polypeptide or fragment thereof inhibits calcineurin activity.

In an additional embodiment of the present invention, there is a method of treating cardiac hypertrophy, heart failure or Type II diabetes comprising the step of administering to an animal suffering therefrom a nucleic acid encoding a calsarcin polypeptide or a calcineurin binding fragment thereof, under the control of a promoter active in cardiac tissue, wherein

WO 02/46419

PCT/US01/49861

expression of said calsarcin polypeptide or fragment thereof inhibits calcineurin activity. Also, an inhibitor may be any molecule that interferes with calcineurin-calsarcin, or  $\alpha$ -actinin interactions. In a specific embodiment, the polypeptide is a dominant negative form of calsarcin. In another specific embodiment, the method further comprises treating said animal with a compound selected from the group consisting of an ionotrope, a beta blocker, an antiarrhythmic, a diuretic, a vasodilator, a hormone antagonist, an endothelin antagonist, an angiotensin type 2 antagonist and a cytokine inhibitor/blocker. In an additional specific embodiment, the promoter is a constitutive promoter or an inducible promoter.

In an additional embodiment of the present invention, there is a method of inhibiting calcineurin activation of gene transcription in a cell comprising providing to said cell a fusion protein comprising calsarcin, or a calcineurin-binding fragment thereof, fused to a targeting peptide that localizes said fusion protein to a subcellular region other than a subcellular region of normal function. In a specific embodiment, a targeting peptide comprises a geranylgeranyl group, a nuclear localization signal, a myristylation signal, and an endoplasmic reticulum signal peptide. In another specific embodiment, a cell is located in an animal. In a further specific embodiment, the animal is a human. In an additional specific embodiment the method further comprises treating said animal with a compound selected from the group consisting of an ionotrope, a beta blocker, an antiarrhythmic, a diuretic, a vasodilator, a hormone antagonist, an endothelin antagonist, an angiotensin type 2 antagonist and a cytokine inhibitor/blocker.

In another embodiment of the present invention, there is a method of identifying a peptide that binds calsarcin comprising the steps of attaching a calsarcin polypeptide, or a fragment thereof, to a support; exposing said calsarcin polypeptide or fragment to a candidate peptide; and assaying for binding of said candidate peptide to said calsarcin polypeptide or fragment thereof. In a specific embodiment the support is selected from the group consisting of nitrocellulose, a column, or a gel.

In an additional embodiment of the present invention, there is a method of screening for a candidate substance for anti-cardiomyopic hypertrophy activity or anti-heart failure activity comprising the steps of providing a cell lacking a functional calsarcin polypeptide; contacting said cell with said candidate substance; and determining the effect of said candidate substance on said cell. In a specific embodiment, the cell is a muscle cell. In another specific embodiment, the cell has a mutation in a regulatory region of calsarcin. In a further specific embodiment the mutation is a deletion mutation, an insertion mutation, or a

WO 02/46419

PCT/US01/49861

point mutation. In a specific embodiment, the cell has a mutation in the coding region of calstarcin. In another specific embodiment, the mutation is a deletion mutation, an insertion mutation, a frameshift mutation, a nonsense mutation, a missense mutation or a splicing mutation. In further specific embodiments, the cell is contacted *in vitro* or *in vivo*. In an additional specific embodiment, the cell is located in a non-human transgenic animal

#### **BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS**

The following drawings form part of the present specification and are included to further demonstrate certain aspects of the present invention. The invention may be better understood by reference to one or more of these drawings in combination with the detailed description of specific embodiments presented herein.

**FIGS. 1A-1E - Predicted amino acid sequences of human and mouse calstarcin-1 and calstarcin-2.** The deduced amino acid sequences of human calstarcin-1 (**FIG. 1A**), mouse calstarcin-1 (**FIG. 1B**), human calstarcin-2 (**FIG. 1C**) and mouse calstarcin-2 (**FIG. 1D**) are shown, along with an amino acid alignment of the mouse proteins (**FIG. 1E**).

**FIGS. 2A-D - Nucleotide sequences for human calstarcin-1 (**FIG. 2A**), mouse calstarcin-1 (**FIG. 2B**), human calstarcin-2 (**FIG. 2C**) and mouse calstarcin-2 (**FIG. 2D**).**

**FIGS. 3 - Northern blot analysis of calstarcin-1 and calstarcin-2 in adult human and mouse tissues.** Calstarcin transcripts were detected by Northern analysis of the indicated human and mouse tissues. Calstarcin-1 mRNA is predominantly detected in heart and skeletal muscle, whereas the calstarcin-2 transcript was detected in skeletal muscle of both species.

**FIGS. 4A-E - Developmental expression of calstarcin-1 and -2.** **FIG. 4A:** Calstarcin-1 and -2 transcripts were detected by radioactive *in situ* hybridization of mouse embryo sagittal sections at the embryonic time points indicated above each set of panels (b, brain; h, heart; t, tongue). **FIG. 4B:** Calstarcin-1 transcripts were detected by radioactive *in situ* hybridization of a frontal section of an adult mouse heart. Transcripts are detected throughout the atria (a) and ventricles (v). **FIG. 4C:** Calstarcin transcripts were detected by radioactive *in situ* hybridization of sections through adult mouse hindlimb muscle. Calstarcin-1 transcripts are localized to soleus (s) and plantaris (p), whereas calstarcin-2 transcripts are localized to the gastrocnemius (g). **FIG. 4D:** Calstarcin-1 and  $\alpha$ -tubulin protein expression was detected by

WO 02/46419

PCT/US01/49861

Western blot analysis of extracts from the indicated tissues. **FIG. 4E:** Calsarcin-1 transcripts were detected by Northern analysis of RNA from C2 cells in growth medium (GM) or differentiation medium (DM) for the indicated days. Scale bar 500  $\mu$ m.

**FIG. 5A-B – Subcellular localization of calsarcin-1.** Neonatal rat cardiomyocytes were analyzed by immunostaining with calsarcin-1 antiserum and antibodies directed against  $\alpha$ -actinin (upper panel) and CnA (lower panel). The overlay indicates that calsarcin-1 colocalizes with  $\alpha$ -actinin and CnA. Scale bar 10  $\mu$ m.

**FIG. 6A-C - Coimmunoprecipitation of calsarcins with calcineurin and  $\alpha$ -actinin.** **FIG. 6A:** Cos-cells were transiently transfected with expression vectors encoding FLAG-can, FLAG- $\alpha$ -actinin-1, or Myc-calsarcin-1 (Cs-1) and immunoprecipitations were performed. The upper panel shows an anti-FLAG immunoblot of anti-Myc immunoprecipitates and demonstrates the association of CnA and  $\alpha$ -actinin with Cs-1. IgG heavy chain also is recognized by the secondary antibody. The middle panel shows an anti-FLAG immunoblot of cell extracts to demonstrate the presence of CnA and  $\alpha$ -actinin. The lower panel shows an anti-Myc immunoblot of cell extracts to demonstrate the presence of calsarcins. **FIG. 6B:** Cos cells were transiently transfected with expression vectors encoding Myc- $\alpha$ -actinin-2, HA-Cs-1 or FLAG-CnA and immunoprecipitations were performed with anti-Myc antibody followed by immunoblotting with FLAG antibody. The upper panel shows an anti-FLAG immunoblot of anti-Myc immunoprecipitates and demonstrates association of CnA with Cs-1. The second panel from the top shows an anti-FLAG immunoblot of cell extracts to demonstrate the presence of can. The next panel shows an anti-Myc immunoblot to demonstrate the presence of  $\alpha$ -actinin and an anti-HA immunoblot to demonstrate the presence of Cs-1, respectively. **FIG. 6C:** Extracts prepared from primary neonatal rat cardiomyocytes were immunoprecipitated with anti-Cs-1 antibody or preimmune serum and analyzed by immunoblotting with anti- $\alpha$ -actinin antibody.  $\alpha$ -actinin is specifically immunoprecipitated with anti-Cs-1.

**FIG. 7 – Mapping of calsarcin-, calcineurin- and  $\alpha$ -actinin-interacting domains.** N- and C-terminal calsarcin-1 truncations were generated and fused to a Gal4-DNA-binding domain to test their ability to interact with CnA or  $\alpha$ -actinin, as assessed by  $\beta$ -gal activity in yeast. Complementary experiments were conducted by coimmunoprecipitation of Myc-tagged calsarcin-1 with FLAG-tagged CnA or  $\alpha$ -actinin, respectively. Taken together, amino acids

WO 02/46419

PCT/US01/49861

153-200 appear to be necessary for the interaction with  $\alpha$ -actinin, whereas amino acids 217-240 are required for calsarcin's association with CnA.

**FIG. 8 - A schematic diagram of the sarcomere showing the binding of calsarcin-1 to the Z-disk and its association with calcineurin (CNA).**

5

**FIG. 9 - Northern blot analysis of calsarcin-3 in adult human and mouse tissues.** Calsarcin transcripts were detected by Northern analysis of the indicated human and mouse tissues. Calsarcin-3 mRNA is predominantly detected in skeletal muscle, of both species.

10 **FIG. 10 - Coimmunoprecipitation of calsarcins with calcineurin and  $\alpha$ -actinin, telethonin and  $\gamma$ -filamin.** As demonstrated in FIG. 6 calscarin 1, 2, and 3 interacted with calcineurin and  $\alpha$ -actinin, and  $\gamma$ -filamin. Furthermore, by coimmunoprecipitation all calsarcins interacted the sarcomeric protein of heart and skeletal muscle telethonin. Telethonin is a disease gene involved in limb-girdle muscular dystrophy and may play a role  
15 in the stretch-response of striated muscle both in cardiac and skeletal muscle.

**FIG. 11- Immunostaining of mouse skeletal muscle with anti-calsarcin-3 antibody confirming z-disc location.** Antibody against was raised against calsarcin-3 which shows z-disc staining in skeletal muscle proven by colocalization with  $\alpha$ -actinin.

20

**FIG. 12 - Overexpression of calsarcin-1 in C2C1 cells promotes (pre-) sarcomere formation.** Overexpression of calsarcin -1 in C2C12 myoblasts results in early, (after one day of differentiation) and enhanced sarcomere formation

25 **FIG. 13 - Alignment of calsarcins 1-3.**

#### **DETAILED DESCRIPTION OF ILLUSTRATIVE EMBODIMENTS**

Heart failure - the inability of the heart to pump blood at a rate sufficient to sustain homeostasis - is a major health issue in the world today. This is true not only due to the  
30 untimely deaths caused by heart disease, but the tremendous expense incurred due to required patient support, including prolonged hospitalization. Thus, there remains a great need to address this costly and debilitating disease.

WO 02/46419

PCT/US01/49861

The present inventors report herein a calcineurin-associated peptide (calsarcin-1) capable of binding the activated form of calcineurin. In a specific embodiment, calsarcin-1 also binds the inactive form of calcineurin. In addition, calsarcin-1 binds  $\alpha$ -actinin (both the sarcomeric and nonsarcomeric forms), which is linked to the sarcomere. The sarcomere is an important muscular subunit in muscle tissues, such as cardiac muscle, which in many ways resembles striated muscle. The sarcomere is the minimum contractile element of muscle and is comprised of protein filaments, including actin filaments and myosin filaments. The thin filaments are protein filaments comprised of smaller actin subunits which combine to form filamentous actin, or F actin. Each thin filament consists of two intertwined actin filaments. The thick filaments are composed of the protein molecule myosin, which has both a tail region and a head region, in which the head regions connect the thick filaments to the thin filaments during contraction. The sarcomere itself is defined as the area between two Z lines, also called Z discs, which are demarcations in which the thin filaments of one sarcomere attaches to the thin filaments of the next sarcomere. As discussed *supra*, the Z discs are composed of  $\alpha$ -actinin.

Current results indicate that the interaction between calsarcin-1 and calcineurin is pertinent to the pathobiology, and ultimately to the therapy, of human heart disease. For example, familial forms of hypertrophic cardiomyopathy are caused by mutations in genes encoding proteins of the sarcomere (Seidman and Seidman, 1998) in a manner that likely involves calcineurin signaling (Marban *et al.*, 1987). Administration of the calcineurin antagonist drugs cyclosporin A or FK-506 prevents cardiac hypertrophy in transgenic animal models of familial forms of hypertrophic cardiomyopathy (Sussman *et al.*, 1998), but the analogous clinical trials are precluded because of toxic side effects (*e.g.*, immunosuppression and hypertension) of existing agents.

Calcineurin antagonists also prevent cardiac hypertrophy and heart failure in some, although not all, animal models of acquired forms of cardiomyopathy that are common in human populations (Sussman *et al.*, 1998; Ding *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1999), but the same limitations to clinical trials apply. The relative abundance of calsarcin-1 in cardiac muscle makes it a prime target for drug development to circumvent these limitations of current calcineurin antagonists.

Results of the present invention further indicate that calsarcin 1, 2 and 3 are candidate genes for inherited muscular dystrophies and myopathies; and further supports this by the interaction of calsarcins with telethonin, a gene involved in limb-girdle muscular dystrophy.

WO 02/46419

PCT/US01/49861

Muscular dystrophy (MD) refers to a group of genetic diseases characterized by progressive weakness and degeneration of the skeletal or voluntary muscles which control movement. The muscles of the heart and some other involuntary muscles are also affected in some forms of MD, and a few forms involve other organs as well. The major forms of MD include myotonic, Duchenne, Becker, limb-girdle, facioscapulohumeral, congenital, oculopharyngeal, distal and Emery-Dreifuss.

The significance of calcineurin-associated proteins in cardiomyopathies and muscular dystrophies is further indicated in the current invention. Based on their interactions and colocalization *in vivo*, it also is proposed herein that calsarcin-1 links calcineurin to the Z-band where it can sense changes in calcium signaling in the myocyte and potentially transduce a hypertrophic signal (FIG. 8). Calsarcin-1, and/or other calsarcin proteins, such as calsarcin-2 or calsarcin-3, may also play structural and/or mechanosensory roles in cardiac and skeletal myocytes through modulation of the Z-band and its association with other proteins in the cell. The Z-band has been shown to play important roles in regulating muscle cell structure and function. Thus, calsarcins are likely to be intimately involved in these processes and is a strong candidate for a gene involved in human cardiomyopathies and muscular dystrophies.

#### I. Calsarcin Peptides and Polypeptides

Applicants provide herein protein sequences for human calsarcin-1 (SEQ ID NO:2) and mouse calsarcin-1 (SEQ ID NO:4), human calsarcin-2 (SEQ ID NO:6), mouse calsarcin-2 (SEQ ID NO:8), human calsarcin-3 (SEQ ID NO:10) and mouse calsarcin-3 (SEQ ID NO:12). In a specific embodiment, a calcineurin associated sarcomeric protein (calsarcin) peptide, a calsarcin polypeptide or a calsarcin protein refer to calsarcin-1, calsarcin-2 or calsarcin-3. In addition to the entire calsarcin-1 molecules, the present invention also relates to fragments of the polypeptides that may or may not retain various of the functions described below. Fragments, including the N-terminus of the molecule, may be generated by genetic engineering of translation stop sites within the coding region (discussed below). Alternatively, treatment of calsarcin-1 with proteolytic enzymes, known as proteases, can produce a variety of N-terminal, C-terminal and internal fragments. Examples of fragments may include contiguous residues of SEQ ID NOS:2, 4, 6, 8, 10, and 12, of 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 200 or more amino acids in length. These fragments may be purified according to known methods, such as precipitation (*e.g.*, ammonium sulfate), HPLC, ion exchange

WO 02/46419

PCT/US01/49861

chromatography, affinity chromatography (including immunoaffinity chromatography) or various size separations (sedimentation, gel electrophoresis, gel filtration).

#### A. Structural Features

5 A skilled artisan is aware of standard methods to determine structural features of cal sarcin-1, cal sarcin-2 and/or cal sarcin-3, such as commercially available computer programs or government-supported programs available on the Internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/>).

#### 10 B. Functional Aspects

As described in the Examples herein, a region of cal sarcin-1 is involved in binding to  $\alpha$ -actinin. In a specific embodiment, this region is localized to between amino acids 105 and 176 (see Example 7). In another embodiment, a region of cal sarcin-1 is determined to be involved in binding to calcineurin by similar methods. In an additional embodiment, 15 cal sarcin-2 and/or cal sarcin-3 are identified to be involved in binding to calcineurin by similar methods. In an alternative embodiment, more than one cal sarcin polypeptide interacts with calcineurin, and in a specific embodiment, more than one cal sarcin polypeptide interacts with calcineurin concomitantly. In another embodiment, more than one cal sarcin polypeptide interacts with  $\alpha$ -actinin. In an additional specific embodiment, more than one cal sarcin 20 polypeptide interacts with  $\alpha$ -actinin concomitantly. In a specific embodiment, cal sarcin-1, cal sarcin-2, and/or cal sarcin-3 amino acid sequences are compared by computer programs standard in the art or with the naked eye to search for similar domains which are likely candidates for calcineurin interaction. This domain in cal sarcin-1, cal sarcin-2 and/or cal sarcin-3 is tested for calcineurin binding by standard methods in the art, such as directed 25 two hybrid analysis or coimmunoprecipitation. Thses studies have revealed that the cal sarcin-1 calcineurin binding domain is localized to residues 217-240.

#### C. Variants of Cal sarcin

Amino acid sequence variants of the cal sarcin polypeptide can be substitutional, 30 insertional or deletion variants. Deletion variants lack one or more residues of the native protein which are not essential for function or immunogenic activity. Another common type of deletion variant is one lacking secretory signal sequences or signal sequences directing a protein to bind to a particular part of a cell. Insertional mutants typically involve the addition

WO 02/46419

PCT/US01/49861

of material at a non-terminal point in the polypeptide. This may include the insertion of an immunoreactive epitope or simply a single residue. Terminal additions, called fusion proteins, are discussed below.

5 Substitutional variants typically contain the exchange of one amino acid for another at one or more sites within the protein, and may be designed to modulate one or more properties of the polypeptide, such as stability against proteolytic cleavage, without the loss of other functions or properties. Substitutions of this kind preferably are conservative, that is, one amino acid is replaced with one of similar shape and charge. Conservative substitutions are well known in the art and include, for example, the changes of: alanine to serine; arginine to lysine; asparagine to glutamine or histidine; aspartate to glutamate; cysteine to serine; 10 glutamine to asparagine; glutamate to aspartate; glycine to proline; histidine to asparagine or glutamine; isoleucine to leucine or valine; leucine to valine or isoleucine; lysine to arginine; methionine to leucine or isoleucine; phenylalanine to tyrosine, leucine or methionine; serine to threonine; threonine to serine; tryptophan to tyrosine; tyrosine to tryptophan or 15 phenylalanine; and valine to isoleucine or leucine.

The following is a discussion based upon changing of the amino acids of a protein or polypeptide to create an equivalent, or even an improved, second-generation molecule. For example, certain amino acids may be substituted for other amino acids in a protein structure without appreciable loss of interactive binding capacity with structures such as, for example, 20 antigen-binding regions of antibodies or binding sites on substrate molecules. Since it is the interactive capacity and nature of a protein that defines that protein's biological functional activity, certain amino acid substitutions can be made in a protein sequence, and its underlying DNA coding sequence, and nevertheless obtain a protein with like properties. It is thus contemplated by the inventors that various changes may be made in the DNA sequences 25 of genes without appreciable loss of the biological utility or activity of the corresponding polypeptide, as discussed below. Table 1, provided elsewhere herein, shows the codons that encode particular amino acids.

In making such changes, the hydropathic index of amino acids may be considered. The importance of the hydropathic amino acid index in conferring interactive biological 30 function on a protein is generally understood in the art (Kyte and Doolittle, 1982). It is accepted that the relative hydropathic character of the amino acid contributes to the secondary structure of the resultant protein, which in turn defines the interaction of the protein with other molecules, for example, enzymes, substrates, receptors, DNA, antibodies, antigens, and the like.

WO 02/46419

PCT/US01/49861

Each amino acid has been assigned a hydrophobic index on the basis of their hydrophobicity and charge characteristics (Kyte and Doolittle, 1982), these are: isoleucine (+4.5); valine (+4.2); leucine (+3.8); phenylalanine (+2.8); cysteine/cystine (+2.5); methionine (+1.9); alanine (+1.8); glycine (-0.4); threonine (-0.7); serine (-0.8); tryptophan (-0.9); tyrosine (-1.3); proline (-1.6); histidine (-3.2); glutamate (-3.5); glutamine (-3.5); aspartate (-3.5); asparagine (-3.5); lysine (-3.9); and arginine (-4.5).

It is known in the art that certain amino acids may be substituted by other amino acids having a similar hydrophobic index or score and still result in a protein with similar biological activity, *i.e.*, still obtain a biological functionally equivalent protein. In making such changes, the substitution of amino acids whose hydrophobic indices are within  $\pm 2$  is preferred, those which are within  $\pm 1$  are particularly preferred, and those within  $\pm 0.5$  are even more particularly preferred.

It is also understood in the art that the substitution of like amino acids can be made effectively on the basis of hydrophilicity. U.S. Patent 4,554,101, incorporated herein by reference, states that the greatest local average hydrophilicity of a protein, as governed by the hydrophilicity of its adjacent amino acids, correlates with a biological property of the protein. As detailed in U.S. Patent 4,554,101, the following hydrophilicity values have been assigned to amino acid residues: arginine (+3.0); lysine (+3.0); aspartate ( $+3.0 \pm 1$ ); glutamate ( $+3.0 \pm 1$ ); serine (+0.3); asparagine (+0.2); glutamine (+0.2); glycine (0); threonine (-0.4); proline ( $-0.5 \pm 1$ ); alanine (-0.5); histidine (-0.5); cysteine (-1.0); methionine (-1.3); valine (-1.5); leucine (-1.8); isoleucine (-1.8); tyrosine (-2.3); phenylalanine (-2.5); tryptophan (-3.4).

It is understood that an amino acid can be substituted for another having a similar hydrophilicity value and still obtain a biologically equivalent and immunologically equivalent protein. In such changes, the substitution of amino acids whose hydrophilicity values are within  $\pm 2$  is preferred, those that are within  $\pm 1$  are particularly preferred, and those within  $\pm 0.5$  are even more particularly preferred.

As outlined above, amino acid substitutions are generally based on the relative similarity of the amino acid side-chain substituents, for example, their hydrophobicity, hydrophilicity, charge, size, and the like. Exemplary substitutions that take various of the foregoing characteristics into consideration are well known to those of skill in the art and include: arginine and lysine; glutamate and aspartate; serine and threonine; glutamine and asparagine; and valine, leucine and isoleucine.

Another embodiment for the preparation of polypeptides according to the invention is the use of peptide mimetics. Mimetics are peptide-containing molecules that mimic elements

WO 02/46419

PCT/US01/49861

of protein secondary structure (Johnson *et al.*, 1993). The underlying rationale behind the use of peptide mimetics is that the peptide backbone of proteins exists chiefly to orient amino acid side chains in such a way as to facilitate molecular interactions, such as those of antibody and antigen. A peptide mimetic is expected to permit molecular interactions similar to the natural molecule. These principles may be used, in conjunction with the principles outlined above, to engineer second generation molecules having many of the natural properties of calsarcin, but with altered and even improved characteristics.

#### 10           D.    Domain Switching

As described in the examples, the present inventors isolated calsarcin. Given the homology between human, mouse and rat calsarcin, determined by standard means in the art, an interesting series of mutants can be created by substituting homologous regions of various proteins. This is known, in certain contexts, as "domain switching."

15           Domain switching involves the generation of chimeric molecules using different but, in this case, related polypeptides. By comparing various calsarcin proteins, one can make predictions as to the functionally significant regions of these molecules. It is possible, then, to switch related domains of these molecules in an effort to determine the criticality of these regions to calsarcin function. These molecules may have additional value in that these "chimeras" can be distinguished from natural molecules, while possibly providing the same function.

#### E.    Fusion Proteins

25           A specialized kind of insertional variant is the fusion protein. This molecule generally has all or a substantial portion of the native molecule, linked at the N- or C-terminus, to all or a portion of a second polypeptide. For example, fusions typically employ leader sequences from other species to permit the recombinant expression of a protein in a heterologous host. Another useful fusion includes the addition of an immunologically active domain, such as an antibody epitope, to facilitate purification of the fusion protein. Inclusion of a cleavage site at or near the fusion junction will facilitate removal of the extraneous polypeptide after purification. Other useful fusions include linking of functional domains, such as active sites from enzymes, glycosylation domains, cellular targeting signals or transmembrane regions. In a specific embodiment a fusion protein comprising calsarcin is utilized to inhibit calcineurin activation of gene transcription in a cell in which the fusion

WO 02/46419

PCT/US01/49861

protein localizes said fusion protein cal sarcin to a subcellular region other than a subcellular region of normal function for said calcineurin. Methods to identify subcellular regions for localization of calcineurin function are well known in the art and include transmission electron microscopy isolation of labeled calcineurin through subcellular fractionation, and immunolocalization. In a specific embodiment a fusion protein comprising cal sarcin also comprises a targeting peptide, wherein the targeting peptide comprises a geranylgeranyl group, a nuclear localization signal, a myristilation signal, or an endoplasmic reticulum signal peptide. In a specific embodiment, a geranylgeranyl group or a myristilation signal target the fusion protein to a membrane.

10

#### F. Purification of Proteins

It is desirable to purify cal sarcin or variants thereof. Protein purification techniques are well known to those of skill in the art. These techniques involve, at one level, the crude fractionation of the cellular milieu to polypeptide and non-polypeptide fractions. Having separated the polypeptide from other proteins, the polypeptide of interest is further purified using chromatographic and electrophoretic techniques to achieve partial or complete purification (or purification to homogeneity). Analytical methods particularly suited to the preparation of a pure peptide include ion-exchange chromatography, exclusion chromatography; polyacrylamide gel electrophoresis; and isoelectric focusing. Particularly efficient methods of purifying peptides are fast protein liquid chromatography and HPLC.

15

Certain aspects of the present invention concern the purification, and in particular embodiments, the substantial purification, of an encoded protein or peptide. The term "purified protein or peptide" as used herein, is intended to refer to a composition, isolatable from other components, wherein the protein or peptide is purified to any degree relative to its naturally-obtainable state. A purified protein or peptide therefore also refers to a protein or peptide, free from the environment in which it may naturally occur.

20

Generally, "purified" will refer to a protein or peptide composition that has been subjected to fractionation to remove various other components, and which composition substantially retains its expressed biological activity. Where the term "substantially purified" is used, this designation will refer to a composition in which the protein or peptide forms the major component of the composition, such as constituting about 50%, about 60%, about 70%, about 80%, about 90%, about 95% or more of the proteins in the composition.

25

Various methods for quantifying the degree of purification of the protein or peptide will be known to those of skill in the art in light of the present disclosure. These include, for

WO 02/46419

PCT/US01/49861

example, determining the specific activity of an active fraction, or assessing the amount of polypeptides within a fraction by SDS/PAGE analysis. A preferred method for assessing the purity of a fraction is to calculate the specific activity of the fraction, to compare it to the specific activity of the initial extract, and to thus calculate the degree of purity, herein  
5 assessed by a “-fold purification number.” The actual units used to represent the amount of activity will, of course, be dependent upon the particular assay technique chosen to follow the purification and whether or not the expressed protein or peptide exhibits a detectable activity.

Various techniques suitable for use in protein purification will be well known to those of skill in the art. These include, for example, precipitation with ammonium sulphate, PEG,  
10 antibodies and the like or by heat denaturation, followed by centrifugation; chromatography steps such as ion exchange, gel filtration, reverse phase, hydroxylapatite and affinity chromatography; isoelectric focusing; gel electrophoresis; and combinations of such and other techniques. As is generally known in the art, it is believed that the order of conducting the various purification steps may be changed, or that certain steps may be omitted, and still  
15 result in a suitable method for the preparation of a substantially purified protein or peptide.

There is no general requirement that the protein or peptide always be provided in their most purified state. Indeed, it is contemplated that less substantially purified products will have utility in certain embodiments. Partial purification may be accomplished by using fewer purification steps in combination, or by utilizing different forms of the same general  
20 purification scheme. For example, it is appreciated that a cation-exchange column chromatography performed utilizing an HPLC apparatus will generally result in a greater “-fold” purification than the same technique utilizing a low pressure chromatography system. Methods exhibiting a lower degree of relative purification may have advantages in total recovery of protein product, or in maintaining the activity of an expressed protein.

It is known that the migration of a polypeptide can vary, sometimes significantly, with different conditions of SDS/PAGE (Capaldi *et al.*, 1977). It will therefore be appreciated that under differing electrophoresis conditions, the apparent molecular weights of purified or partially purified expression products may vary.  
25

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) is characterized by a very rapid separation with extraordinary resolution of peaks. This is achieved by the use of very fine  
30 particles and high pressure to maintain an adequate flow rate. Separation can be accomplished in a matter of minutes, or at most an hour. Moreover, only a very small volume of the sample is needed because the particles are so small and close-packed that the void volume is a very small fraction of the bed volume. Also, the concentration of the

WO 02/46419

PCT/US01/49861

sample need not be very great because the bands are so narrow that there is very little dilution of the sample.

Gel chromatography, or molecular sieve chromatography, is a special type of partition chromatography that is based on molecular size. The theory behind gel chromatography is that the column, which is prepared with tiny particles of an inert substance that contain small pores, separates larger molecules from smaller molecules as they pass through or around the pores, depending on their size. As long as the material of which the particles are made does not adsorb the molecules, the sole factor determining rate of flow is the size. Hence, molecules are eluted from the column in decreasing size, so long as the shape is relatively constant. Gel chromatography is unsurpassed for separating molecules of different size because separation is independent of all other factors such as pH, ionic strength, temperature, etc. There also is virtually no adsorption, less zone spreading and the elution volume is related in a simple matter to molecular weight.

Affinity chromatography is a chromatographic procedure that relies on the specific affinity between a substance to be isolated and a molecule that it can specifically bind to. This is a receptor-ligand type interaction. The column material is synthesized by covalently coupling one of the binding partners to an insoluble matrix. The column material is then able to specifically adsorb the substance from the solution. Elution occurs by changing the conditions to those in which binding will not occur (alter pH, ionic strength, temperature, and the like).

A particular type of affinity chromatography useful in the purification of carbohydrate containing compounds is lectin affinity chromatography. Lectins are a class of substances that bind to a variety of polysaccharides and glycoproteins. Lectins are usually coupled to agarose by cyanogen bromide. Concanavalin A coupled to Sepharose was the first material of this sort to be used and has been widely used in the isolation of polysaccharides and glycoproteins other lectins that have been include lentil lectin, wheat germ agglutinin which has been useful in the purification of N-acetyl glucosaminyl residues and *Helix pomatia* lectin. Lectins themselves are purified using affinity chromatography with carbohydrate ligands. Lactose has been used to purify lectins from castor bean and peanuts; maltose has been useful in extracting lectins from lentils and jack bean; N-acetyl-D galactosamine is used for purifying lectins from soybean; N-acetyl glucosaminyl binds to lectins from wheat germ; D-galactosamine has been used in obtaining lectins from clams and L-fucose will bind to lectins from lotus.

WO 02/46419

PCT/US01/49861

The matrix should be a substance that itself does not adsorb molecules to any significant extent and that has a broad range of chemical, physical and thermal stability. The ligand should be coupled in such a way as to not affect its binding properties. The ligand should also provide relatively tight binding. And it should be possible to elute the substance without destroying the sample or the ligand. One of the most common forms of affinity chromatography is immunoaffinity chromatography. The generation of antibodies that would be suitable for use in accord with the present invention is discussed below.

#### G. Synthetic Peptides

The present invention also describes smaller cal sarcin peptides for use in various embodiments of the present invention. Because of their relatively small size, the peptides of the invention can also be synthesized in solution or on a solid support in accordance with conventional techniques. Various automatic synthesizers are commercially available and can be used in accordance with known protocols. See, for example, Stewart and Young, (1984); Tam *et al.*, (1983); Merrifield, (1986); and Barany and Merrifield (1979), each incorporated herein by reference. Short peptide sequences, or libraries of overlapping peptides, usually from about 6 up to about 35 to 50 amino acids, which correspond to the selected regions described herein, can be readily synthesized and then screened in screening assays designed to identify reactive peptides. Alternatively, recombinant DNA technology may be employed wherein a nucleotide sequence which encodes a peptide of the invention is inserted into an expression vector, transformed or transfected into an appropriate host cell and cultivated under conditions suitable for expression.

#### H. Antigen Compositions

The present invention also provides for the use of cal sarcin proteins or peptides as antigens for the immunization of animals relating to the production of antibodies. It is envisioned that cal sarcin or portions thereof, will be coupled, bonded, bound, conjugated or chemically-linked to one or more agents via linkers, polylinkers or derivatized amino acids. This may be performed such that a bispecific or multivalent composition or vaccine is produced. It is further envisioned that the methods used in the preparation of these compositions will be familiar to those of skill in the art and should be suitable for administration to animals, *i.e.*, pharmaceutically acceptable. Preferred agents are the carriers are keyhole limpet hemocyanin (KLH) or bovine serum albumin (BSA).

WO 02/46419

PCT/US01/49861

## II. Nucleic Acids

The present invention also provides, in another embodiment, nucleic acids encoding cal sarcin. Cal sarcin nucleic acids include human cal sarcin-1, human cal sarcin-2, human cal sarcin-3, mouse cal sarcin-1, mouse cal sarcin-2, and mouse cal sarcin-3. Nucleic acids for human cal sarcin-1 (SEQ ID NO:1) and mouse cal sarcin-1 (SEQ ID NO:3) have been identified. In addition, three mouse cal sarcin-2 ESTs and four human cal sarcin-2 ESTs were identified (see Example 1). The mouse cal sarcin-2 ESTs are as follows: GenBank No. AA036142; GenBank No. AW742494; and GenBank No. W29466. The human cal sarcin-2 ESTs are as follows: GenBank No. AW964108; GenBank No. AA197193; GenBank No. AW000988; and GenBank No. AA176945. In a specific embodiment, the mouse cal sarcin-2 ESTs and the human cal sarcin-2 ESTs are aligned by computer programs known in the art to identify full-length mouse cal sarcin-2 and human cal sarcin-2 sequences respectively. The present invention is not limited in scope to these nucleic acids. However, one of ordinary skill in the art could, using these nucleic acids, readily identify related homologs in various other species (e.g., rat, rabbit, dog, monkey, gibbon, human, chimp, ape, baboon, cow, pig, horse, sheep, cat and other species).

In another specific embodiment, cal sarcin-3 was discovered "in silico" by comparing cal sarcin 1 and cal sarcin 2 sequences with the database. Human genomic DNA (AC008453.3; public not Celera database) containing several homologous sequences was confirmed to be exons of cal sarcin-3. Primers were designed and a human skeletal muscle library was screened for the full-length cDNA for human cal sarcin-3 (FIG 5). Similarly, a mouse skeletal library was screened and several independent and overlapping clones encoding for mouse cal sarcin-3 were identified. The full-length nucleic acid sequences from cDNA and genomic libraries are compared to differentiate between exon and intron sequences (Sambrook, *et al.*, 1989). Furthermore, computer programs well known in the art use the nucleic acid sequence to generate a predicted amino acid sequence.

In addition, it should be clear that the present invention is not limited to the specific nucleic acids disclosed herein. As discussed below, a "cal sarcin nucleic acid" may contain a variety of different bases and yet still produce a corresponding polypeptide that is functionally indistinguishable, and in some cases structurally, from the human and mouse nucleic acids disclosed herein.

Similarly, any reference to a nucleic acid should be read as encompassing a host cell containing that nucleic acid and, in some cases, capable of expressing the product of that nucleic acid. In addition to therapeutic considerations, cells of cell-free systems expressing

WO 02/46419

PCT/US01/49861

nucleic acids of the present invention may prove useful in the context of screening for agents that induce, repress, inhibit, augment, interfere with, block, abrogate, stimulate or enhance the function of cal sarcin.

5           **A. Nucleic Acids Encoding Cal sarcin-1**

Nucleic acids according to the present invention may encode a cal sarcin nucleic acid, a domain of cal sarcin, or any other fragment of cal sarcin-1 as set forth herein. In a preferred embodiment, the nucleic acid encodes a cal sarcin peptide, polypeptide or protein which has functional activity or immunogenic activity. In a specific embodiment, the terms "cal sarcin nucleic acid" or "cal sarcin" refer to a cal sarcin-1, cal sarcin-2 or cal sarcin-3 nucleic acid, a domain of cal sarcin-1, cal sarcin-2 or cal sarcin-3, respectively, or any other fragment of cal sarcin-1, cal sarcin-2 or cal sarcin-3 as set forth herein. The nucleic acid may be derived from genomic DNA, *i.e.*, cloned directly from the genome of a particular organism. In preferred embodiments, however, the nucleic acid would comprise complementary DNA (cDNA). Also contemplated is a cDNA plus a natural intron or an intron derived from another gene; such engineered molecules are sometime referred to as "mini-genes." At a minimum, these and other nucleic acids of the present invention may be used as molecular weight standards in, for example, gel electrophoresis.

The term "cDNA" is intended to refer to DNA prepared using messenger RNA (mRNA) as template. The advantage of using a cDNA, as opposed to genomic DNA or DNA polymerized from a genomic, non- or partially-processed RNA template, is that the cDNA primarily contains coding sequences of the corresponding protein. There may be times when the full or partial genomic sequence is preferred, such as where the non-coding regions are required for optimal expression or where non-coding regions such as introns are to be targeted in an antisense strategy.

It also is contemplated that a given cal sarcin from a given species may be represented by natural variants that have slightly different nucleic acid sequences but, nonetheless, encode the same protein (see Table 1 below).

As used in this application, the term "a nucleic acid encoding cal sarcin" refers to a cal sarcin nucleic acid molecule that has been isolated free of total cellular nucleic acid. In preferred embodiments, the invention concerns a nucleic acid sequence essentially as set forth in SEQ ID NOS:1, 3, 5, 7, 9, or 11. The term "as set forth in SEQ ID NOS:1, 3, 5, 7, 9, or 11" means that the nucleic acid sequence substantially corresponds to a portion of SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9, or 11 respectively. The term "functionally equivalent codon" is used herein

WO 02/46419

PCT/US01/49861

to refer to codons that encode the same amino acid, such as the six codons for arginine or serine (Table 1, below), and also refers to codons that encode biologically equivalent amino acids, as discussed in the following pages.

WO 02/46419

PCT/US01/49861

**TABLE 1**

Amino Acids			Codons
Alanine	Ala	A	GCA GCC GCG GCU
Cysteine	Cys	C	UGC UGU
Aspartic acid	Asp	D	GAC GAU
Glutamic acid	Glu	E	GAA GAG
Phenylalanine	Phe	F	UUC UUU
Glycine	Gly	G	GGA GGC GGG GGU
Histidine	His	H	CAC CAU
Isoleucine	Ile	I	AUA AUC AUU
Lysine	Lys	K	AAA AAG
Leucine	Leu	L	UUA UUG CUA CUC CUG CUU
Methionine	Met	M	AUG
Asparagine	Asn	N	AAC AAU
Proline	Pro	P	CCA CCC CCG CCU
Glutamine	Gln	Q	CAA CAG
Arginine	Arg	R	AGA AGG CGA CGC CGG CGU
Serine	Ser	S	AGC AGU UCA UCC UCG UCU
Threonine	Thr	T	ACA ACC ACG ACU
Valine	Val	V	GUA GUC GUG GUU
Tryptophan	Trp	W	UGG
Tyrosine	Tyr	Y	UAC UAU

WO 02/46419

PCT/US01/49861

Allowing for the degeneracy of the genetic code, sequences that have at least about 50%, usually at least about 60%, more usually about 70%, most usually about 80%, preferably at least about 90% and most preferably about 95% of nucleotides that are identical to the nucleotides of SEQ ID NOS: 1, 3, 5, 7, 9, or 11 are contemplated. Sequences that are essentially the same as those set forth in SEQ ID NOS:1, 3, 5, 7, 9, or 11 also may be functionally defined as sequences that are capable of hybridizing to a nucleic acid segment containing the complement of SEQ ID NOS:1, 3, 5, 7, 9, or 11 respectively, under standard conditions.

The DNA segments of the present invention include those encoding biologically functional equivalent calstarcin proteins and peptides, as described above. Such sequences may arise as a consequence of codon redundancy and amino acid functional equivalency that are known to occur naturally within nucleic acid sequences and the proteins thus encoded. Alternatively, functionally equivalent proteins or peptides may be created via the application of recombinant DNA technology, in which changes in the protein structure may be engineered, based on considerations of the properties of the amino acids being exchanged. Changes designed by man may be introduced through the application of site-directed mutagenesis techniques or may be introduced randomly and screened later for the desired function, as described below.

#### **B. Oligonucleotide Probes and Primers**

Naturally, the present invention also encompasses DNA segments that are complementary, or essentially complementary, to the sequence set forth in SEQ ID NOS:1, 3, 5, 7, 9, or 11. Nucleic acid sequences that are "complementary" are those that are capable of base-pairing according to the standard Watson-Crick complementary rules. As used herein, the term "complementary sequences" means nucleic acid sequences that are substantially complementary, as may be assessed by the same nucleotide comparison set forth above, or as defined as being capable of hybridizing to the nucleic acid segment of SEQ ID NOS:1, 3, 5, 7, 9, or 11, respectively, under relatively stringent conditions such as those described herein. Such sequences may encode the entire calstarcin polypeptides or proteins, or functional or non-functional fragments thereof.

Alternatively, the hybridizing segments may be shorter oligonucleotides. Sequences of 17 bases long should occur only once in the human genome and, therefore, suffice to specify a unique target sequence. Although shorter oligomers are easier to make and increase *in vivo* accessibility, numerous other factors are involved in determining the specificity of

WO 02/46419

PCT/US01/49861

hybridization. Both binding affinity and sequence specificity of an oligonucleotide to its complementary target increases with increasing length. It is contemplated that exemplary oligonucleotides of 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 or more base pairs will be used, although others are contemplated. Longer polynucleotides encoding 250, 500, 1000, 1212, 1500, 2000, 2500, or 3000 bases and longer are contemplated as well. Such oligonucleotides will find use, for example, as probes in Southern and Northern blots and as primers in amplification reactions.

Suitable hybridization conditions will be well known to those of skill in the art. In certain applications, for example, substitution of amino acids by site-directed mutagenesis, it is appreciated that lower stringency conditions are required. Under these conditions, hybridization may occur even though the sequences of probe and target strand are not perfectly complementary, but are mismatched at one or more positions. Conditions may be rendered less stringent by increasing salt concentration and decreasing temperature. For example, a medium stringency condition could be provided by about 0.1 to 0.25 M NaCl at temperatures of about 37°C to about 55°C, while a low stringency condition could be provided by about 0.15 M to about 0.9 M salt, at temperatures ranging from about 20°C to about 55°C. Thus, hybridization conditions can be readily manipulated, and thus will generally be a method of choice depending on the desired results.

In other embodiments, hybridization may be achieved under conditions of, for example, 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dithiothreitol, at temperatures between approximately 20°C to about 37°C. Other hybridization conditions utilized could include approximately 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, at temperatures ranging from approximately 40°C to about 72°C. Formamide and SDS also may be used to alter the hybridization conditions.

One method of using probes and primers of the present invention is in the search for genes related to calsarcin or, more particularly, homologs of calsarcin from other species. Normally, the target DNA will be a genomic or cDNA library, although screening may involve analysis of RNA molecules. By varying the stringency of hybridization, and the region of the probe, different degrees of homology may be discovered.

Another way of exploiting probes and primers of the present invention is in site-directed, or site-specific mutagenesis. Site-specific mutagenesis is a technique useful in the preparation of individual peptides, or biologically functional equivalent proteins or peptides, through specific mutagenesis of the underlying DNA. The technique further provides a ready

WO 02/46419

PCT/US01/49861

ability to prepare and test sequence variants, incorporating one or more of the foregoing considerations, by introducing one or more nucleotide sequence changes into the DNA. Site-specific mutagenesis allows the production of mutants through the use of specific oligonucleotide sequences which encode the DNA sequence of the desired mutation, as well as a sufficient number of adjacent nucleotides, to provide a primer sequence of sufficient size and sequence complexity to form a stable duplex on both sides of the deletion junction being traversed. Typically, a primer of about 17 to 25 nucleotides in length is preferred, with about 5 to 10 residues on both sides of the junction of the sequence being altered.

The technique typically employs a bacteriophage vector that exists in both a single stranded and double stranded form. Typical vectors useful in site-directed mutagenesis include vectors such as the M13 phage. These phage vectors are commercially available and their use is generally well known to those skilled in the art. Double stranded plasmids are also routinely employed in site directed mutagenesis, which eliminates the step of transferring the gene of interest from a phage to a plasmid.

In general, site-directed mutagenesis is performed by first obtaining a single-stranded vector, or melting of two strands of a double-stranded vector which includes within its sequence a DNA sequence encoding the desired protein. An oligonucleotide primer bearing the desired mutated sequence is synthetically prepared. This primer is then annealed with the single-stranded DNA preparation, taking into account the degree of mismatch when selecting hybridization conditions, and subjected to DNA polymerizing enzymes such as *E. coli* polymerase I Klenow fragment, in order to complete the synthesis of the mutation-bearing strand. Thus, a heteroduplex is formed wherein one strand encodes the original non-mutated sequence and the second strand bears the desired mutation. This heteroduplex vector is then used to transform appropriate cells, such as *E. coli* cells, and clones are selected that include recombinant vectors bearing the mutated sequence arrangement.

The preparation of sequence variants of the selected gene using site-directed mutagenesis is provided as a means of producing potentially useful species and is not meant to be limiting, as there are other ways in which sequence variants of genes may be obtained. For example, recombinant vectors encoding the desired gene may be treated with mutagenic agents, such as hydroxylamine, to obtain sequence variants.

### C. Antisense Constructs

Antisense methodology takes advantage of the fact that nucleic acids tend to pair with "complementary" sequences. By complementary, it is meant that polynucleotides are those

WO 02/46419

PCT/US01/49861

which are capable of base-pairing according to the standard Watson-Crick complementarity rules. That is, the larger purines will base pair with the smaller pyrimidines to form combinations of guanine paired with cytosine (G:C) and adenine paired with either thymine (A:T) in the case of DNA, or adenine paired with uracil (A:U) in the case of RNA. Inclusion of less common bases such as inosine, 5-methylcytosine, 6-methyladenine, hypoxanthine and others in hybridizing sequences does not interfere with pairing.

5 Targeting double-stranded (ds) DNA with polynucleotides leads to triple-helix formation; targeting RNA will lead to double-helix formation. Antisense polynucleotides, when introduced into a target cell, specifically bind to their target polynucleotide and interfere with transcription, RNA processing, transport, translation and/or stability. Antisense RNA constructs, or DNA encoding such antisense RNA's, may be employed to inhibit gene transcription or translation or both within a host cell, either *in vitro* or *in vivo*, such as within a host animal, including a human subject.

15 Antisense constructs may be designed to bind to the promoter and other control regions, exons, introns or even exon-intron boundaries of a gene. It is contemplated that the most effective antisense constructs will include regions complementary to exon/intron splice junctions. Thus, it is proposed that a preferred embodiment includes an antisense construct with complementarity to regions within 50-200 bases of an intron-exon splice junction. It has been observed that some exon sequences can be included in the construct without seriously affecting the target selectivity thereof. The amount of exonic material included will vary depending on the particular exon and intron sequences used. One can readily test whether too much exon DNA is included simply by testing the constructs *in vitro* to determine whether normal cellular function is affected or whether the expression of related genes having complementary sequences is affected.

25 As stated above, "complementary" or "antisense" means polynucleotide sequences that are substantially complementary over their entire length and have very few base mismatches. For example, sequences of fifteen bases in length may be termed complementary when they have complementary nucleotides at thirteen or fourteen positions. Naturally, sequences which are completely complementary will be sequences which are entirely complementary throughout their entire length and have no base mismatches. Other sequences with lower degrees of homology also are contemplated. For example, an antisense construct which has limited regions of high homology, but also contains a non-homologous region (e.g., ribozyme; see below) could be designed. These molecules, though having less than 50% homology, would bind to target sequences under appropriate conditions.

WO 02/46419

PCT/US01/49861

It may be advantageous to combine portions of genomic DNA with cDNA or synthetic sequences to generate specific constructs. For example, where an intron is desired in the ultimate construct, a genomic clone will need to be used. The cDNA or a synthesized polynucleotide may provide more convenient restriction sites for the remaining portion of the construct and, therefore, would be used for the rest of the sequence.

#### D. Ribozymes

Although proteins traditionally have been used for catalysis of nucleic acids, another class of macromolecules has emerged as useful in this endeavor. Ribozymes are RNA-protein complexes that cleave nucleic acids in a site-specific fashion. Ribozymes have specific catalytic domains that possess endonuclease activity (Kim and Cook, 1987; Gerlach *et al.*, 1987; Forster and Symons, 1987). For example, a large number of ribozymes accelerate phosphoester transfer reactions with a high degree of specificity, often cleaving only one of several phosphoesters in an oligonucleotide substrate (Cook *et al.*, 1981; Michel and Westhof, 1990; Reinhold-Hurek and Shub, 1992). This specificity has been attributed to the requirement that the substrate bind via specific base-pairing interactions to the internal guide sequence ("IGS") of the ribozyme prior to chemical reaction.

Ribozyme catalysis has primarily been observed as part of sequence-specific cleavage/ligation reactions involving nucleic acids (Joyce, 1989; Cook *et al.*, 1981). For example, U.S. Patent 5,354,855 reports that certain ribozymes can act as endonucleases with a sequence specificity greater than that of known ribonucleases and approaching that of the DNA restriction enzymes. Thus, sequence-specific ribozyme-mediated inhibition of gene expression may be particularly suited to therapeutic applications (Scanlon *et al.*, 1991; Sarver *et al.*, 1990). Recently, it was reported that ribozymes elicited genetic changes in some cell lines to which they were applied; the altered genes included the oncogenes H-ras, c-fos and genes of HIV. Most of this work involved the modification of a target mRNA, based on a specific mutant codon that is cleaved by a specific ribozyme.

#### E. Vectors for Cloning, Gene Transfer and Expression

Within certain embodiments expression vectors are employed to express a calsarcin polypeptide product, which can then be purified and, for example, be used to vaccinate animals to generate antisera or monoclonal antibody with which further studies may be conducted. In other embodiments, the expression vectors are used in gene therapy. Expression requires that appropriate signals be provided in the vectors, and which include

WO 02/46419

PCT/US01/49861

various regulatory elements, such as enhancers/promoters from both viral and mammalian sources that drive expression of the genes of interest in host cells. Elements designed to optimize messenger RNA stability and translatability in host cells also are defined. The conditions for the use of a number of dominant drug selection markers for establishing permanent, stable cell clones expressing the products are also provided, as is an element that links expression of the drug selection markers to expression of the polypeptide.

**(i) Regulatory Elements**

Throughout this application, the term "expression construct" is meant to include any type of genetic construct containing a nucleic acid coding for a gene product in which part or all of the nucleic acid encoding sequence is capable of being transcribed. The transcript may be translated into a protein, but it need not be. In certain embodiments, expression includes both transcription of a gene and translation of mRNA into a gene product. In other embodiments, expression only includes transcription of the nucleic acid encoding a gene of interest.

In certain embodiments, the nucleic acid encoding a gene product is under transcriptional control of a promoter. A "promoter" refers to a DNA sequence recognized by the synthetic machinery of the cell, or introduced synthetic machinery, required to initiate the specific transcription of a gene. The phrase "under transcriptional control" means that the promoter is in the correct location and orientation in relation to the nucleic acid to control RNA polymerase initiation and expression of the gene.

The term promoter will be used here to refer to a group of transcriptional control modules that are clustered around the initiation site for RNA polymerase II. Much of the thinking about how promoters are organized derives from analyses of several viral promoters, including those for the HSV thymidine kinase (*tk*) and SV40 early transcription units. These studies, augmented by more recent work, have shown that promoters are composed of discrete functional modules, each consisting of approximately 7-20 bp of DNA, and containing one or more recognition sites for transcriptional activator or repressor proteins.

At least one module in each promoter functions to position the start site for RNA synthesis. The best known example of this is the TATA box, but in some promoters lacking a TATA box, such as the promoter for the mammalian terminal deoxynucleotidyl transferase gene and the promoter for the SV40 late genes, a discrete element overlying the start site itself helps to fix the place of initiation.

WO 02/46419

PCT/US01/49861

Additional promoter elements regulate the frequency of transcriptional initiation. Typically, these are located in the region 30-110 bp upstream of the start site, although a number of promoters have recently been shown to contain functional elements downstream of the start site as well. The spacing between promoter elements frequently is flexible, so that promoter function is preserved when elements are inverted or moved relative to one another. In the tk promoter, the spacing between promoter elements can be increased to 50 bp apart before activity begins to decline. Depending on the promoter, it appears that individual elements can function either co-operatively or independently to activate transcription.

In certain embodiments, the native calsarcin promoter will be employed to drive expression of either the corresponding calsarcin nucleic acid, a heterologous calsarcin nucleic acid, a screenable or selectable marker nucleic acid, or any other nucleic acid of interest.

In other embodiments, the human cytomegalovirus (CMV) immediate early gene promoter, the SV40 early promoter, the Rous sarcoma virus long terminal repeat, rat insulin promoter and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase can be used to obtain high-level expression of the coding sequence of interest. The use of other viral or mammalian cellular or bacterial phage promoters which are well-known in the art to achieve expression of a coding sequence of interest is contemplated as well, provided that the levels of expression are sufficient for a given purpose.

By employing a promoter with well-known properties, the level and pattern of expression of the protein of interest following transfection or transformation can be optimized. Further, selection of a promoter that is regulated in response to specific physiologic signals can permit inducible expression of the gene product. Tables 2 and 3 list several regulatory elements that may be employed, in the context of the present invention, to regulate the expression of the gene of interest. This list is not intended to be exhaustive of all the possible elements involved in the promotion of gene expression but, merely, to be exemplary thereof.

Enhancers are genetic elements that increase transcription from a promoter located at a distant position on the same molecule of DNA. Enhancers are organized much like promoters. That is, they are composed of many individual elements, each of which binds to one or more transcriptional proteins.

The basic distinction between enhancers and promoters is operational. An enhancer region as a whole must be able to stimulate transcription at a distance; this need not be true of a promoter region or its component elements. On the other hand, a promoter must have one or more elements that direct initiation of RNA synthesis at a particular site and in a particular

WO 02/46419

PCT/US01/49861

orientation, whereas enhancers lack these specificities. Promoters and enhancers are often overlapping and contiguous, often seeming to have a very similar modular organization.

Below is a list of viral promoters, cellular promoters/enhancers and inducible promoters/enhancers that could be used in combination with the nucleic acid encoding a gene of interest in an expression construct (Table 2 and Table 3). Additionally, any  
5 promoter/enhancer combination (as per the Eukaryotic Promoter Data Base EPDB) could also be used to drive expression of the gene. Eukaryotic cells can support cytoplasmic transcription from certain bacterial promoters if the appropriate bacterial polymerase is provided, either as part of the delivery complex or as an additional genetic expression  
10 construct.

WO 02/46419

PCT/US01/49861

Promoter/Enhancer	References
Immunoglobulin Heavy Chain	Banerji <i>et al.</i> , 1983; Gilles <i>et al.</i> , 1983; Grosschedl <i>et al.</i> , 1985; Atchinson <i>et al.</i> , 1986, 1987; Imler <i>et al.</i> , 1987; Weinberger <i>et al.</i> , 1984; Kiledjian <i>et al.</i> , 1988; Porton <i>et al.</i> , 1990
Immunoglobulin Light Chain	Queen <i>et al.</i> , 1983; Picard <i>et al.</i> , 1984
T-Cell Receptor	Luria <i>et al.</i> , 1987; Winoto <i>et al.</i> , 1989; Redondo <i>et al.</i> , 1990
HLA DQ a and/or DQ	Sullivan <i>et al.</i> , 1987
Interferon	Goodbourn <i>et al.</i> , 1986; Fujita <i>et al.</i> , 1987; Goodbourn <i>et al.</i> , 1988
Interleukin-2	Greene <i>et al.</i> , 1989
Interleukin-2 Receptor	Greene <i>et al.</i> , 1989; Lin <i>et al.</i> , 1990
MHC Class II 5	Koch <i>et al.</i> , 1989
MHC Class II HLA-DRA	Sherman <i>et al.</i> , 1989
-Actin	Kawamoto <i>et al.</i> , 1988; Ng <i>et al.</i> , 1989
Muscle Creatine Kinase (MCK)	Jaynes <i>et al.</i> , 1988; Horlick <i>et al.</i> , 1989; Johnson <i>et al.</i> , 1989
Prealbumin (Transthyretin)	Costa <i>et al.</i> , 1988
Elastase 1	Ornitz <i>et al.</i> , 1987
Metallothionein (MTII)	Karin <i>et al.</i> , 1987; Culotta <i>et al.</i> , 1989
Collagenase	Pinkert <i>et al.</i> , 1987; Angel <i>et al.</i> , 1987a
Albumin	Pinkert <i>et al.</i> , 1987; Tronche <i>et al.</i> , 1989, 1990
-Fetoprotein	Godbout <i>et al.</i> , 1988; Campere <i>et al.</i> , 1989
t-Globin	Bodine <i>et al.</i> , 1987; Perez-Stable <i>et al.</i> , 1990

WO 02/46419

PCT/US01/49861

-Globin	Trudel <i>et al.</i> , 1987
c-fos	Cohen <i>et al.</i> , 1987
c-HA-ras	Triesman, 1986; Deschamps <i>et al.</i> , 1985
Insulin	Edlund <i>et al.</i> , 1985
Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM)	Hirsh <i>et al.</i> , 1990
$\beta$ -Antitrypsin	Latimer <i>et al.</i> , 1990
H2B (TH2B) Histone	Hwang <i>et al.</i> , 1990
Mouse and/or Type I Collagen	Ripe <i>et al.</i> , 1989
Glucose-Regulated Proteins (GRP94 and GRP78)	Chang <i>et al.</i> , 1989
Rat Growth Hormone	Larsen <i>et al.</i> , 1986
Human Serum Amyloid A (SAA)	Edbrooke <i>et al.</i> , 1989
Troponin I (TN I)	Yutzey <i>et al.</i> , 1989
Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)	Pech <i>et al.</i> , 1989
Duchenne Muscular Dystrophy	Klamut <i>et al.</i> , 1990
SV40	Banerji <i>et al.</i> , 1981; Moreau <i>et al.</i> , 1981; Sleight <i>et al.</i> , 1985; Firak <i>et al.</i> , 1986; Herr <i>et al.</i> , 1986; Imbra <i>et al.</i> , 1986; Kadesch <i>et al.</i> , 1986; Wang <i>et al.</i> , 1986; Ondek <i>et al.</i> , 1987; Kuhl <i>et al.</i> , 1987; Schaffner <i>et al.</i> , 1988
Polyoma	Swartzendruber <i>et al.</i> , 1975; Vasseur <i>et al.</i> , 1980; Katinka <i>et al.</i> , 1980, 1981; Tyndell <i>et al.</i> , 1981; Dandolo <i>et al.</i> , 1983; de Villiers <i>et al.</i> , 1984; Hen <i>et al.</i> , 1986; Satake <i>et al.</i> , 1988; Campbell and/or Villarreal, 1988
Retroviruses	Kriegler <i>et al.</i> , 1982, 1983; Levinson <i>et al.</i> , 1982; Kriegler <i>et al.</i> , 1983, 1984a, b, 1988; Bosze <i>et al.</i> , 1986; Miksicsek <i>et al.</i> , 1986; Celander <i>et al.</i> , 1987; Thiesen <i>et al.</i> , 1988; Celander <i>et al.</i> , 1988; Choi <i>et al.</i> , 1988; Reisman <i>et al.</i> , 1989

WO 02/46419

PCT/US01/49861

Papilloma Virus	Campo <i>et al.</i> , 1983; Lusky <i>et al.</i> , 1983; Spandidos and/or Wilkie, 1983; Spalholz <i>et al.</i> , 1985; Lusky <i>et al.</i> , 1986; Cripe <i>et al.</i> , 1987; Gloss <i>et al.</i> , 1987; Hirochika <i>et al.</i> , 1987; Stephens <i>et al.</i> , 1987; Glue <i>et al.</i> , 1988
Hepatitis B Virus	Bulla <i>et al.</i> , 1986; Jameel <i>et al.</i> , 1986; Shaul <i>et al.</i> , 1987; Spandau <i>et al.</i> , 1988; Vannice <i>et al.</i> , 1988
Human Immunodeficiency Virus	Muesing <i>et al.</i> , 1987; Hauber <i>et al.</i> , 1988; Jakobovits <i>et al.</i> , 1988; Feng <i>et al.</i> , 1988; Takebe <i>et al.</i> , 1988; Rosen <i>et al.</i> , 1988; Berkhout <i>et al.</i> , 1989; Laspia <i>et al.</i> , 1989; Sharp <i>et al.</i> , 1989; Braddock <i>et al.</i> , 1989
Cytomegalovirus (CMV)	Weber <i>et al.</i> , 1984; Boshart <i>et al.</i> , 1985; Foecking <i>et al.</i> , 1986
Gibbon Ape Leukemia Virus	Holbrook <i>et al.</i> , 1987; Quinn <i>et al.</i> , 1989

TABLE 3		
Inducible Elements		
Element	Inducer	References
MT II	Phorbol Ester (TFA) Heavy metals	Palmiter <i>et al.</i> , 1982; Haslinger <i>et al.</i> , 1985; Searle <i>et al.</i> , 1985; Stuart <i>et al.</i> , 1985; Imagawa <i>et al.</i> , 1987; Karin <i>et al.</i> , 1987; Angel <i>et al.</i> , 1987b; McNeill <i>et al.</i> , 1989
MMTV (mouse mammary tumor virus)	Glucocorticoids	Huang <i>et al.</i> , 1981; Lee <i>et al.</i> , 1981; Majors <i>et al.</i> , 1983; Chandler <i>et al.</i> , 1983; Lee <i>et al.</i> , 1984; Ponta <i>et al.</i> , 1985; Sakai <i>et al.</i> , 1988
Interferon	poly(rl)x poly(rc)	Tavernier <i>et al.</i> , 1983
Adenovirus 5 E2	EIA	Imperiale <i>et al.</i> , 1984
Collagenase	Phorbol Ester (TPA)	Angel <i>et al.</i> , 1987a
Stromelysin	Phorbol Ester (TPA)	Angel <i>et al.</i> , 1987b

WO 02/46419

PCT/US01/49861

SV40	Phorbol Ester (TPA)	Angel <i>et al.</i> , 1987b
Murine MX Gene	Interferon, Newcastle Disease Virus	Hug <i>et al.</i> , 1988
GRP78 Gene	A23187	Resendez <i>et al.</i> , 1988
-2-Macroglobulin	IL-6	Kunz <i>et al.</i> , 1989
Vimentin	Serum	Rittling <i>et al.</i> , 1989
MHC Class I Gene H-2b	Interferon	Blanar <i>et al.</i> , 1989
HSP70	EIA, SV40 Large T Antigen	Taylor <i>et al.</i> , 1989, 1990a, 1990b
Proliferin	Phorbol Ester-TPA	Mordacq <i>et al.</i> , 1989
Tumor Necrosis Factor	PMA	Hensel <i>et al.</i> , 1989
Thyroid Stimulating Hormone Gene	Thyroid Hormone	Chatterjee <i>et al.</i> , 1989

Of particular interest are muscle specific promoters, and more particularly, cardiac specific promoters. These include the myosin light chain-2 promoter (Franz *et al.*, 1994; Kelly *et al.*, 1995), the  $\alpha$  actin promoter (Moss *et al.*, 1996), the troponin 1 promoter (Bhavsar *et al.*, 1996); the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger promoter (Barnes *et al.*, 1997), the dystrophin promoter (Kimura *et al.*, 1997), the creatine kinase promoter (Ritchie, 1996), the  $\alpha 7$  integrin promoter (Ziobar and Kramer, 1996), the brain natriuretic peptide promoter (LaPointe *et al.*, 1996) and the  $\alpha$  B-crystallin/small heat shock protein promoter (Gopal-Srivastava *et al.*, 1995).

10 Where a cDNA insert is employed, one will typically desire to include a polyadenylation signal to effect proper polyadenylation of the gene transcript. The nature of the polyadenylation signal is not believed to be crucial to the successful practice of the invention, and any such sequence may be employed such as human growth hormone and SV40 polyadenylation signals. Also contemplated as an element of the expression cassette is  
 15 a terminator. These elements can serve to enhance message levels and to minimize read through from the cassette into other sequences.

WO 02/46419

PCT/US01/49861

**(ii) Selectable Markers**

In certain embodiments of the invention, the cells contain nucleic acid constructs of the present invention, a cell may be identified *in vitro* or *in vivo* by including a marker in the expression construct. Such markers would confer an identifiable change to the cell permitting easy identification of cells containing the expression construct. Usually the inclusion of a drug selection marker aids in cloning and in the selection of transformants, for example, genes that confer resistance to neomycin, puromycin, hygromycin, DHFR, GPT, zeocin and histidinol are useful selectable markers. Alternatively, enzymes such as herpes simplex virus thymidine kinase (*tk*) or chloramphenicol acetyltransferase (CAT) may be employed. Immunologic markers also can be employed. The selectable marker employed is not believed to be important, so long as it is capable of being expressed simultaneously with the nucleic acid encoding a gene product. Further examples of selectable markers are well known to one of skill in the art.

**15 (iii) Multigene Constructs and IRES**

In certain embodiments of the invention, the use of internal ribosome binding sites (IRES) elements are used to create multigene, or polycistronic, messages. IRES elements are able to bypass the ribosome scanning model of 5' methylated Cap dependent translation and begin translation at internal sites (Pelletier and Sonenberg, 1988). IRES elements from two members of the picornavirus family (polio and encephalomyocarditis) have been described (Pelletier and Sonenberg, 1988), as well an IRES from a mammalian message (Macejak and Samow, 1991). IRES elements can be linked to heterologous open reading frames. Multiple open reading frames can be transcribed together, each separated by an IRES, creating polycistronic messages. By virtue of the IRES element, each open reading frame is accessible to ribosomes for efficient translation. Multiple genes can be efficiently expressed using a single promoter/enhancer to transcribe a single message.

Any heterologous open reading frame can be linked to IRES elements. This includes genes for secreted proteins, multi-subunit proteins, encoded by independent genes, intracellular or membrane-bound proteins and selectable markers. In this way, expression of several proteins can be simultaneously engineered into a cell with a single construct and a single selectable marker.

WO 02/46419

PCT/US01/49861

**(iv) Bidirectional Promoters**

In other embodiments of the present invention, a bidirectional promoter is utilized to create multiple species of messages. For example, the aldehyde reductase bidirectional promoter (Barski *et al.*, 1999) is capable of generating transcription in opposite directions to stoichiometric levels. Thus, a skilled artisan may utilize a promoter such as the bidirectional aldehyde reductase promoter to simultaneously generate two species of messages while concomitantly conserving on space required to be present or cloned into an expression vector. The gene product generated by the bidirectional promoter could be RNA or protein, and the bidirectional promoter could transcribe a reporter gene message and a calsarcin message, calcineurin message, or  $\alpha$ -actinin message, in addition to any sequence of interest.

**(v) Reporter Sequences**

The term "reporter sequence" as used herein is defined as the nucleotide sequence which when expressed can be detected. The expressed product itself can be detected, such as an RNA or protein, or a metabolite or other characteristic secondarily affected by the reporter product can be detected. The skilled artisan recognizes that any reporter gene that could be detected by transcutaneous monitoring, by visualization with UV light, by visualization with infrared light, or by visualization with other imaging techniques, such as X-ray or MRI, would be of obvious value. Any tissue or body fluid or cell culture or cell free extract is sampled depending on the marker used. For example, fluorescence, colorimetric assays, secreted proteins, histological markers, visible changes in a transgenic animal and other markers used by those skilled in the art may be utilized to reflect the expression of a specific nucleic acid. Examples of reporter sequences include chloramphenicol acetyltransferase (CAT), green fluorescent protein (GFP), enhanced GFP, blue fluorescent protein,  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucuronidase and luciferase. In a specific embodiment a reporter gene containing an epitope tag is monitored.

**(vi) Delivery of Expression Vectors**

One of the therapeutic embodiments contemplated by the present inventors is the intervention, at the molecular level, in the events involved in cardiac failure. Specifically, the present inventors intend to provide, to a cardiac cell, an expression construct capable of providing a calsarcin to that cell. The lengthy discussion of expression vectors and the genetic elements employed therein is incorporated into this section by reference. Particularly

WO 02/46419

PCT/US01/49861

preferred expression vectors are viral vectors such as adenovirus, adeno-associated virus, herpesvirus, vaccinia virus and retrovirus. Also preferred is liposomally-encapsulated expression vector.

Those of skill in the art are well aware of how to apply gene delivery to *in vivo* situations. For viral vectors, one generally will prepare a viral vector stock. Depending on the kind of virus and the titer attainable, one will deliver  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$  or  $1 \times 10^{12}$  infectious particles to the patient. Similar figures may be extrapolated for liposomal or other non-viral formulations by comparing relative uptake efficiencies. Formulation as a pharmaceutically acceptable composition is discussed below. Various routes are contemplated, but local provision to the heart and systemic provision (intraarterial or intravenous) are preferred.

There are a number of ways in which expression vectors may be introduced into cells. In certain embodiments of the invention, the expression construct comprises a virus or engineered construct derived from a viral genome. The ability of certain viruses to enter cells via receptor-mediated endocytosis, to integrate into host cell genome and express viral genes stably and efficiently have made them attractive candidates for the transfer of foreign genes into mammalian cells (Ridgeway, 1988; Nicolas and Rubenstein, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Temin, 1986). The first viruses used as gene vectors were DNA viruses including the papovaviruses (simian virus 40, bovine papilloma virus, and polyoma) (Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986) and adenoviruses (Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986). These have a relatively low capacity for foreign DNA sequences and have a restricted host spectrum. Furthermore, their oncogenic potential and cytopathic effects in permissive cells raise safety concerns. They can accommodate only up to 8 kB of foreign genetic material but can be readily introduced in a variety of cell lines and laboratory animals (Nicolas and Rubenstein, 1988; Temin, 1986).

One of the preferred methods for *in vivo* delivery involves the use of an adenovirus expression vector. "Adenovirus expression vector" is meant to include those constructs containing adenovirus sequences sufficient to (a) support packaging of the construct and (b) to express an antisense polynucleotide that has been cloned therein. In this context, expression does not require that the gene product be synthesized.

The expression vector comprises a genetically engineered form of adenovirus. Knowledge of the genetic organization of adenovirus, a 36 kB, linear, double-stranded DNA virus, allows substitution of large pieces of adenoviral DNA with foreign sequences up to 7

WO 02/46419

PCT/US01/49861

kB (Grunhaus and Horwitz, 1992). In contrast to retrovirus, the adenoviral infection of host cells does not result in chromosomal integration because adenoviral DNA can replicate in an episomal manner without potential genotoxicity. Also, adenoviruses are structurally stable, and no genome rearrangement has been detected after extensive amplification. Adenovirus can infect virtually all epithelial cells regardless of their cell cycle stage. So far, adenoviral infection appears to be linked only to mild disease such as acute respiratory disease in humans.

Adenovirus is particularly suitable for use as a gene transfer vector because of its mid-sized genome, ease of manipulation, high titer, wide target cell range and high infectivity. Both ends of the viral genome contain 100-200 base pair inverted repeats (ITRs), which are *cis* elements necessary for viral DNA replication and packaging. The early (E) and late (L) regions of the genome contain different transcription units that are divided by the onset of viral DNA replication. The E1 region (E1A and E1B) encodes proteins responsible for the regulation of transcription of the viral genome and a few cellular genes. The expression of the E2 region (E2A and E2B) results in the synthesis of the proteins for viral DNA replication. These proteins are involved in DNA replication, late gene expression and host cell shut-off (Renan, 1990). The products of the late genes, including the majority of the viral capsid proteins, are expressed only after significant processing of a single primary transcript issued by the major late promoter (MLP). The MLP, (located at 16.8 m.u.) is particularly efficient during the late phase of infection, and all the mRNA's issued from this promoter possess a 5'-tripartite leader (TPL) sequence which makes them preferred mRNA's for translation.

In a current system, recombinant adenovirus is generated from homologous recombination between shuttle vector and provirus vector. Due to the possible recombination between two proviral vectors, wild-type adenovirus may be generated from this process. Therefore, it is critical to isolate a single clone of virus from an individual plaque and examine its genomic structure.

Generation and propagation of the current adenovirus vectors, which are replication deficient, depend on a unique helper cell line, designated 293, which was transformed from human embryonic kidney cells by Ad5 DNA fragments and constitutively expresses E1 proteins (Graham *et al.*, 1977). Since the E3 region is dispensable from the adenovirus genome (Jones and Shenk, 1978), the current adenovirus vectors, with the help of 293 cells, carry foreign DNA in either the E1, the D3 or both regions (Graham and Prevac, 1991). In nature, adenovirus can package approximately 105% of the wild-type genome (Ghosh-

WO 02/46419

PCT/US01/49861

Choudhury *et al.*, 1987), providing capacity for about 2 extra kb of DNA. Combined with the approximately 5.5 kb of DNA that is replaceable in the E1 and E3 regions, the maximum capacity of the current adenovirus vector is under 7.5 kb, or about 15% of the total length of the vector. More than 80% of the adenovirus viral genome remains in the vector backbone and is the source of vector-borne cytotoxicity. Also, the replication deficiency of the E1-deleted virus is incomplete. For example, leakage of viral gene expression has been observed with the currently available vectors at high multiplicities of infection (MOI) (Mulligan, 1993).

Helper cell lines may be derived from human cells such as human embryonic kidney cells, muscle cells, hematopoietic cells or other human embryonic mesenchymal or epithelial cells. Alternatively, the helper cells may be derived from the cells of other mammalian species that are permissive for human adenovirus. Such cells include, *e.g.*, Vero cells or other monkey embryonic mesenchymal or epithelial cells. As stated above, the preferred helper cell line is 293.

Racher *et al.* (1995) disclosed improved methods for culturing 293 cells and propagating adenovirus. In one format, natural cell aggregates are grown by inoculating individual cells into 1 liter siliconized spinner flasks (Techne, Cambridge, UK) containing 100-200 ml of medium. Following stirring at 40 rpm, the cell viability is estimated with trypan blue. In another format, Fibra-Cel microcarriers (Bibby Sterlin, Stone, UK) (5 g/l) is employed as follows. A cell inoculum, resuspended in 5 ml of medium, is added to the carrier (50 ml) in a 250 ml Erlenmeyer flask and left stationary, with occasional agitation, for 1 to 4 h. The medium is then replaced with 50 ml of fresh medium and shaking initiated. For virus production, cells are allowed to grow to about 80% confluence, after which time the medium is replaced (to 25% of the final volume) and adenovirus added at an MOI of 0.05. Cultures are left stationary overnight, following which the volume is increased to 100% and shaking commenced for another 72 h.

Other than the requirement that the adenovirus vector be replication defective, or at least conditionally defective, the nature of the adenovirus vector is not believed to be crucial to the successful practice of the invention. The adenovirus may be of any of the 42 different known serotypes or subgroups A-F. Adenovirus type 5 of subgroup C is the preferred starting material in order to obtain the conditional replication-defective adenovirus vector for use in the present invention. This is because Adenovirus type 5 is a human adenovirus about which a great deal of biochemical and genetic information is known, and it has historically been used for most constructions employing adenovirus as a vector.

WO 02/46419

PCT/US01/49861

As stated above, the typical vector according to the present invention is replication defective and will not have an adenovirus E1 region. Thus, it will be most convenient to introduce the polynucleotide encoding the gene of interest at the position from which the E1-coding sequences have been removed. However, the position of insertion of the construct within the adenovirus sequences is not critical to the invention. The polynucleotide encoding the gene of interest may also be inserted in lieu of the deleted E3 region in E3 replacement vectors, as described by Karlsson *et al.* (1986), or in the E4 region where a helper cell line or helper virus complements the E4 defect.

Adenovirus is easy to grow and manipulate and exhibits broad host range *in vitro* and *in vivo*. This group of viruses can be obtained in high titers, *e.g.*,  $10^9$ - $10^{12}$  plaque-forming units per ml, and they are highly infective. The life cycle of adenovirus does not require integration into the host cell genome. The foreign genes delivered by adenovirus vectors are episomal and, therefore, have low genotoxicity to host cells. No side effects have been reported in studies of vaccination with wild-type adenovirus (Couch *et al.*, 1963; Top *et al.*, 1971), demonstrating their safety and therapeutic potential as *in vivo* gene transfer vectors.

Adenovirus vectors have been used in eukaryotic gene expression (Levrero *et al.*, 1991; Gomez-Foix *et al.*, 1992) and vaccine development (Grunhaus and Horwitz, 1992; Graham and Prevec, 1991). Recently, animal studies suggested that recombinant adenovirus could be used for gene therapy (Stratford-Perricaudet and Perricaudet, 1991; Stratford-Perricaudet *et al.*, 1990; Rich *et al.*, 1993). Studies in administering recombinant adenovirus to different tissues include trachea instillation (Rosenfeld *et al.*, 1991; Rosenfeld *et al.*, 1992), muscle injection (Ragot *et al.*, 1993), peripheral intravenous injections (Herz and Gerard, 1993) and stereotactic inoculation into the brain (Le Gal La Salle *et al.*, 1993).

The retroviruses are a group of single-stranded RNA viruses characterized by an ability to convert their RNA to double-stranded DNA in infected cells by a process of reverse-transcription (Coffin, 1990). The resulting DNA then stably integrates into cellular chromosomes as a provirus and directs synthesis of viral proteins. The integration results in the retention of the viral gene sequences in the recipient cell and its descendants. The retroviral genome contains three genes, *gag*, *pol*, and *env* that code for capsid proteins, polymerase enzyme, and envelope components, respectively. A sequence found upstream from the *gag* gene contains a signal for packaging of the genome into virions. Two long terminal repeat (LTR) sequences are present at the 5' and 3' ends of the viral genome. These

WO 02/46419

PCT/US01/49861

contain strong promoter and enhancer sequences and are also required for integration in the host cell genome (Coffin, 1990).

In order to construct a retroviral vector, a nucleic acid encoding a gene of interest is inserted into the viral genome in the place of certain viral sequences to produce a virus that is replication-defective. In order to produce virions, a packaging cell line containing the gag, pol, and env genes but without the LTR and packaging components is constructed (Mann *et al.*, 1983). When a recombinant plasmid containing a cDNA, together with the retroviral LTR and packaging sequences is introduced into this cell line (by calcium phosphate precipitation, for example), the packaging sequence allows the RNA transcript of the recombinant plasmid to be packaged into viral particles, which are then secreted into the culture media (Nicolas and Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann *et al.*, 1983). The media containing the recombinant retroviruses is then collected, optionally concentrated, and used for gene transfer. Retroviral vectors are able to infect a broad variety of cell types. However, integration and stable expression require the division of host cells (Paskind *et al.*, 1975).

A novel approach designed to allow specific targeting of retrovirus vectors was recently developed based on the chemical modification of a retrovirus by the chemical addition of lactose residues to the viral envelope. This modification could permit the specific infection of hepatocytes via sialoglycoprotein receptors.

A different approach to targeting of recombinant retroviruses was designed in which biotinylated antibodies against a retroviral envelope protein and against a specific cell receptor were used. The antibodies were coupled via the biotin components by using streptavidin (Roux *et al.*, 1989). Using antibodies against major histocompatibility complex class I and class II antigens, they demonstrated the infection of a variety of human cells that bore those surface antigens with an ecotropic virus *in vitro* (Roux *et al.*, 1989).

There are certain limitations to the use of retrovirus vectors in all aspects of the present invention. For example, retrovirus vectors usually integrate into random sites in the cell genome. This can lead to insertional mutagenesis through the interruption of host genes or through the insertion of viral regulatory sequences that can interfere with the function of flanking genes (Varmus *et al.*, 1981). Another concern with the use of defective retrovirus vectors is the potential appearance of wild-type replication-competent virus in the packaging cells. This can result from recombination events in which the intact sequence from the recombinant virus inserts upstream from the gag, pol, env sequence integrated in the host cell genome. However, new packaging cell lines are now available that should greatly decrease the likelihood of recombination (Markowitz *et al.*, 1988; Hersdorffer *et al.*, 1990).

WO 02/46419

PCT/US01/49861

Other viral vectors may be employed as expression constructs in the present invention. Vectors derived from viruses such as vaccinia virus (Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Coupar *et al.*, 1988) adeno-associated virus (AAV) (Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Hermonat and Muzycska, 1984) and herpesviruses may be employed. They offer several attractive features for various mammalian cells (Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Baichwal and Sugden, 1986; Coupar *et al.*, 1988; Horwich *et al.*, 1990).

With the recent recognition of defective hepatitis B viruses, new insight was gained into the structure-function relationship of different viral sequences. *In vitro* studies showed that the virus could retain the ability for helper-dependent packaging and reverse transcription despite the deletion of up to 80% of its genome (Horwich *et al.*, 1990). This suggested that large portions of the genome could be replaced with foreign genetic material. The hepatotropism and persistence (integration) were particularly attractive properties for liver-directed gene transfer. Chang *et al.*, recently introduced the chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene into duck hepatitis B virus genome in the place of the polymerase, surface, and pre-surface coding sequences. It was co-transfected with wild-type virus into an avian hepatoma cell line. Culture media containing high titers of the recombinant virus were used to infect primary duckling hepatocytes. Stable CAT gene expression was detected for at least 24 days after transfection (Chang *et al.*, 1991).

In order to effect expression of sense or antisense gene constructs, the expression construct must be delivered into a cell. This delivery may be accomplished *in vitro*, as in laboratory procedures for transforming cells lines, or *in vivo* or *ex vivo*, as in the treatment of certain disease states. One mechanism for delivery is *via* viral infection where the expression construct is encapsidated in an infectious viral particle.

Several non-viral methods for the transfer of expression constructs into cultured mammalian cells also are contemplated by the present invention. These include calcium phosphate precipitation (Graham and Van Der Eb, 1973; Chen and Okayama, 1987; Rippe *et al.*, 1990) DEAE-dextran (Gopal, 1985), electroporation (Tur-Kaspa *et al.*, 1986; Potter *et al.*, 1984), direct microinjection (Harland and Weintraub, 1985), DNA-loaded liposomes (Nicolau and Sene, 1982; Fraley *et al.*, 1979) and lipofectamine-DNA complexes, cell sonication (Fechheimer *et al.*, 1987), gene bombardment using high velocity microprojectiles (Yang *et al.*, 1990), and receptor-mediated transfection (Wu and Wu, 1987; Wu and Wu, 1988). Some of these techniques may be successfully adapted for *in vivo* or *ex vivo* use.

WO 02/46419

PCT/US01/49861

Once the expression construct has been delivered into the cell the nucleic acid encoding the gene of interest may be positioned and expressed at different sites. In certain embodiments, the nucleic acid encoding the gene may be stably integrated into the genome of the cell. This integration may be in the cognate location and orientation via homologous recombination (gene replacement) or it may be integrated in a random, non-specific location  
5 (gene augmentation). In yet further embodiments, the nucleic acid may be stably maintained in the cell as a separate, episomal segment of DNA. Such nucleic acid segments or "episomes" encode sequences sufficient to permit maintenance and replication independent of or in synchronization with the host cell cycle. How the expression construct is delivered to a  
10 cell and where in the cell the nucleic acid remains is dependent on the type of expression construct employed.

In yet another embodiment of the invention, the expression construct may simply consist of naked recombinant DNA or plasmids. Transfer of the construct may be performed by any of the methods mentioned above which physically or chemically permeabilize the cell  
15 membrane. This is particularly applicable for transfer *in vitro* but it may be applied to *in vivo* use as well. Dubensky *et al.* (1984) successfully injected polyomavirus DNA in the form of calcium phosphate precipitates into liver and spleen of adult and newborn mice demonstrating active viral replication and acute infection. Benvenisty and Neshif (1986) also demonstrated that direct intraperitoneal injection of calcium phosphate-precipitated plasmids  
20 results in expression of the transfected genes. It is envisioned that DNA encoding a gene of interest may also be transferred in a similar manner *in vivo* and express the gene product.

In still another embodiment of the invention for transferring a naked DNA expression construct into cells may involve particle bombardment. This method depends on the ability to accelerate DNA-coated microprojectiles to a high velocity allowing them to pierce cell  
25 membranes and enter cells without killing them (Klein *et al.*, 1987). Several devices for accelerating small particles have been developed. One such device relies on a high voltage discharge to generate an electrical current, which in turn provides the motive force (Yang *et al.*, 1990). The microprojectiles used have consisted of biologically inert substances such as tungsten or gold beads.

30 Selected organs including the liver, skin, and muscle tissue of rats and mice have been bombarded *in vivo* (Yang *et al.*, 1990; Zelenin *et al.*, 1991). This may require surgical exposure of the tissue or cells, to eliminate any intervening tissue between the gun and the target organ, *i.e.*, *ex vivo* treatment. Again, DNA encoding a particular gene may be delivered via this method and still be incorporated by the present invention.

WO 02/46419

PCT/US01/49861

In a further embodiment of the invention, the expression construct may be entrapped in a liposome. Liposomes are vesicular structures characterized by a phospholipid bilayer membrane and an inner aqueous medium. Multilamellar liposomes have multiple lipid layers separated by aqueous medium. They form spontaneously when phospholipids are suspended  
5 in an excess of aqueous solution. The lipid components undergo self-rearrangement before the formation of closed structures and entrap water and dissolved solutes between the lipid bilayers (Ghosh and Bachhawat, 1991). Also contemplated are lipofectamine-DNA complexes.

Liposome-mediated nucleic acid delivery and expression of foreign DNA *in vitro* has  
10 been very successful. Wong *et al.* (1980) demonstrated the feasibility of liposome-mediated delivery and expression of foreign DNA in cultured chick embryo, HeLa and hepatoma cells. Nicolau *et al.* (1987) accomplished successful liposome-mediated gene transfer in rats after intravenous injection.

In certain embodiments of the invention, the liposome may be complexed with a  
15 hemagglutinating virus (HVJ). This has been shown to facilitate fusion with the cell membrane and promote cell entry of liposome-encapsulated DNA (Kaneda *et al.*, 1989). In other embodiments, the liposome may be complexed or employed in conjunction with nuclear non-histone chromosomal proteins (HMG-1) (Kato *et al.*, 1991). In yet further embodiments, the liposome may be complexed or employed in conjunction with both HVJ  
20 and HMG-1. In that such expression constructs have been successfully employed in transfer and expression of nucleic acid *in vitro* and *in vivo*, then they are applicable for the present invention. Where a bacterial promoter is employed in the DNA construct, it also will be desirable to include within the liposome an appropriate bacterial polymerase.

Other expression constructs which can be employed to deliver a nucleic acid encoding  
25 a particular gene into cells are receptor-mediated delivery vehicles. These take advantage of the selective uptake of macromolecules by receptor-mediated endocytosis in almost all eukaryotic cells. Because of the cell type-specific distribution of various receptors, the delivery can be highly specific (Wu and Wu, 1993).

Receptor-mediated gene targeting vehicles generally consist of two components: a  
30 cell receptor-specific ligand and a DNA-binding agent. Several ligands have been used for receptor-mediated gene transfer. The most extensively characterized ligands are asialoorosomucoid (ASOR) (Wu and Wu, 1987) and transferrin (Wagner *et al.*, 1990). Recently, a synthetic neoglycoprotein, which recognizes the same receptor as ASOR, has been used as a gene delivery vehicle (Ferkol *et al.*, 1993; Perales *et al.*, 1994) and epidermal

WO 02/46419

PCT/US01/49861

growth factor (EGF) has also been used to deliver genes to squamous carcinoma cells (Myers, EPO 0273085).

In other embodiments, the delivery vehicle may comprise a ligand and a liposome. For example, Nicolau *et al.* (1987) employed lactosyl-ceramide, a galactose-terminal asialganglioside, incorporated into liposomes and observed an increase in the uptake of the insulin gene by hepatocytes. Thus, it is feasible that a nucleic acid encoding a particular gene also may be specifically delivered into a cell type by any number of receptor-ligand systems with or without liposomes. For example, epidermal growth factor (EGF) may be used as the receptor for mediated delivery of a nucleic acid into cells that exhibit upregulation of EGF receptor. Mannose can be used to target the mannose receptor on liver cells. Also, antibodies to CD5 (CLL), CD22 (lymphoma), CD25 (T-cell leukemia) and MAA (melanoma) can similarly be used as targeting moieties.

In certain embodiments, gene transfer may more easily be performed under *ex vivo* conditions. *Ex vivo* gene therapy refers to the isolation of cells from an animal, the delivery of a nucleic acid into the cells *in vitro*, and then the return of the modified cells back into an animal. This may involve the surgical removal of tissue/organs from an animal or the primary culture of cells and tissues.

#### F. Nucleic Acid Detection

Nucleic acid used is isolated from cells contained in the biological sample, according to standard methodologies (Sambrook *et al.*, 1989). The nucleic acid may be genomic DNA or fractionated or whole cell RNA. Where RNA is used, it may be desired to convert the RNA to a complementary DNA. In one embodiment, the RNA is whole cell RNA; in another, it is poly-A RNA. Normally, the nucleic acid is amplified.

Depending on the format, the specific nucleic acid of interest is identified in the sample directly using amplification or with a second, known nucleic acid following amplification. Next, the identified product is detected. In certain applications, the detection may be performed by visual means (*e.g.*, ethidium bromide staining of a gel). Alternatively, the detection may involve indirect identification of the product via chemiluminescence, radioactive scintigraphy of radiolabel or fluorescent label or even via a system using electrical or thermal impulse signals (Affymax Technology; Bellus, 1994).

WO 02/46419

PCT/US01/49861

**(i) Primers and Probes**

The term primer, as defined herein, is meant to encompass any nucleic acid that is capable of priming the synthesis of a nascent nucleic acid in a template-dependent process. Typically, primers are oligonucleotides from ten to twenty base pairs in length, but longer sequences can be employed. Primers may be provided in double-stranded or single-stranded form, although the single-stranded form is preferred. Probes are defined differently, although they may act as primers. Probes, while perhaps capable of priming, are designed to binding to the target DNA or RNA and need not be used in an amplification process.

In preferred embodiments, the probes or primers are labeled with radioactive species ( $^{32}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^3\text{H}$ , or other label), with a fluorophore (rhodamine, fluorescein) or a chemiluminescent (luciferase).

**(ii) Template Dependent Amplification Methods**

A number of template dependent processes are available to amplify the marker sequences present in a given template sample. One of the best known amplification methods is the polymerase chain reaction (referred to as PCR<sup>TM</sup>) which is described in detail in U.S. Patents 4,683,195, 4,683,202 and 4,800,159, and in Innis *et al.*, 1990, each of which is incorporated herein by reference in its entirety.

Briefly, in PCR, two primer sequences are prepared that are complementary to regions on opposite complementary strands of the marker sequence. An excess of deoxynucleoside triphosphates are added to a reaction mixture along with a DNA polymerase, *e.g.*, *Taq* polymerase. If the marker sequence is present in a sample, the primers will bind to the marker and the polymerase will cause the primers to be extended along the marker sequence by adding on nucleotides. By raising and lowering the temperature of the reaction mixture, the extended primers will dissociate from the marker to form reaction products, excess primers will bind to the marker and to the reaction products and the process is repeated.

A reverse transcriptase PCR amplification procedure may be performed in order to quantify the amount of mRNA amplified. Methods of reverse transcribing RNA into cDNA are well known and described in Sambrook *et al.* (1989). Alternative methods for reverse transcription utilize thermostable, RNA-dependent DNA polymerases. These methods are described in WO 90/07641 filed December 21, 1990. Polymerase chain reaction methodologies are well known in the art.

WO 02/46419

PCT/US01/49861

Another method for amplification is the ligase chain reaction ("LCR"), disclosed in EPA No. 320 308, incorporated herein by reference in its entirety. In LCR, two complementary probe pairs are prepared, and in the presence of the target sequence, each pair will bind to opposite complementary strands of the target such that they abut. In the presence of a ligase, the two probe pairs will link to form a single unit. By temperature cycling, as in PCR, bound ligated units dissociate from the target and then serve as "target sequences" for ligation of excess probe pairs. U.S. Patent 4,883,750 describes a method similar to LCR for binding probe pairs to a target sequence.

Methods based on ligation of two (or more) oligonucleotides in the presence of nucleic acid having the sequence of the resulting "di-oligonucleotide", thereby amplifying the di-oligonucleotide, may also be used in the amplification step of the present invention. Wu *et al.*, (1989), incorporated herein by reference in its entirety.

#### (iii) Southern/Northern Blotting

Blotting techniques are well known to those of skill in the art. Southern blotting involves the use of DNA as a target, whereas Northern blotting involves the use of RNA as a target. Each provide different types of information, although cDNA blotting is analogous, in many aspects, to blotting of RNA species.

Briefly, a probe is used to target a DNA or RNA species that has been immobilized on a suitable matrix, often a filter of nitrocellulose. The different species should be spatially separated to facilitate analysis. This often is accomplished by gel electrophoresis of nucleic acid species followed by "blotting" on to the filter.

Subsequently, the blotted target is incubated with a probe (usually labeled) under conditions that promote denaturation and rehybridization. Because the probe is designed to base pair with the target, the probe will bind a portion of the target sequence under renaturing conditions. Unbound probe is then removed, and detection is accomplished as described above.

#### (iv) Separation Methods

It normally is desirable, at one stage or another, to separate the amplification product from the template and the excess primer for the purpose of determining whether specific amplification has occurred. In one embodiment, amplification products are separated by agarose, agarose-acrylamide or polyacrylamide gel electrophoresis using standard methods. See Sambrook *et al.*, 1989.

WO 02/46419

PCT/US01/49861

Alternatively, chromatographic techniques may be employed to effect separation. There are many kinds of chromatography which may be used in the present invention: adsorption, partition, ion-exchange and molecular sieve, and many specialized techniques for using them including column, paper, thin-layer and gas chromatography (Freifelder, 1982).

5 (v) **Detection Methods**

Products may be visualized in order to confirm amplification of the marker sequences. One typical visualization method involves staining of a gel with ethidium bromide and visualization under UV light. Alternatively, if the amplification products are integrally labeled with radio- or fluorometrically-labeled nucleotides, the amplification products can then be exposed to x-ray film or visualized under the appropriate stimulating spectra, following separation.

In one embodiment, visualization is achieved indirectly. Following separation of amplification products, a labeled nucleic acid probe is brought into contact with the amplified marker sequence. The probe preferably is conjugated to a chromophore but may be radiolabeled. In another embodiment, the probe is conjugated to a binding partner, such as an antibody or biotin, and the other member of the binding pair carries a detectable moiety.

In one embodiment, detection is by a labeled probe. The techniques involved are well known to those of skill in the art and can be found in many standard books on molecular protocols. See Sambrook *et al.* (1989). For example, chromophore or radiolabel probes or primers identify the target during or following amplification.

One example of the foregoing is described in U.S. Patent 5,279,721, incorporated by reference herein, which discloses an apparatus and method for the automated electrophoresis and transfer of nucleic acids. The apparatus permits electrophoresis and blotting without external manipulation of the gel and is ideally suited to carrying out methods according to the present invention.

In addition, the amplification products described above may be subjected to sequence analysis to identify specific kinds of variations using standard sequence analysis techniques. Within certain methods, exhaustive analysis of genes is carried out by sequence analysis using primer sets designed for optimal sequencing (Pignon *et al.*, 1994). The present invention provides methods by which any or all of these types of analyses may be used. Using the sequences disclosed herein, oligonucleotide primers may be designed to permit the amplification of sequences throughout the calsarcin genes that may then be analyzed by direct sequencing.

WO 02/46419

PCT/US01/49861

**(vi) Kit Components**

All the essential materials and reagents required for detecting and sequencing a  
5 calarscin and variants thereof may be assembled together in a kit. This generally will  
comprise preselected primers and probes. Also included may be enzymes suitable for  
amplifying nucleic acids including various polymerases (RT, *Taq*, Sequenase<sup>TM</sup> *etc.*),  
deoxynucleotides and buffers to provide the necessary reaction mixture for amplification.  
Such kits also generally will comprise, in suitable means, distinct containers for each  
10 individual reagent and enzyme as well as for each primer or probe.

**III. Generating Antibodies Reactive With Calsarcin**

In another aspect, the present invention contemplates an antibody that is  
immunoreactive with a calarscin molecule of the present invention, or any portion thereof.  
15 An antibody can be a polyclonal or a monoclonal antibody. In a preferred embodiment, an  
antibody is a monoclonal antibody. Means for preparing and characterizing antibodies are  
well known in the art (see, *e.g.*, Harlow and Lane, 1988).

Briefly, a polyclonal antibody is prepared by immunizing an animal with an  
immunogen comprising a polypeptide of the present invention and collecting antisera from  
20 that immunized animal. A wide range of animal species can be used for the production of  
antisera. Typically an animal used for production of anti-antisera is a non-human animal  
including rabbits, mice, rats, hamsters, pigs or horses. Because of the relatively large blood  
volume of rabbits, a rabbit is a preferred choice for production of polyclonal antibodies.

Antibodies, both polyclonal and monoclonal, specific for isoforms of antigen may be  
25 prepared using conventional immunization techniques, as will be generally known to those of  
skill in the art. A composition containing antigenic epitopes of the compounds of the present  
invention can be used to immunize one or more experimental animals, such as a rabbit or  
mouse, which will then proceed to produce specific antibodies against the compounds of the  
present invention. Polyclonal antisera may be obtained, after allowing time for antibody  
30 generation, simply by bleeding the animal and preparing serum samples from the whole  
blood.

It is proposed that the monoclonal antibodies of the present invention will find useful  
application in standard immunochemical procedures, such as ELISA and Western blot

WO 02/46419

PCT/US01/49861

methods and in immunohistochemical procedures such as tissue staining, as well as in other procedures which may utilize antibodies specific to cal sarcin-related antigen epitopes. Additionally, it is proposed that monoclonal antibodies specific to the particular cal sarcin of different species may be utilized in other useful applications

5 In general, both polyclonal and monoclonal antibodies against cal sarcin may be used in a variety of embodiments. For example, they may be employed in antibody cloning protocols to obtain cDNAs or genes encoding other cal sarcins. They may also be used in inhibition studies to analyze the effects of cal sarcin-related peptides in cells or animals. Cal sarcin antibodies will also be useful in immunolocalization studies to analyze the  
10 distribution of cal sarcin during various cellular events, for example, to determine the cellular or tissue-specific distribution of cal sarcin polypeptides, respectively, under different points in the cell cycle. A particularly useful application of such antibodies is in purifying native or recombinant cal sarcin, for example, using an antibody affinity column. The operation of all such immunological techniques will be known to those of skill in the art in light of the  
15 present disclosure.

Means for preparing and characterizing antibodies are well known in the art (see, e.g., Harlow and Lane, 1988; incorporated herein by reference). More specific examples of monoclonal antibody preparation are given in the examples below.

As is well known in the art, a given composition may vary in its immunogenicity. It  
20 is often necessary therefore to boost the host immune system, as may be achieved by coupling a peptide or polypeptide immunogen to a carrier. Exemplary and preferred carriers are keyhole limpet hemocyanin (KLH) and bovine serum albumin (BSA). Other albumins such as ovalbumin, mouse serum albumin or rabbit serum albumin can also be used as carriers. Means for conjugating a polypeptide to a carrier protein are well known in the art  
25 and include glutaraldehyde, *m*-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester, carbodiimide and bis-biazotized benzidine.

As also is well known in the art, the immunogenicity of a particular immunogen composition can be enhanced by the use of non-specific stimulstors of the immune response, known as adjuvants. Exemplary and preferred adjuvants include complete Freund's adjuvant  
30 (a non-specific stimulator of the immune response containing killed *Mycobacterium tuberculosis*), incomplete Freund's adjuvants and aluminum hydroxide adjuvant.

The amount of immunogen composition used in the production of polyclonal antibodies varies upon the nature of the immunogen as well as the animal used for immunization. A variety of routes can be used to administer the immunogen (subcutaneous,

WO 02/46419

PCT/US01/49861

intramuscular, intradermal, intravenous and intraperitoneal). The production of polyclonal antibodies may be monitored by sampling blood of the immunized animal at various points following immunization. A second, booster, injection may also be given. The process of boosting and titering is repeated until a suitable titer is achieved. When a desired level of immunogenicity is obtained, the immunized animal can be bled and the serum isolated and stored, and/or the animal can be used to generate mAbs.

MABs may be readily prepared through use of well-known techniques, such as those exemplified in U.S. Patent 4,196,265, incorporated herein by reference. Typically, this technique involves immunizing a suitable animal with a selected immunogen composition, e.g., a purified or partially purified calsarcin protein, polypeptide or peptide or cell expressing high levels of calsarcin. The immunizing composition is administered in a manner effective to stimulate antibody producing cells. Rodents such as mice and rats are preferred animals, however, the use of rabbit, sheep frog cells is also possible. The use of rats may provide certain advantages (Goding, 1986), but mice are preferred, with the BALB/c mouse being most preferred as this is most routinely used and generally gives a higher percentage of stable fusions.

Antibodies of the present invention can be used in characterizing the calsarcin content of healthy and diseased tissues, through techniques such as ELISAs and Western blotting. This may provide a screen for the presence or absence of cardiomyopathy or as a predictor of heart disease.

The use of antibodies of the present invention in an ELISA assay is contemplated. For example, anti-calsarcin-1 or anti-calsarcin-2 antibodies are immobilized onto a selected surface, preferably a surface exhibiting a protein affinity such as the wells of a polystyrene microtiter plate. After washing to remove incompletely adsorbed material, it is desirable to bind or coat the assay plate wells with a non-specific protein that is known to be antigenically neutral with regard to the test antisera such as bovine serum albumin (BSA), casein or solutions of powdered milk. This allows for blocking of non-specific adsorption sites on the immobilizing surface and thus reduces the background caused by non-specific binding of antigen onto the surface.

After binding of antibody to the well, coating with a non-reactive material to reduce background, and washing to remove unbound material, the immobilizing surface is contacted with the sample to be tested in a manner conducive to immune complex (antigen/antibody) formation.

WO 02/46419

PCT/US01/49861

Following formation of specific immunocomplexes between the test sample and the bound antibody, and subsequent washing, the occurrence and even amount of immunocomplex formation may be determined by subjecting same to a second antibody having specificity for calstabin-1 that differs from the first antibody. Appropriate conditions preferably include diluting the sample with diluents such as BSA, bovine gamma globulin (BGG) and phosphate buffered saline (PBS)/Tween<sup>®</sup>. These added agents also tend to assist in the reduction of nonspecific background. The layered antisera is then allowed to incubate for from about 2 to about 4 hr, at temperatures preferably on the order of about 25° to about 27°C. Following incubation, the antisera-contacted surface is washed so as to remove non-immunocomplexed material. A preferred washing procedure includes washing with a solution such as PBS/Tween<sup>®</sup>, or borate buffer.

To provide a detecting means, the second antibody will preferably have an associated enzyme that will generate a color development upon incubating with an appropriate chromogenic substrate. Thus, for example, one will desire to contact and incubate the second antibody-bound surface with a urease or peroxidase-conjugated anti-human IgG for a period of time and under conditions which favor the development of immunocomplex formation (*e.g.*, incubation for 2 hr at room temperature in a PBS-containing solution such as PBS/Tween<sup>®</sup>).

After incubation with the second enzyme-tagged antibody, and subsequent to washing to remove unbound material, the amount of label is quantified by incubation with a chromogenic substrate such as urea and bromocresol purple or 2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, in the case of peroxidase as the enzyme label. Quantitation is then achieved by measuring the degree of color generation, *e.g.*, using a visible spectrum spectrophotometer.

The preceding format may be altered by first binding the sample to the assay plate. Then, primary antibody is incubated with the assay plate, followed by detecting of bound primary antibody using a labeled second antibody with specificity for the primary antibody.

The antibody compositions of the present invention will find great use in immunoblot or Western blot analysis. The antibodies may be used as high-affinity primary reagents for the identification of proteins immobilized onto a solid support matrix, such as nitrocellulose, nylon or combinations thereof. In conjunction with immunoprecipitation, followed by gel electrophoresis, these may be used as a single step reagent for use in detecting antigens against which secondary reagents used in the detection of the antigen cause an adverse

WO 02/46419

PCT/US01/49861

background. Immunologically-based detection methods for use in conjunction with Western blotting include enzymatically-, radiolabel-, or fluorescently-tagged secondary antibodies against the toxin moiety are considered to be of particular use in this regard.

#### 5 IV. Combined Therapy

In many clinical situations, it is advisable to use a combination of distinct therapies. Thus, it is envisioned that, in addition to the therapies described herein, one would also wish to provide to the patient more "standard" pharmaceutical cardiac therapies. Examples of standard therapies include so-called "beta blockers", anti-hypertensives, cardiotonics, anti-  
10 thrombotics, vasodilators, hormone antagonists, endothelin antagonists, calcium channel blockers, phosphodiesterase inhibitors, angiotensin type 2 antagonists and cytokine blockers/inhibitors. Also envisioned are combinations with pharmaceuticals identified according to the screening methods described herein.

Combinations may be achieved by contacting cardiac cells with a single composition  
15 or pharmacological formulation that includes both agents, or by contacting the cell with two distinct compositions or formulations, at the same time, wherein one composition includes the expression construct and the other includes the agent. Alternatively, gene therapy may precede or follow the other agent treatment by intervals ranging from minutes to weeks. In  
20 embodiments where the other agent and expression construct are applied separately to the cell, one would generally ensure that a significant period of time did not expire between the time of each delivery, such that the agent and expression construct would still be able to exert an advantageously combined effect on the cell. In such instances, it is contemplated that one would contact the cell with both modalities within about 12-24 hours of each other and, more preferably, within about 6-12 hours of each other, with a delay time of only about 12 hours  
25 being most preferred. In some situations, it may be desirable to extend the time period for treatment significantly, however, where several days (2, 3, 4, 5, 6 or 7) to several weeks (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 or 8) lapse between the respective administrations.

It also is conceivable that more than one administration of calstabin, or the other agent will be desired. Various combinations may be employed, where calstabin is "A" and the  
30 other agent is "B", as exemplified below:

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B B/A/A A/B/B B/B/B/A B/B/A/B

A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B B/B/B/A

WO 02/46419

PCT/US01/49861

A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A A/B/B/B B/A/B/B B/B/A/B

Other combinations are contemplated as well.

#### V. Formulations and Routes for Administration to Patients

5 Where clinical applications are contemplated, it will be necessary to prepare pharmaceutical compositions - expression vectors, virus stocks and drugs - in a form appropriate for the intended application. Generally, this will entail preparing compositions that are essentially free of pyrogens, as well as other impurities that could be harmful to humans or animals.

10 One will generally desire to employ appropriate salts and buffers to render delivery vectors stable and allow for uptake by target cells. Buffers also will be employed when recombinant cells are introduced into a patient. Aqueous compositions of the present invention comprise an effective amount of the vector to cells, dissolved or dispersed in a pharmaceutically acceptable carrier or aqueous medium. Such compositions also are referred  
15 to as inocula. The phrase "pharmaceutically or pharmacologically acceptable" refer to molecular entities and compositions that do not produce adverse, allergic, or other untoward reactions when administered to an animal or a human. As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents and the like. The use of such  
20 media and agents for pharmaceutically active substances is well know in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the vectors or cells of the present invention, its use in therapeutic compositions is contemplated. Supplementary active ingredients also can be incorporated into the compositions.

The active compositions of the present invention may include classic pharmaceutical  
25 preparations. Administration of these compositions according to the present invention will be via any common route so long as the target tissue is available via that route. This includes oral, nasal, buccal, rectal, vaginal or topical. Alternatively, administration may be by orthotopic, intradermal, subcutaneous, intramuscular, intraperitoneal or intravenous injection. Such compositions would normally be administered as pharmaceutically acceptable  
30 compositions, described *supra*.

The active compounds may also be administered parenterally or intraperitoneally. Solutions of the active compounds as free base or pharmacologically acceptable salts can be prepared in water suitably mixed with a surfactant, such as hydroxypropylcellulose. Dispersions can also be prepared in glycerol, liquid polyethylene glycols, and mixtures

WO 02/46419

PCT/US01/49861

thereof and in oils. Under ordinary conditions of storage and use, these preparations contain a preservative to prevent the growth of microorganisms.

The pharmaceutical forms suitable for injectable use include sterile aqueous solutions or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersions. In all cases the form must be sterile and must be fluid to the extent that easy syringability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms, such as bacteria and fungi. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), suitable mixtures thereof, and vegetable oils. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating, such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. The prevention of the action of microorganisms can be brought about by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid, thimerosal, and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars or sodium chloride. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by the use in the compositions of agents delaying absorption, for example, aluminum monostearate and gelatin.

Sterile injectable solutions are prepared by incorporating the active compounds in the required amount in the appropriate solvent with various of the other ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the various sterilized active ingredients into a sterile vehicle which contains the basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the preferred methods of preparation are vacuum-drying and freeze-drying techniques which yield a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof.

As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents and the like. The use of such media and agents for pharmaceutical active substances is well known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the active ingredient, its use in the therapeutic compositions is contemplated. Supplementary active ingredients can also be incorporated into the compositions.

WO 02/46419

PCT/US01/49861

For oral administration the polypeptides of the present invention may be incorporated with excipients and used in the form of non-ingestible mouthwashes and dentifrices. A mouthwash may be prepared incorporating the active ingredient in the required amount in an appropriate solvent, such as a sodium borate solution (Dobell's Solution). Alternatively, the active ingredient may be incorporated into an antiseptic wash containing sodium borate, glycerin and potassium bicarbonate. The active ingredient may also be dispersed in dentifrices, including: gels, pastes, powders and slurries. The active ingredient may be added in a therapeutically effective amount to a paste dentifrice that may include water, binders, abrasives, flavoring agents, foaming agents, and humectants.

The compositions of the present invention may be formulated in a neutral or salt form. Pharmaceutically-acceptable salts include the acid addition salts (formed with the free amino groups of the protein) and which are formed with inorganic acids such as, for example, hydrochloric or phosphoric acids, or such organic acids as acetic, oxalic, tartaric, mandelic, and the like. Salts formed with the free carboxyl groups can also be derived from inorganic bases such as, for example, sodium, potassium, ammonium, calcium, or ferric hydroxides, and such organic bases as isopropylamine, trimethylamine, histidine, procaine and the like.

Upon formulation, solutions will be administered in a manner compatible with the dosage formulation and in such amount as is therapeutically effective. The formulations are easily administered in a variety of dosage forms such as injectable solutions, drug release capsules and the like. For parenteral administration in an aqueous solution, for example, the solution should be suitably buffered if necessary and the liquid diluent first rendered isotonic with sufficient saline or glucose. These particular aqueous solutions are especially suitable for intravenous, intramuscular, subcutaneous and intraperitoneal administration. In this connection, sterile aqueous media which can be employed will be known to those of skill in the art in light of the present disclosure. For example, one dosage could be dissolved in 1 ml of isotonic NaCl solution and either added to 1000 ml of hypodermoclysis fluid or injected at the proposed site of infusion, (see for example, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580). Some variation in dosage will necessarily occur depending on the condition of the subject being treated. The person responsible for administration will, in any event, determine the appropriate dose for the individual subject. Moreover, for human administration, preparations should meet sterility, pyrogenicity, general safety and purity standards as required by FDA Office of Biologics standards.

WO 02/46419

PCT/US01/49861

**VI. Methods of Making Transgenic Mice**

A particular embodiment of the present invention provides transgenic animals that contain cal sarcin-related constructs. Transgenic animals expressing cal sarcin, recombinant cell lines derived from such animals, and transgenic embryos may be useful in methods for screening for and identifying agents that interact with cal sarcin, respectively, modulate binding of cal sarcin to  $\alpha$ -actinin, telethonin, or calcineurin or affect cardiac hypertrophy or heart failure through utilization of cal sarcin. The use of constitutively expressed cal sarcin provides a model for over- or unregulated expression, compared to normal basal expression levels. Also, transgenic animals which are "knocked out" for cal sarcin are utilized, such as for screening methods or as models for therapeutic assays for candidate compounds.

**A. Methods of Producing Transgenics**

In a general aspect, a transgenic animal is produced by the integration of a given transgene into the genome in a manner that permits the expression of the transgene. Methods for producing transgenic animals are generally described by Wagner and Hoppe (U.S. Patent 4,873,191; which is incorporated herein by reference), Brinster *et al.* 1985; which is incorporated herein by reference in its entirety) and in "Manipulating the Mouse Embryo; A Laboratory Manual" 2nd edition (eds., Hogan, Beddington, Costantini and Long, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994; which is incorporated herein by reference in its entirety).

Typically, a gene flanked by genomic sequences is transferred by microinjection into a fertilized egg. The microinjected eggs are implanted into a host female, and the progeny are screened for the expression of the transgene. Transgenic animals may be produced from the fertilized eggs from a number of animals including, but not limited to reptiles, amphibians, birds, mammals, and fish.

DNA clones for microinjection can be prepared by any means known in the art. For example, DNA clones for microinjection can be cleaved with enzymes appropriate for removing the bacterial plasmid sequences, and the DNA fragments electrophoresed on 1% agarose gels in TBE buffer, using standard techniques. The DNA bands are visualized by staining with ethidium bromide, and the band containing the expression sequences is excised. The excised band is then placed in dialysis bags containing 0.3 M sodium acetate, pH 7.0. DNA is electroeluted into the dialysis bags, extracted with a 1:1 phenol:chloroform solution and precipitated by two volumes of ethanol. The DNA is redissolved in 1 ml of low salt

WO 02/46419

PCT/US01/49861

buffer (0.2 M NaCl, 20 mM Tris, pH 7.4, and 1 mM EDTA) and purified on an Elutip-D™ column. The column is first primed with 3 ml of high salt buffer (1 M NaCl, 20 mM Tris, pH 7.4, and 1 mM EDTA) followed by washing with 5 ml of low salt buffer. The DNA solutions are passed through the column three times to bind DNA to the column matrix.

- 5 After one wash with 3 ml of low salt buffer, the DNA is eluted with 0.4 ml high salt buffer and precipitated by two volumes of ethanol. DNA concentrations are measured by absorption at 260 nm in a UV spectrophotometer. For microinjection, DNA concentrations are adjusted to 3 µg/ml in 5 mM Tris, pH 7.4 and 0.1 mM EDTA.

- Other methods for purification of DNA for microinjection are described in Hogan *et al. Manipulating the Mouse Embryo* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1986), in Palmiter *et al. Nature* 300:611 (1982); in *The Qiagenologist, Application Protocols*, 3rd edition, published by Qiagen, Inc., Chatsworth, CA.; and in Sambrook *et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989), all of which are incorporated by reference herein.

- 15 In an exemplary microinjection procedure, female mice six weeks of age are induced to superovulate with a 5 IU injection (0.1 cc, ip) of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG; Sigma) followed 48 hours later by a 5 IU injection (0.1 cc, ip) of human chorionic gonadotropin (hCG; Sigma). Females are placed with males immediately after hCG injection. Twenty-one hours after hCG injection, the mated females are sacrificed by CO<sub>2</sub> asphyxiation or cervical dislocation and embryos are recovered from excised oviducts and placed in Dulbecco's phosphate buffered saline with 0.5% bovine serum albumin (BSA; Sigma). Surrounding cumulus cells are removed with hyaluronidase (1 mg/ml). Pronuclear embryos are then washed and placed in Earle's balanced salt solution containing 0.5 % BSA (EBSS) in a 37.5°C incubator with a humidified atmosphere at 5% CO<sub>2</sub>, 95% air until the time of injection. Embryos can be implanted at the two-cell stage.

- 20 Randomly cycling adult female mice are paired with vasectomized males. C57BL/6 or Swiss mice or other comparable strains can be used for this purpose. Recipient females are mated at the same time as donor females. At the time of embryo transfer, the recipient females are anesthetized with an intraperitoneal injection of 0.015 ml of 2.5 % avertin per gram of body weight. The oviducts are exposed by a single midline dorsal incision. An incision is then made through the body wall directly over the oviduct. The ovarian bursa is then torn with watchmakers forceps. Embryos to be transferred are placed in DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline) and in the tip of a transfer pipet (about 10 to 12

WO 02/46419

PCT/US01/49861

embryos). The pipet tip is inserted into the infundibulum and the embryos transferred. After the transfer, the incision is closed by two sutures.

#### VII. Screening Assays

5 Thus, the present invention also contemplates the screening of compounds for various abilities to interact with and/or affect calcineurin, telethonin, or  $\alpha$ -actinin binding with cal sarcin. Particularly preferred compounds will be those useful in inhibiting or promoting the binding of cal sarcin to calcineurin. In the screening assays of the present invention, the candidate substance may first be screened for basic biochemical activity -- *e.g.*, binding to a  
10 target molecule -- and then tested for its ability to inhibit modulate expression, at the cellular, tissue or whole animal level.

##### A. Modulators and Assay Formats

The term "modulating" as used herein is defined as affecting, regulating, influencing,  
15 moderating or controlling in any manner an activity of a calcineurin polypeptide. In a preferred embodiment, calcineurin function to act as a serine/threonine protein phosphatase is modulated by administration of cal sarcin.

As used herein, the term "candidate substance" refers to any molecule that may potentially modulate cal sarcin activity or cal sarcin binding to calcineurin, telethonin, or  $\alpha$ -  
20 actinin. The candidate substance may be a protein or fragment thereof, a small molecule inhibitor, or even a nucleic acid molecule. It may prove to be the case that the most useful pharmacological compounds will be compounds that are structurally related to compounds which interact naturally with cal sarcin. Creating and examining the action of such molecules is known as "rational drug design," and include making predictions relating to the structure of  
25 target molecules.

The goal of rational drug design is to produce structural analogs of biologically active polypeptides or target compounds. By creating such analogs, it is possible to fashion drugs which are more active or stable than the natural molecules, which have different susceptibility to alteration or which may affect the function of various other molecules. In  
30 one approach, one would generate a three-dimensional structure for a molecule like cal sarcin, and then design a molecule for its ability to interact with that of calcineurin,  $\alpha$ -actinin, or telethonin. Alternatively, one could design a partially functional fragment of cal sarcin (binding but no activity), thereby creating a competitive inhibitor. This could be

WO 02/46419

PCT/US01/49861

accomplished by x-ray crystallography, computer modeling or by a combination of both approaches.

It also is possible to use antibodies to ascertain the structure of a target compound or inhibitor. In principle, this approach yields a pharmacore upon which subsequent drug design can be based. It is possible to bypass protein crystallography altogether by generating anti-idiotypic antibodies to a functional, pharmacologically active antibody. As a mirror image of a mirror image, the binding site of anti-idiotype would be expected to be an analog of the original antigen. The anti-idiotype could then be used to identify and isolate peptides from banks of chemically- or biologically-produced peptides. Selected peptides would then serve as the pharmacore. Anti-idiotypes may be generated using the methods described herein for producing antibodies, using an antibody as the antigen.

In this case, there is ample evidence that demonstrates the binding of calsarcin to calcineurin, telethonin, or  $\alpha$ -actinin. By analyzing the binding of calsarcin to this target molecule, much information can be gleaned about the ability of calsarcin to recognize calcineurin, telethonin, or  $\alpha$ -actinin. With this information, predictions can be made regarding the structure of potential inhibitors of calcineurin activity or activators or facilitators of calsarcin binding to calcineurin or  $\alpha$ -actinin.

On the other hand, one may simply acquire, from various commercial sources, small molecule libraries that are believed to meet the basic criteria for useful drugs in an effort to "brute force" the identification of useful compounds. Screening of such libraries, including combinatorially generated libraries (e.g., peptide libraries), is a rapid and efficient way to screen large number of related (and unrelated) compounds for activity. Combinatorial approaches also lend themselves to rapid evolution of potential drugs by the creation of second, third and fourth generation compounds modeled of active, but otherwise undesirable compounds.

Candidate compounds may include fragments or parts of naturally-occurring compounds or may be found as active combinations of known compounds which are otherwise inactive. It is proposed that compounds isolated from natural sources, such as animals, bacteria, fungi, plant sources, including leaves and bark, and marine samples may be assayed as candidates for the presence of potentially useful pharmaceutical agents. It will be understood that the pharmaceutical agents to be screened could also be derived or synthesized from chemical compositions or man-made compounds. Thus, it is understood that the candidate substance identified by the present invention may be polypeptide, polynucleotide,

WO 02/46419

PCT/US01/49861

small molecule inhibitors or any other compounds that may be designed through rational drug design starting from known inhibitors of hypertrophic response.

Other suitable inhibitors include antisense molecules, ribozymes, and antibodies (including single chain antibodies), each of which would be specific for a target located within the calcineurin pathway. Such compounds are described in greater detail elsewhere in this document.

It will, of course, be understood that all the screening methods of the present invention are useful in themselves notwithstanding the fact that effective candidates may not be found. The invention provides methods for screening for such candidates, not solely methods of finding them.

In accordance with an object of the present invention there is a method to screen for a modulator of calsarcin binding to calcineurin comprising providing a calsarcin, respectively, and calcineurin, admixing them in the presence of a candidate modulator, measuring calsarcin/calcineurin binding, and comparing the binding with the binding of calsarcin, respectively, and calcineurin in the absence of the candidate modulator. The difference in binding of calsarcin and calcineurin in the presence *versus* absence of the candidate modulator identifies the candidate modulator as a modulator of calsarcin, respectively, binding to calcineurin. A skilled artisan is aware this could be performed in a cell free system or within an intact cell. In specific embodiments the intact cell is a myocyte, H9C2 cell, C2C12 cell, a 3T3 cell, a 293 cell, a neonatal cardiomyocyte cell or a myotube cell. Preferably the cell is in an animal. Although the modulator can increase or decrease calsarcin binding to calcineurin, it is preferred that the candidate modulator increases binding of calsarcin to calcineurin.

In other specific embodiments of the present invention, the binding is measured by easily detectable means. This includes fluorescence, radioactivity, by detecting close physical proximity, immunological detection, colorimetric assay or transactivation of a reporter gene. Where applicable, both of the calsarcin and/or calcineurin are labeled, such as with a quenchable label and a quenching agent, as in fluorescence assays. Such a method to assay for binding in the presence or absence of a candidate modulator may in specific embodiments utilize the premise of a two hybrid assay.

#### **B. *In vitro* Assays**

A quick, inexpensive and easy assay to run is a binding assay. Binding of a molecule to a target may, in and of itself, be inhibitory, due to steric, allosteric or charge-charge

WO 02/46419

PCT/US01/49861

interactions. This can be performed in solution or on a solid phase and can be utilized as a first round screen to rapidly eliminate certain compounds before moving into more sophisticated screening assays. In one embodiment of this kind, the screening of compounds that bind to a calcineurin or calsarcin molecule or fragment thereof is provided.

5 The target may be either free in solution, fixed to a support, expressed in or on the surface of a cell. Examples of supports include nitrocellulose, a column or a gel. Either the target or the compound may be labeled, thereby permitting determining of binding. In another embodiment, the assay may measure the inhibition of binding of a target to a natural or artificial substrate or binding partner (such as calsarcin). Competitive binding assays can  
10 be performed in which one of the agents (calsarcin, for example) is labeled. Usually, the target will be the labeled species, decreasing the chance that the labeling will interfere with the binding moiety's function. One may measure the amount of free label versus bound label to determine binding or inhibition of binding.

A technique for high throughput screening of compounds is described in WO  
15 84/03564. Large numbers of small peptide test compounds are synthesized on a solid substrate, such as plastic pins or some other surface. The peptide test compounds are reacted with, for example, a calsarcin and washed. Bound polypeptide is detected by various methods.

Purified target, such as calcineurin,  $\alpha$ -actinin, telethonin, calsarcin-1, calsarcin-2 or  
20 calsarcin-3, can be coated directly onto plates or supports for use in the aforementioned drug screening techniques. However, non-neutralizing antibodies to the polypeptide can be used to immobilize the polypeptide to a solid phase. Also, fusion proteins containing a reactive region (preferably a terminal region) may be used to link an active region (e.g., amino acids  
105 to 176) to a solid phase, or support.

25 Thus, there is provided herein a method to identify a peptide which binds calsarcin by attaching a calsarcin polypeptide, respectively, or a fragment thereof, to a support, exposing the polypeptide or fragment to a candidate peptide, and assaying for binding of the candidate peptide to the polypeptide or fragment. The binding is assayed by any standard means in the art, such as through radioactivity, immunologic detection, fluorescence, gel electrophoresis or  
30 colorimetry means. In a specific embodiment, additional calsarcins are identified wherein calcineurin is attached to a support and subject to analogous assays.

WO 02/46419

PCT/US01/49861

**C. In cyto Assays**

Various cell lines that express calstarcin can be utilized for screening of candidate substances. For example, cells containing calstarcin with an engineered indicator can be used to study various functional attributes of candidate compounds. In such assays, the compound would be formulated appropriately, given its biochemical nature, and contacted with a target cell.

Depending on the assay, culture may be required. As discussed above, the cell may then be examined by virtue of a number of different physiologic assays (growth, size, Ca<sup>++</sup> effects). Alternatively, molecular analysis may be performed in which the function of calstarcin and related pathways may be explored. This involves assays such as those for protein expression, enzyme function, substrate utilization, mRNA expression (including differential display of whole cell or polyA RNA) and others.

Thus, in accordance with the present invention there is provided herein a method of screening for a candidate substance for anti-cardiomyopic hypertrophy activity or anti-heart failure activity by providing a cell lacking a functional calstarcin polypeptide, contacting the cell with a candidate substance and determining the effect of the candidate substance on the cell. The cell lacking a functional calstarcin polypeptide is described elsewhere herein and may derive from a transgenic non-human animal containing the cell, as in a cell line. The cell is preferably a muscle cell and may have a mutation in a regulatory region of calstarcin, such as a deletion, insertion or point mutation, or in the coding region, such as a deletion, insertion, frameshift, nonsense, missense or splicing mutation. The cell may be contacted *in vitro* or *in vivo* by methods well known in the art, and in a specific embodiment is located in a non-human transgenic animal.

**D. In vivo Assays**

The present invention particularly contemplates the use of various animal models. Transgenic animals may be generated with constructs that permit calstarcin expression and activity to be controlled and monitored. The generation of these animals has been described elsewhere herein.

Treatment of these animals with test compounds will involve the administration of the compound, in an appropriate form, to the animal. Administration will be by any route the could be utilized for clinical or non-clinical purposes, including but not limited to oral, nasal, buccal, or even topical. Alternatively, administration may be by intratracheal instillation,

WO 02/46419

PCT/US01/49861

bronchial instillation, intradermal, subcutaneous, intramuscular, intraperitoneal or intravenous injection. Specifically contemplated are systemic intravenous injection, regional administration *via* blood or lymph supply.

5           E.    **Two Hybrid Screens**

The term "two hybrid screen" as used herein refers to a screen to elucidate or characterize the function of a protein by identifying other proteins with which it interacts. The protein of unknown function, herein referred to as the "bait" is produced as a chimeric protein additionally containing the DNA binding domain of GAL4. Plasmids containing  
10 nucleotide sequences which express this chimeric protein are transformed into yeast cells, which also contain a representative plasmid from a library containing the GAL4 activation domain fused to different nucleotide sequences encoding different potential target proteins. If the bait protein physically interacts with a target protein, the GAL4 activation domain and GAL4 DNA binding domain are tethered and are thereby able to act conjunctively to promote  
15 transcription of a reporter gene. If no interaction occurs between the bait protein and the potential target protein in a particular cell, the GAL4 components remain separate and unable to promote reporter gene transcription on their own. One skilled in the art is aware that different reporter genes can be utilized, including  $\beta$ -galactosidase, HIS3, ADE2, or URA3. Furthermore, multiple reporter sequences, each under the control of a different inducible  
20 promoter, can be utilized within the same cell to indicate interaction of the GAL4 components (and thus a specific bait and target protein). A skilled artisan is aware that use of multiple reporter sequences decreases the chances of obtaining false positive candidates. Also, alternative DNA-binding domain/activation domain components may be used, such as LexA. One skilled in the art is aware that any activation domain may be paired with any  
25 DNA binding domain so long as they are able to generate transactivation of a reporter gene. Furthermore, a skilled artisan is aware that either of the two components may be of prokaryotic origin, as long as the other component is present and they jointly allow transactivation of the reporter gene, as with the LexA system.

Two hybrid experimental reagents and design are well known to those skilled in the art (see "The Yeast Two-Hybrid System" by P. L. Bartel and S. Fields (eds.) (Oxford University Press, 1997), including the most updated improvements of the system (Fashena *et al.*, 2000). A skilled artisan is aware of commercially available vectors, such as the Matchmaker™ Systems from Clontech (Palo Alto, CA) or the HybriZAP® 2.1 Two Hybrid

WO 02/46419

PCT/US01/49861

System (Stratagene; La Jolla, CA), or vectors available through the research community (Yang *et al.*, 1995; James *et al.*, 1996). In alternative embodiments, organisms other than yeast are used for two hybrid analysis, such as mammals (Mammalian Two Hybrid Assay Kit from Stratagene (La Jolla, CA)) or *E. coli* (Hu *et al.*, 2000).

5 In an alternative embodiment, a two hybrid system is utilized wherein protein-protein interactions are detected in a cytoplasmic-based assay. In this embodiment, proteins are expressed in the cytoplasm, which allows posttranslational modifications to occur and permits transcriptional activators and inhibitors to be used as bait in the screen. An example of such a system is the CytoTrap® Two-Hybrid System from Stratagene™ (La Jolla, CA), in  
10 which a target protein becomes anchored to a cell membrane of a yeast which contains a temperature sensitive mutation in the *cdc25* gene, the yeast homolog for hSos (a guanyl nucleotide exchange factor). Upon binding of a bait protein to the target, hSos is localized to the membrane, which allows activation of RAS by promoting GDP/GTP exchange. RAS then activates a signaling cascade which allows growth at 37°C of a mutant yeast *cdc25H*.  
15 Vectors (such as pMyr and pSos) and other experimental details are available for this system to a skilled artisan through Stratagene (La Jolla, CA). (See also, for example, U.S. Patent No. 5,776,689, herein incorporated by reference).

Thus, in accordance with an embodiment of the present invention, there is a method of screening for a peptide which interacts with calsarcin comprising introducing into a cell a  
20 first nucleic acid comprising a DNA segment encoding a test peptide, wherein the test peptide is fused to a DNA binding domain, and a second nucleic acid comprising a DNA segment encoding at least part of calsarcin, respectively, wherein the at least part of calsarcin, respectively, is fused to a DNA activation domain. Subsequently, there is an assay for interaction between the test peptide and the calsarcin polypeptide or fragment thereof by  
25 assaying for interaction between the DNA binding domain and the DNA activation domain. In a preferred embodiment, the assay for interaction between the DNA binding and activation domains is activation of expression of  $\beta$ -galactosidase.

#### VIII. Methods to Treat Cardiac-Related Medical Conditions

30 The calsarcin-1, calsarcin-2 or calsarcin-3 polypeptide provided herein binds calcineurin, and  $\alpha$ -actinin and is associated with hypertrophic cardiomyopathy. The ability to bind calcineurin provides an opportunity to target therapy utilizing calsarcin-1, calsarcin-2 or calsarcin-3, particularly to exploit its high level of expression in cardiac muscle, expression at

WO 02/46419

PCT/US01/49861

lower levels in skeletal muscle, and lack of detectability in other tissues. The inhibition of calcineurin activity *via* presently used therapies such as cyclosporine and FK506 has undesirable side effects due to immunosuppression. Thus, a skilled artisan is provided herein methods to modulate calcineurin activity or to treat cardiac hypertrophy, heart failure or Type II diabetes by administering to an organism suffering therefrom a calsarcin polypeptide or nucleic acid encoding a calsarcin polypeptide. Therefore, it is intended to perturb calcineurin activity by intervening with its function or activity by binding it to, preferably, calsarcin polypeptide present in levels over normal, basal levels. This could be achieved by administering wild-type or mutant forms, such as a dominant negative form, of calsarcin as a means to mislocalize and potentially inhibit calcineurin activity. The term "dominant negative" as used herein refers to a form of calsarcin which disturbs the function of a wild-type form in the same cell. Thus, a dominant negative form of calsarcin may bind to calcineurin and promote aberrant activity of calcineurin, such as through subcellular mislocalization. In a preferred embodiment the calsarcin administered binds up, or titrates away, calcineurin in the cell, thereby reducing the consequent effects of calcineurin, such as facilitating cardiomyopic hypertrophy.

In a specific embodiment, the nucleic acid encoding the calsarcin polypeptide or calcineurin binding fragment thereof is expressed specifically in muscle cells, such as with a muscle-specific promoter. In a specific embodiment, a dominant negative form of calsarcin is administered.

In other methods, there is inhibition of calcineurin activation of gene transcription in a cell by providing to the cell a fusion protein comprising calsarcin or a calcineurin binding fragment thereof, fused to a targeting peptide that localizes the fusion protein to a subcellular region other than where it exerts its function. That calcineurin can sense changes in contractility strongly suggests that its localization to the sarcomere enables it to respond to calcium alterations due to contraction. Fusion proteins are discussed elsewhere herein. The gene transcription which is affected by such methods may be inhibited by direct means or indirectly, as with inhibiting an upstream effector. In specific embodiments, the gene transcription by calcineurin which is inhibited includes but is not limited to genes encoding cytokines such as IL-2, fetal cardiac genes such as atrial natriuretic factor (ANF), b-type natriuretic peptide (BNP),  $\alpha$ -major histocompatibility complex (MHC), and  $\alpha$ -skeletal actin. Basic models of NFAT activation discussed *supra* show transduction of  $Ca^{2+}$  signals via

WO 02/46419

PCT/US01/49861

calcineurin in many cell types and control of transcription of diverse sets of target genes unique to each cellular environment (Timmerman *et al.*, 1996).

In specific embodiments, therapy with traditional drugs or compounds is utilized in addition to the methods described herein, including administering to an animal a compound  
5 selected from the group consisting of an ionotrope, a beta blocker, an antiarrhythmic, a diuretic, a vasodilator, a hormone antagonist, an endothelin antagonist, an angiotensin type 2 antagonist and a cytokine inhibitor/blocker.

#### X. Examples

10 The following examples are included to demonstrate preferred embodiments of the invention. It should be appreciated by those of skill in the art that the techniques disclosed in the examples which follow represent techniques discovered by the inventor to function well in the practice of the invention, and thus can be considered to constitute preferred modes for its practice. However, those of skill in the art should, in light of the present disclosure,  
15 appreciate that many changes can be made in the specific embodiments which are disclosed and still obtain a like or similar result without departing from the spirit and scope of the invention.

#### EXAMPLE 1

##### 20 MATERIALS AND METHODS

**Yeast Two-Hybrid Screens.** A full-length mouse CnA- $\alpha$  cDNA, fused to the GAL4 DNA binding domain was used as bait in a two-hybrid screen of approximately  $1.5 \times 10^6$  clones of a human heart cDNA library (Clontech), as described previously (Molkentin *et al.*, 1998). From this screen, the inventors identified a cDNA encoding calsarcin-1. Additional  
25 two-hybrid screens of the same cDNA library were performed using calsarcin-1 and calsarcin-2 as bait.

**Northern blot analysis.** Northern blots of RNA from human and mouse multiple tissues (Clontech) as well as from C2C12 cell extracts were performed as described (Spencer *et al.*, 2000).

30 **Generation of calsarcin antiserum and western blots.** A rabbit antiserum was generated against the complete open reading frame of calsarcin-1 fused in-frame with GST. IgG was purified from rabbit serum and used for Western blotting and immunostaining.

WO 02/46419

PCT/US01/49861

**Radioactive In Situ Hybridization.** RNA probes corresponding to the sense and antisense strains of cal sarcin-1 and cal sarcin-2 cDNAs were prepared using T7 and T3 RNA polymerase (Roche) and <sup>35</sup>S-labeled UTP. Sections of mouse embryos and adult hind limbs were subjected to *in situ* hybridization, as described previously (Lu *et al.*, 1998).

5 **Cell culture, transfections and immunoprecipitations.** Cos-7 cells were maintained in DMEM containing 10% FBS. 2 x 10<sup>5</sup> cells were transfected with 1 µg of expression plasmids for full-length and truncated forms of cal sarcin-1 and cal sarcin-2, CnA and α-actinin-2 using FuGENE 6 reagent (Roche). Cal sarcin peptides were fused with an N-terminal HA-epitope or a C-terminal Myc-epitope, α-actinin-2 was fused with N-terminal  
10 Myc- or FLAG-epitopes and CnA constructs were fused with an N-terminal FLAG epitope. Forty-eight hours after transfection, cells were harvested in ELB-buffer, containing 50 mM Hepes (pH 7.0), 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF and protease inhibitors (Complete; Roche). Cells were briefly sonicated and debris was removed by centrifugation. Tagged proteins were immunoprecipitated for 2-3 hours at 4°C using protein  
15 A/B agarose and 1 µg of the appropriate antibody (monoclonal anti-FLAG, monoclonal anti-Myc and polyclonal anti-Myc). Subsequently, the pellet was washed with ELB-buffer and subjected to SDS-PAGE, transferred to polyvinylidene membranes and immunoblotted using anti-FLAG, anti-Myc or anti-HA-antibodies, respectively.

**Immunostaining.** The subcellular localization of cal sarcin-1, α-actinin and can was  
20 determined in neonatal rat cardiomyocytes which were harvested and maintained as described (Molkentin *et al.*, 1998). Immunostaining was performed as described (Spencer *et al.*, 2000). The following antibodies were used: anti-cal sarcin-1, anti-sarcomeric α-actinin (Sigma), anti-CnA (Sigma, Transduction Laboratories, Santa Cruz); secondary antibodies; Anti-mouse/rabbit, Texas red and FITC-labeled (Vectorlabs), respectively. Cryosections of mouse  
25 heart and skeletal muscle were fixed in 3.7% formalin for 3 minutes, permeabilized in 0.3% Triton X-100 for 5 minutes and subsequently stained as described above.

**Mapping of cal sarcin-1 interaction domains.** Several N- and C-terminal truncations of cal sarcin-1 were fused in-frame with the GAL4 DNA-binding domain in vector pAS1. CnA and α-actinin were fused with the GAL4 transactivation domain in the two-  
30 hybrid vector pACT2. Since both full-length and constitutively active CnA displayed background β-galactosidase activity when transfected alone, a mutated CnA, lacking enzymatic activity (Shibasaki *et al.*, 1996) was used in subsequent experiments and did not display any background signal. Cal sarcin-1 constructs were transformed with can, α-actinin

WO 02/46419

PCT/US01/49861

or pACT2 (as negative control) and grown on appropriate selective medium for 3 days.  $\beta$ -galactosidase activity was determined with filter-lift assays as described (Fields & Song, 1989) and monitored for 1-4 h. Since several C-terminal truncations of cal sarcin-1 exhibited  $\beta$ -galactosidase activity when cotransformed with pACT2, complementary coimmunoprecipitation experiments were performed to further define cal sarcin's interaction domains for CnA and  $\alpha$ -actinin, as described above.

## EXAMPLE 2

### IDENTIFICATION OF CALCINEURIN-ASSOCIATED PROTEINS

To identify proteins which associated with calcineurin, and preferably which were cardiac-specific, two hybrid analysis was performed in yeast for proteins encoded by mouse heart cDNA libraries. In a specific embodiment, the catalytic region of calcineurin is fused to the DNA binding domain of yeast GAL4. From these screens, a muscle-specific calcineurin-associated protein (cal sarcin)-1 was identified that associates with calcineurin. Subsequent experiments in mammalian cells demonstrated that cal sarcin-1 and calcineurin can form a complex *in vivo* (see Examples below).

Searching public expressed sequence tag (EST) databases with the mouse cal sarcin-1 cDNA sequence, human cal sarcin-1 cDNA clones were identified, as well as human and mouse sequences for the related genes cal sarcin-2 and cal sarcin-3. A skilled artisan is aware of databases available for such searching of both protein and nucleic acid sequences, including GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/GenbankSearch.html>) or commercially available databases (Celera Genomics, Inc.; Rockville, MD; [www.celera.com](http://www.celera.com)). Alignment of cal sarcins 1-3 is demonstrated in FIG. 13.

The deduced amino acid sequences of human cal sarcin-1 (FIG. 1A), mouse cal sarcin-1 (FIG. 1B), human cal sarcin-2 (FIG. 1C) and mouse cal sarcin-2 (FIG. 1D) are shown, along with an amino acid alignment of the mouse proteins (FIG. 1E). Also provided are DNA sequences for human cal sarcin-1 (FIG. 2A), mouse cal sarcin-1 (FIG. 2B), human cal sarcin-2 (FIG. 2C) and mouse cal sarcin-2 (FIG. 2D). Cal sarcin-1 and -2 show the highest homology toward their amino- and carboxy-termini, whereas the intervening amino acids are less well conserved. BLATS searches with both proteins sequences did not reveal any significant homology to known proteins.

Cal sarcin-2 was identified by searching the EST database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html>) with the sequence of cal sarcin-1. Three

WO 02/46419

PCT/US01/49861

mouse cal sarcin-2 ESTs were identified: GenBank accession numbers (AA036142, AW742494, W29466). Additionally, four human cal sarcin-2 ESTs were identified: GenBank accession numbers (AW964108, AA197193, AW000988, AA176945). The mouse cal sarcin-2 ESTs are as follows: GenBank No. AA036142; GenBank No. AW742494; and  
5 GenBank No. W29466. The human cal sarcin-2 ESTs are as follows: GenBank No. AW964108; GenBank No. AA197193; GenBank No. AW000988; and GenBank No. AA176945.

Calsarcin-3 was discovered "in silico" by comparing cal sarcin 1 and cal sarcin 2 sequences with the database. Human genomic DNA (AC 008453.3; public not Celera  
10 database) containing several homologous sequences was confirmed to be exons of cal sarcin-3. Primers were designed and a human skeletal muscle library was screened for the full-length cDNA for human cal sarcin-3 (FIG 5). Similarly, a mouse skeletal library was screened and several independent and overlapping clones encoding for mouse cal sarcin-3 were identified.

15 Two hybrid experimental reagents and design are discussed in detail elsewhere herein. In an alternative embodiment a yeast one hybrid system (Vidal and Legrain, 1999; Sieweke, 2000) is utilized to determine interaction of a cal sarcin with a nucleic acid sequence, or a three-hybrid system is utilized to detect RNA-protein interactions *in vivo* (SenGupta *et al.*, 1996).

20 In other embodiments, other methods well known in the art are utilized to identify proteins or peptides which interact with calcineurin. For instance, a labeled form of calcineurin is generated by standard means in the art, a pool of potential interacting candidates are exposed to the labeled calcineurin, and the resultant interactors are identified. Alternatively, an unlabeled form of calcineurin is exposed to labeled candidates, and the  
25 resultant labeled interactor candidate, following exposure to the unlabeled calcineurin, is characterized. In an alternative specific embodiment, an unlabeled form of calcineurin is exposed to <sup>35</sup>S-labeled proteins, *via* <sup>35</sup>S-labeled methionine, such as is present in a cellular extract. The labeled interactor candidate is isolated and identified, such as by Sanger sequencing. In another embodiment, immunoprecipitation is performed by means well  
30 known in the art wherein antibodies to calcineurin are incubated with a source of candidate interactors, and the antibodies act to isolate or "pull down" any gene product which interacts with the form of calcineurin to which the antibody is bound. A skilled artisan is aware that the methods described herein regarding protein-protein interactions analogously apply to any

WO 02/46419

PCT/US01/49861

protein or polypeptide, including all calsarcins. Other methods to determine protein-protein interactions are well known in the art.

Thus, in addition to a two hybrid system, additional methods to analyze protein interactions include interaction trap, affinity purification, phage-based expression cloning (also referred to as interaction cloning), surface plasmon resonance, and coprecipitation, described in its immunological form elsewhere herein.

In an interaction trap, also referred to as an interactor hunt, a yeast strain contains two LexA operator-responsive reporters: a chromosomally integrated *LEU2* gene and a plasmid-borne *GAL1* promoter-*lacZ* fusion gene. Additionally, the strain contains a constitutively expressed chimeric protein comprising the LexA DNA-binding domain and the protein of interest, which is unable to independently activate the reporter genes. An inducible yeast *GAL1* promoter drives expression of an activation domain-fused cDNA library, which is introduced into the yeast. Plating the transformed yeast on galactose containing media which also lacks leucine induces expression of the library. If interaction of the bait protein with a candidate target protein occurs, *LEU2* is expressed and colony growth is permitted. Expression of the reporter gene is confirmed with plating on medium containing X-gal.

Affinity purification, also known as GST pulldown purification, utilizes proteins fused to glutathione-S-transferase (GST) bound to glutathione-agarose beads. Exposure of the beads to a candidate interactor protein, which may be labeled or purified, is followed by subsequent washing. The quantity of candidate interactor protein retained is determined by either subjecting the beads/bound proteins to SDS-polyacrylamide electrophoresis or eluting with glutathione or salt. Although in a specific embodiment the candidate interactor protein is known, this method may also be used to test a complex mixture of proteins, such as with a crude cellular lysate, if performed in conjunction with other techniques or reagents, such as using antibodies to the candidate interactor protein.

In interaction cloning, also referred to as expression cloning, a nucleic acid encoding a bait protein (protein of interest) and an appropriate expression library, such as from a heart or muscle tissue, is present in a bacteriophage expression vector, such as  $\lambda$ gt11. In a specific embodiment, a fusion protein consists of bait protein and GST but also including a recognition site for cyclic adenosine 3',5'-phosphate (cAMP)-dependent protein kinase A (PKA) site between them. The cDNA is radioactively labeled with  $^{32}\text{P}$ . The bait fusion protein is enzymatically phosphorylated by PKA and ( $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ )ATP. The labeled probe is utilized to screen a  $\alpha$  bacteriophage-derived cDNA expression library expressing  $\beta$ -

WO 02/46419

PCT/US01/49861

galactosidase fusion proteins containing in-frame gene fusions. Fusion proteins are adsorbed onto nitrocellulose membranes following lyses of the cells by the phage and plaque formation. Interacting clones are visualized, such as with autoradiography.

5 Surface plasmon resonance (SPR) is utilized to determine interaction with specific potential interacting analytes, and thus is best used when specific proteins are suspected to interact with a protein of interest. In surface plasmon resonance, a protein is immobilized on a chip which is exposed to a continuously flowing buffer. When sample "plugs" containing potential binding analytes are sequentially flowed over the protein surface, the flow of the buffer is interrupted. A sensing apparatus on a SPR device, such as a BIAcore instrument,  
10 detects changes in the angle of minimum reflectance from the interface that result upon association of the potential interacting analyte with the protein of interest. Therefore, visualization of the molecular interactions occurs in real time, as seen on a computer monitor.

### EXAMPLE 3

#### 15 EXPRESSION OF NUCLEIC ACIDS ENCODING CALCINEURIN-ASSOCIATED PROTEINS

To determine which tissues calcarsin-1 and calcarsin-2 are expressed in, Northern analysis was performed. In FIG. 3, polyA+ RNA from the indicated mouse tissues was analyzed for expression of calcarsin-1 and calcarsin-2 transcripts by methods well known in  
20 the art. The data shows a highly striated, muscle-specific expression pattern for calcarsin-1 and -2. Calcarsin-1 is specifically expressed in the heart and skeletal muscle, with two mRNAs of 1.6 and 2.6 kb in human tissues, and only a single transcript of 1.3 kb in mouse. Faint expression of calcarsin-1 was also detected in mouse lung and liver. A 1.6 kb and 1.3 kb calcarsin-2 transcript was detected exclusively in adult human and mouse skeletal muscle,  
25 respectively. The relative difference in expression level of calcarsin-1 between human and mouse skeletal muscle may reflect differences in slow- versus fast-twitch fiber composition.

In a specific embodiment, the expression pattern of calcarsin-3 is determined by similar methods (FIG. 9). Methods to analyze RNA are well known. Briefly, RNA is isolated from a tissue of interest using standard techniques and is subsequently fractionated  
30 on an agarose gel, transferred to a membrane, and cross-linked to the membrane. A labeled probe is hybridized to the membrane, and the hybridization is detected.

Given the important role of calcineurin in regulating skeletal muscle hypertrophy and slow fiber gene expression, it is likely that calcarsin-2 plays an important role in regulating the functions of skeletal muscle.

WO 02/46419

PCT/US01/49861

## EXAMPLE 4

**LOCALIZATION OF EXPRESSION OF NUCLEIC ACIDS ENCODING  
CALCINEURIN-ASSOCIATED PROTEINS AND FIBER TYPE SPECIFICITY OF  
CALSARCIN-1 AND -2 IN SKELETAL MUSCLE**

5 To characterize temporal and spatial patterns of expression of cal sarcin-1, *in situ*  
hybridizations were performed. At embryonic day (E) 9.5, relatively weak expression of  
calsarcin-1 was observed in the heart, whereas at E12.5 and E15.5, intense signals were  
10 detected in both cardiac and skeletal muscle tissue. In contrast, adjacent sections from the  
same embryo probed with calsarcin-2 displayed significant cardiac expression at E9.5, which  
was still detectable at E12.5. Low level expression of calsarcin-2 in skeletal muscle of the  
tongue was also visible at this stage. At E15.5, cardiac expression of calsarcin-2 was  
downregulated and was only weakly detected in the atria, whereas skeletal muscle  
15 expression became more robust. Expression of calsarcin-1 in all cardiac chambers persisted  
through adulthood (FIG. 4B). Thus, calsarcin-1 is expressed in all striated muscle tissues  
throughout development, whereas calsarcin-2 is transiently expressed in the heart during  
early embryogenesis and later becomes restricted to skeletal muscle.

A skilled artisan is aware of standard methods to determine expression of a nucleic  
acid by *in situ* hybridization of tissues (Ausubel *et al.*, 1994), such as by using fluorescence  
20 *in situ* hybridization (FISH). For *in situ* hybridization, a specific labeled nucleic acid probe is  
hybridized to a respective cellular nucleic acid, such as a RNA in a sample, such as tissue  
sections or individual cells. In specific embodiments, the samples were fixed for the  
appropriate time and dehydrated through a graded ethanol series. The samples were then  
impregnated in paraffin wax, cast into blocks and sectioned on a microtome. A specific  
25 labeled probe was prepared, such as with biotin, digoxigenin or with a fluorochrome-tagged  
deoxynucleotide. Next, the probe was hybridized to the sample. Hybridization conditions may  
vary depending on the nature of the labeled probe and the sample being tested. Following  
hybridization, in a specific embodiment, samples were washed for 15 min in 37 C 50%  
formamide/2X SSC, 15 min in 37 C 2X SSC and 15 min in room temperature 1X SSC. The  
30 slides were equilibrated for 5 min in 4X SSC at room temperature. The slides were drained  
and allowed to air dry. Next, a detection solution was added. After a 45 min incubation in  
the detection solution, the slides were washed. A counterstain, such as DAPI or propidium  
iodide staining solution was added to the slide. The slide was viewed using a fluorescence  
microscope.

WO 02/46419

PCT/US01/49861

In other embodiments, *in situ* hybridizations with other cal sarcins are performed analogously. A skilled artisan is aware that, in an alternative embodiment, immunohistochemical localization of a polypeptide or protein is used to determine its localization subcellularly or to a particular cell type within tissues. In another embodiment, *in situ* hybridization and immunohistochemical localization are used in conjunction to determine location within a cell or tissue, thereby providing information regarding the nature of the function of the peptide or protein in question.

To determine whether cal sarcins might exhibit fiber type-specificity of expression in skeletal muscle, we performed *in situ* hybridizations with sections of adult mouse hindlimb, using cal sarcin-1 and -2 probes (FIG. 4C). Cal sarcin-1 expression was localized to soleus and plantaris, which is comprises predominantly of slow-twitch fibers. In contrast, cal sarcin-2 expression is enriched in gastrocnemius, which is primarily a fast-twitch muscle type.

Western blots of various tissue extracts using cal sarcin-1 antiserum revealed a single 32 kDa protein in heart and soleus (FIG. 4D). No expression was detected in liver or other non-muscle tissues. The cal sarcin-1 antiserum did not recognize recombinant cal sarcin-2 in extracts derived from transfected Cos cells, indicating no significant cross-reactivity of the antiserum (data not shown). Only faint expression of cal sarcin-1 protein could be detected in extract derived gastrocnemius (FIG. 4D), confirming the slow fiber-restricted expression of calcineurin-1.

Cal sarcin-1 transcripts were upregulated during differentiation of the C2 skeletal muscle cell line, following transfer of proliferating myoblasts to differentiation medium (FIG. 3E). In contrast, cal sarcin-2 expression was undetectable in C2 cells.

#### EXAMPLE 5

##### COLOCALIZATION OF CALSARCIN-1 AND $\alpha$ -ACTININ

In light of two hybrid experiments demonstrating that cal sarcin-1 and  $\alpha$ -actinin interact, colocalization of the two gene products was tested. The subcellular localization of cal sarcin-1 was determined by immunostaining of neonatal rat cardiomyocytes and cryosections of adult mouse heart and skeletal muscle. As shown in FIG. 5, cal sarcin staining was localized to the sarcomere of neonatal cardiomyocytes and overlapped with  $\alpha$ -actinin staining, which specifically marks the z-line. A similar staining pattern was observed in sections of adult mouse heart and skeletal muscle. Interestingly, calcineurin, detected with an antibody directed against amino acids 247-449 (Transductions Laboratories), was also

WO 02/46419

PCT/US01/49861

colocalized to the z-line, indicating a muscle specific subcellular localization of the enzyme. The latter finding was confirmed by a second can antibody (Sigma). CnA staining was also detected in the nucleus, suggesting that calcineurin is also localized to other subcellular regions. In another embodiment, analogous experiments are performed with calsarcin-2 or calsarcin-3 antibodies to test for colocalization with a polypeptide such as  $\alpha$ -actinin (FIG 11). Furthermore, overexpression of calsarcin-1 in C2C12 myoblast cells, resulted in early (after one day of differentiation) and enhanced sarcomere formation. (FIG 12)

#### EXAMPLE 6

##### IDENTIFICATION OF PROTEINS WHICH INTERACT WITH CALCINEURIN- ASSOCIATED PROTEINS

10

To further understand the functions of calsarcin-1, it was used as bait in a two-hybrid screen of muscle cDNA libraries, analogous to methods described in Example 1 and elsewhere herein. From this screen, numerous independent cDNAs encoding portions of  $\alpha$ -actinin were identified. In a specific embodiment, calsarcin-2 and/or calsarcin-3 are used as bait in similar methods to detect calsarcin-2 or calsarcin-3-interacting polypeptides, respectively.  $\alpha$ -actinin is normally associated with the Z-band of the sarcomere.

15

Association of calsarcin-1 and -2 with  $\alpha$ -actinin was further tested by coimmunoprecipitation of epitope-tagged proteins in transfected Cos cells and of the native proteins from neonatal cardiomyocytes. As shown in FIG. 6A, C-terminal Myc-tagged calsarcin-1 immunoprecipitated FLAG-tagged CnA and  $\alpha$ -actinin. Catalytic activity of calcineurin is not required for the calsarcin interaction as demonstrated by the ability of calsarcin-1 to immunoprecipitate a catalytically inactive CnA mutant. Using a triple-immunoprecipitation approach with Myc-tagged  $\alpha$ -actinin, HA-tagged calsarcin and FLAG-tagged calcineurin (FIG. 6B), we demonstrated that CnA could only be precipitated by Myc- $\alpha$ -actinin in the presence of calsarcin-1, indicating a trimeric complex. In addition,  $\alpha$ -actinin could also be coimmunoprecipitated with native calsarcin-1 from cardiomyocyte extracts (FIG. 6C). Furthermore, calsarcins 1-3 coimmunoprecipitated with the sarcomeric protein telethonin as demonstrated in FIG 10. Telethonin is a disease gene involved in limb-girdle muscular dystrophy and may play a role in the stretch-response of striated muscle both in cardiac and skeletal muscle.

20

25

30

WO 02/46419

PCT/US01/49861

**EXAMPLE 7****IDENTIFICATION OF DOMAINS FOR INTERACTION OF CALSARCIN-1 WITH  
 $\alpha$ -ACTININ**

N- and C-terminal truncations of calsarcin-1 were used to characterize the CnA and  
5  $\alpha$ -actinin interaction domains. Yeast two-hybrid assays and complementary  
immunoprecipitation experiments revealed that amino acids 153-200 are necessary for  
interaction of calsarcin with  $\alpha$ -actinin-2 (FIG. 7). Twenty-five residues within this region are  
highly conserved between mouse and human calsarcin-1 and -2, suggesting that this might  
constitute the minimal interaction domain. Since a motif between amino acids 245-250  
10 resembles known calcineurin dockings sites on NFAT (PxIxIT) and MCIP (PxIxIT), the  
inventors tested a C-terminal truncation lacking both those residues. However, calsarcin  
lacking these amino acids was still able to bind, both by two-hybrid assay (GAL4-  
calsarcin 85-240) and coimmunoprecipitation (Myc-calsarcin 1-240). In contrast, a calsarcin-  
1 mutant lacking residues 217-264 was unable to bind CnA, implying that residues 217-240  
15 are necessary for binding. Mapping of the interaction domain on CnA revealed that the  
calsarcin-interacting domain residues within the catalytic region, whereas the calsarcin-1  
interacting domain of  $\alpha$ -actinin maps to the second and third spectrin-like repeats.

In a specific embodiment, analogous experiments are performed with other calsarcins  
in identifying calsarcin domains for interaction with protein binding.

20

**EXAMPLE 8****SIGNIFICANCE OF CALCINEURIN-ASSOCIATED PROTEINS IN  
CARDIOMYOPATHIES AND MUSCULAR DYSTROPHIES**

Based on their interactions and colocalization *in vivo*, it also is proposed herein that  
25 calsarcin-1 links calcineurin to the Z-band where it can sense changes in calcium signaling in  
the myocyte and potentially transduce a hypertrophic signal (FIG. 8). Calsarcin-1, and/or  
other calsarcin proteins, such as calsarcin-2 or calsarcin-3, may also play structural and/or  
mechanosensory roles in cardiac and skeletal myocytes through modulation of the Z-band  
and its association with other proteins in the cell. The Z-band has been shown to play  
30 important roles in regulating muscle cell structure and function. Thus, calsarcin-1 is likely to  
be intimately involved in these processes and is a strong candidate for a gene involved in  
human cardiomyopathies and muscular dystrophies.

WO 02/46419

PCT/US01/49861

REFERENCES

The following references, to the extent that they provide exemplary procedural or other details supplementary to those set forth herein, are specifically incorporated herein by reference.

- 5
- U.S. Patent No. 4,196,265, issued April 1, 1980.  
U.S. Patent No. 4,554,101, issued November 19, 1985.  
U.S. Patent No. 4,683,195, issued July 28, 1987.  
U.S. Patent No. 4,683,202, issued, issued July 28, 1987.
- 10 U.S. Patent No. 4,800,159, issued January 24, 1989.  
U.S. Patent No. 4,873,191, issued issued October 10, 1989.  
U.S. Patent No. 4,883,750, issued November 28, 1989.  
U.S. Patent No. 5,279,721, issued January 18, 1994.  
U.S. Patent No. 5,354,855, issued October 11, 1994.
- 15 U.S. Patent No. 5,776,689, issued July 7, 1998.  
EPO 0273085, issued July 6, 1988.  
WO 84/03564, issued September 13, 1984.  
WO 90/07641 filed December 21, 1990.
- 20 Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (eds.) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc. (1994).
- Barany, G. and Merrifield, R.B. A chromatographic method for the quantitative analysis of the deprotection of dithiasuccinoyl (Dts) amino acids. *Anal. Biochem.* May;95(1):160-70 (1979).
- 25 Barnes KV, Cheng G, Dawson MM, Menick DR. Cloning of cardiac, kidney, and brain promoters of the feline *ncx1* gene. *J Biol Chem.* Apr 25;272(17):11510-7 (1997).
- Baron MD, Davison MD, Jones P, Patel B, Critchley DR. Isolation and characterization of a cDNA encoding a chick alpha-actinin. *J Biol Chem.* Feb 25;262(6):2558-61 (1987).
- Barski OA, Gabbay KH, Bohren KM. Characterization of the human aldehyde reductase  
30 gene and promoter. *Genomics* 60(2):188-98 (1999).

WO 02/46419

PCT/US01/49861

- Beggs AH, Byers TJ, Knoll JH, Boyce FM, Bruns GA, Kunkel LM. Cloning and characterization of two human skeletal muscle alpha-actinin genes located on chromosomes 1 and 11. *J Biol Chem.* May 5;267(13):9281-8 (1992).
- Bennett JP, Zaner KS, Stossel TP. Isolation and some properties of macrophage alpha-actinin: evidence that it is not an actin gelling protein. *Biochemistry.* Oct 9;23(21):5081-6 (1984).
- Bhavsar PK, Brand NJ, Yacoub MH, Barton PJR. Isolation and characterization of the human cardiac troponin I gene (TNNI3). *Genomics.* Jul 1;35(1):11-23 (1996).
- Burridge K, Feramisco JR. Microinjection and localization of a 130K protein in living fibroblasts: a relationship to actin and fibronectin. *Cell.* Mar;19(3):587-95 (1980).
- Capaldi RA, Bell RL, Branchek T. Changes in order of migration of polypeptides in complex III and cytochrome C oxidase under different conditions of SDS polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochem Biophys Res Commun.* Jan 24;74(2):425-33 (1977).
- Chin ER, Olson EN, Richardson JA, Yang Q, Humphries C, Shelton JM, Wu H, Zhu W, Bassel-Duby R, Williams RS. A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev.* Aug 15;12(16):2499-509 (1998).
- Crabtree GR. Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca<sup>2+</sup>, calcineurin, and NF-AT. *Cell.* Mar 5;96(5):611-4 (1999).
- de Arruda MV, Watson S, Lin CS, Leavitt J, Matsudaira P. Fimbrin is a homologue of the cytoplasmic phosphoprotein plastin and has domains homologous with calmodulin and actin gelation proteins. *J Cell Biol.* Sep;111(3):1069-79 (1990).
- Ding B, Price RL, Borg TK, Weinberg EO, Halloran PF, Lorell BH. Pressure overload induces severe hypertrophy in mice treated with cyclosporine, an inhibitor of calcineurin. *Circ Res.* Apr 2;84(6):729-34 (1999).
- Duhaiman AS, Bamberg JR. Isolation of brain alpha-actinin. Its characterization and a comparison of its properties with those of muscle alpha-actinins. *Biochemistry.* Apr 10;23(8):1600-8 (1984).

WO 02/46419

PCT/US01/49861

- Dunn SE, Burns JL, Michel RN. Calcineurin is required for skeletal muscle hypertrophy. *J Biol Chem.* Jul 30;274(31):21908-12 (1999).
- Fashena SJ, Serebriiskii I, Golemis EA. The continued evolution of two-hybrid screening approaches in yeast: how to outwit different preys with different baits. *Gene* 2000 May 5 30;250(1-2):1-14
- Fields, S & Song, O. *Nature* 340:245-247 (1989).
- Forster AC, Symons RH. Self-cleavage of virusoid RNA is performed by the proposed 55-nucleotide active site. *Cell.* Jul 3;50(1):9-16 (1987).
- Franz WM, Brem G, Katus HA, Klingel K, Hofschneider PH, Kandolf R. Characterization of a cardiac-selective and developmentally upregulated promoter in transgenic mice. *Cardioscience.* Dec;5(4):235-43 (1994). 10
- Fyrberg C, Ketchum A, Ball E, Fyrberg E. Characterization of lethal *Drosophila melanogaster* alpha-actinin mutants. *Biochem Genet.* Oct;36(9-10):299-310 (1998).
- Gopal-Srivastava R, Haynes II 2nd, Piatigorsky J. Regulation of the murine alpha B-crystallin/small heat shock protein gene in cardiac muscle. *Mol Cell Biol.* Dec;15(12):7081-90 (1995). 15
- Graef IA, Mermelstein PG, Stankunas K, Neilson JR, Deisseroth K, Tsien RW, Crabtree GR. L-type calcium channels and GSK-3 regulate the activity of NF-ATc4 in hippocampal neurons. *Nature.* Oct 14;401(6754):703-8 (1999).
- Harlow, E. *Using antibodies: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999, 495 pp. 20
- Hill JA, Karimi M, Kutschke W, Davisson RL, Zimmerman K, Wang Z, Kerber RE, Weiss RM. Cardiac hypertrophy is not a required compensatory response to short-term pressure overload. *Circulation.* 2000 Jun 20;101(24):2863-9.
- Ho IC, Hodge MR, Rooney JW, Glimcher LH. The proto-oncogene c-maf is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4. *Cell.* Jun 28;85(7):973-83 (1996). 25

WO 02/46419

PCT/US01/49861

- Izumo S, Aoki H. Calcineurin--the missing link in cardiac hypertrophy. *Nat Med.* Jun;4(6):661-2 (1998).
- James P, Halladay J, Craig EA. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 1996 Dec;144(4):1425-36.
- 5 Kashishian A, Howard M, Loh C, Gallatin WM, Hoekstra MF, Lai Y. AKAP79 inhibits calcineurin through a site distinct from the immunophilin-binding region. *J Biol Chem.* Oct 16;273(42):27412-9 (1998).
- Kelly R, Alonso S, Tajbakhsh S, Cossu G, Buckingham M. Myosin light chain 3F regulatory sequences confer regionalized cardiac and skeletal muscle expression in transgenic mice. *J Cell Biol.* Apr;129(2):383-96 (1995).
- 10 Kimura S, Abe K, Suzuki M, Ogawa M, Yoshioka K, Kaname T, Miike T, Yamamura K. A 900 bp genomic region from the mouse dystrophin promoter directs lacZ reporter expression only to the right heart of transgenic mice. *Dev Growth Differ.* Jun;39(3):257-65 (1997).
- Klee CB, Ren H, Wang X. Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J Biol Chem.* May 29;273(22):13367-70 (1998).
- 15 Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol.* May 5;157(1):105-32 (1982).
- Lai MM, Burnett PE, Wolosker H, Blackshaw S, Snyder SH. Cain, a novel physiologic protein inhibitor of calcineurin. *J Biol Chem.* Jul 17;273(29):18325-31 (1998).
- 20 Landon F, Gache Y, Touitou H, Olomucki A. Properties of two isoforms of human blood platelet alpha-actinin. *Eur J Biochem.* Dec 2;153(2):231-7 (1985).
- LaPointe MC, Wu G, Garami M, Yang XP, Gardner DG. Tissue-specific expression of the human brain natriuretic peptide gene in cardiac myocytes. *Hypertension.* Mar;27(3 Pt 2):715-22 (1996).
- 25 Lim HW, De Windt LJ, Steinberg L, Taigen T, Witt SA, Kimball TR, Molkentin JD. Calcineurin expression, activation, and function in cardiac pressure-overload hypertrophy. *Circulation.* 2000 May 23;101(20):2431-7.

WO 02/46419

PCT/US01/49861

- Lim HW, De Windt LJ, Mante J, Kimball TR, Witt SA, Sussman MA, Molkenin JD. Reversal of cardiac hypertrophy in transgenic disease models by calcineurin inhibition. *J Mol Cell Cardiol.* 2000 Apr;32(4):697-709.
- Liu YC, Elly C, Langdon WY, Altman A. Ras-dependent, Ca<sup>2+</sup>-stimulated activation of nuclear factor of activated T cells by a constitutively active Cbl mutant in T cells. *J Biol Chem.* Jan 3;272(1):168-73 (1997).
- Lu, J., Richardson, J., Gan, L., Olson, E. *Mech Dev* 73:23-32 (1998).
- Luther PK. Three-dimensional reconstruction of a simple Z-band in fish muscle. *J Cell Biol.* Jun;113(5):1043-55 (1991).
- 10 Macejak DG, Sarnow P. Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA. *Nature.* Sep 5;353(6339):90-4 (1991).
- Mao Z, Wiedmann M. Calcineurin enhances MEF2 DNA binding activity in calcium-dependent survival of cerebellar granule neurons. *J Biol Chem.* Oct 22;274(43):31102-7 (1999).
- 15 Mao Z, Bonni A, Xia F, Nadal-Vicens M, Greenberg ME. Neuronal activity-dependent cell survival mediated by transcription factor MEF2. *Science.* Oct 22;286(5440):785-90 (1999).
- Marban E, Kitakaze M, Kusuoka H, Porterfield JK, Yue DT, Chacko VP. Intracellular free calcium concentration measured with <sup>19</sup>F NMR spectroscopy in intact ferret hearts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Aug;84(16):6005-9 (1987).
- 20 Merrifield B. Solid phase synthesis. *Science.* Apr 18;232(4748):341-7 (1986).
- Mesaeli N, Nakamura K, Zvaritch E, Dickie P, Dziak E, Krause KH, Opas M, MacLennan DH, Michalak M. Calreticulin is essential for cardiac development. *J Cell Biol.* Mar 8;144(5):857-68 (1999).
- Michel F, Westhof E. Modelling of the three-dimensional architecture of group I catalytic introns based on comparative sequence analysis. *J Mol Biol.* Dec 5;216(3):585-610 (1990).
- 25

WO 02/46419

PCT/US01/49861

- Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*. Apr 17;93(2):215-28 (1998).
- Musaro A, McCullagh KJ, Naya FJ, Olson EN, Rosenthal N. IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. *Nature*. Aug 5;400(6744):581-5 (1999).
- Olson EN, Molkentin JD. Prevention of cardiac hypertrophy by calcineurin inhibition: hope or hype? *Circ Res*. 1999 Apr 2;84(6):623-32 (1999).
- Parr T, Waites GT, Patel B, Millake DB, Critchley DR. A chick skeletal-muscle alpha-actinin gene gives rise to two alternatively spliced isoforms which differ in the EF-hand Ca(2+)-binding domain. *Eur J Biochem*. Dec 15;210(3):801-9 (1992).
- Pelletier J, Sonenberg N. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature*. 1988 Jul 28;334(6180):320-5.
- Rao A, Luo C, Hogan PG. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol*;15:707-47 (1997).
- Reinhold-Hurek B, Shub DA. Self-splicing introns in tRNA genes of widely divergent bacteria. *Nature*. May 14;357(6374):173-6 (1992).
- Ritchie ME. Characterization of human B creatine kinase gene regulation in the heart in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. Oct 11;271(41):25485-91 (1996).
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory (1989).
- Schroeter JP, Bretauiere JP, Sass RL, Goldstein MA. Three-dimensional structure of the Z band in a normal mammalian skeletal muscle. *J Cell Biol*. May;133(3):571-83 (1996).
- Seidman CE, Seidman JG. Molecular genetic studies of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol*;93 Suppl 3:13-6 (1998).

WO 02/46419

PCT/US01/49861

- Semsarian C, Wu MJ, Ju YK, Marciniak T, Yeoh T, Allen DG, Harvey RP, Graham RM. Skeletal muscle hypertrophy is mediated by a Ca<sup>2+</sup>-dependent calcineurin signalling pathway. *Nature*. Aug 5;400(6744):576-81 (1999).
- SenGupta DJ, Zhang B, Kraemer B, Pochart P, Fields S, Wickens M. A three-hybrid system  
5 to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proc Nat'l Acad Sci USA*. 1996 Aug  
6;93(16):8496-501.
- Shibasaki, F., Price, E., Milan, D. and McKeon, F. *Nature* 1996 382:370-373.
- Shimoyama M, Hayashi D, Takimoto E, Zou Y, Oka T, Uozumi H, Kudoh S, Shibasaki F,  
Yazaki Y, Nagai R, Komuro I. Calcineurin plays a critical role in pressure overload-induced  
10 cardiac hypertrophy. *Circulation*. 1999 Dec 14;100(24):2449-54.
- Sieweke M. Detection of transcription factor partners with a yeast one hybrid screen. *Methods Mol Biol* 2000;130:59-77.
- Spencer, J., Eliazar, S., Ilaria, R., Richardson, J., Olson, E. *J Cell Biol* 2000 150:771-784.
- Squire J. Muscle regulation: a decade of the steric blocking model. *Nature*. Jun  
15 25;291(5817):614-5 (1981).
- Sussman MA, Lim HW, Gude N, Taigen T, Olson EN, Robbins J, Colbert MC, Gualberto A,  
Wieczorek DF, Molkenin JD. Prevention of cardiac hypertrophy in mice by calcineurin  
inhibition. *Science*. 1998 Sep 11;281(5383):1690-3.
- Taigen T, De Windt LJ, Lim HW, Molkenin JD. Targeted inhibition of calcineurin prevents  
20 agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Proc Nat'l Acad Sci U S A*. 2000 Feb  
1;97(3):1196-201.
- Timmerman LA, Clipstone NA, Ho SN, Northrop JP, Crabtree GR. Rapid shuttling of NF-  
AT in discrimination of Ca<sup>2+</sup> signals and immunosuppression. *Nature*. Oct  
31;383(6603):837-40 (1996).
- 25 Vidal M, Legrain P. Yeast forward and reverse 'n'-hybrid systems. *Nucleic Acids Res* 1999  
Feb 15;27(4):919-29.

WO 02/46419

PCT/US01/49861

- Vigoreaux JO. The muscle Z band: lessons in stress management. *J Muscle Res Cell Motil.* Jun;15(3):237-55 (1994).
- Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, McKeon F, Bobo T, Franke TF, Reed JC. Ca<sup>2+</sup>-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science.* Apr 9;284(5412):339-43 (1999).  
5
- Yang M, Wu Z, Fields S. Protein-peptide interactions analyzed with the yeast two-hybrid system. *Nucleic Acids Res* 1995 Apr 11;23(7):1152-6.
- Youn HD, Sun L, Prywes R, Liu JO. Apoptosis of T cells mediated by Ca<sup>2+</sup>-induced release of the transcription factor MEF2. *Science.* Oct 22;286(5440):790-3 (1999).
- 10 Zhang W, Kowal RC, Rusnak F, Sikkink RA, Olson EN, Victor RG. Failure of calcineurin inhibitors to prevent pressure-overload left ventricular hypertrophy in rats. *Circ Res.* Apr 2;84(6):722-8 (1999).
- Zhuo M, Zhang W, Son H, Mansuy I, Sobel RA, Seidman J, Kandel ER. A selective role of calcineurin  $\alpha$  in synaptic depotentiation in hippocampus. *Proc Nat'l Acad Sci U S A.*  
15 Apr 13;96(8):4650-5 (1999).
- Ziober BL, Kramer RH. Identification and characterization of the cell type-specific and developmentally regulated  $\alpha$ 7 integrin gene promoter. *J Biol Chem.* Sep 13;271(37):22915-22 (1996).

WO 02/46419

PCT/US01/49861

CLAIMS

1. An isolated and purified polypeptide comprising SEQ ID NO:2.
2. An isolated and purified polypeptide consisting of SEQ ID NO:2.
3. An isolated and purified polypeptide comprising SEQ ID NO:6.
- 5 4. An isolated and purified polypeptide consisting of SEQ ID NO:6.
5. An isolated and purified polypeptide comprising SEQ ID NO:10.
6. An isolated and purified polypeptide consisting of SEQ ID NO:10.
7. The isolated and purified polypeptide of claim 1, further comprising an additional coding region.
- 10 8. The isolated and purified polypeptide of claim 3, further comprising an additional coding region.
9. The isolated and purified polypeptide of claim 5, further comprising an additional coding region.
10. An isolated and purified nucleic acid comprising a nucleic acid segment encoding SEQ  
15 ID NO:2.
11. The isolated and purified nucleic acid segment of claim 10, further comprising a promoter active in eukaryotic cells.
12. The isolated and purified nucleic acid segment of claim 10, wherein said nucleic acid further comprises a recombinant vector.
- 20 13. An isolated and purified nucleic acid comprising a nucleic acid segment encoding SEQ ID NO:6.
14. The isolated and purified nucleic acid segment of claim 13, further comprising a promoter active in eukaryotic cells.
- 25 15. The isolated and purified nucleic acid segment of claim 13, wherein said nucleic acid further comprises a recombinant vector.

WO 02/46419

PCT/US01/49861

16. An isolated and purified nucleic acid comprising a nucleic acid segment encoding SEQ ID NO:10.
17. The isolated and purified nucleic acid segment of claim 16, further comprising a promoter active in eukaryotic cells.
- 5 18. The isolated and purified nucleic acid segment of claim 16, wherein said nucleic acid further comprises a recombinant vector.
19. An isolated and purified nucleic acid segment, wherein said nucleic acid segment encodes a fusion polypeptide comprising SEQ ID NO:2.
20. An isolated and purified nucleic acid segment, wherein said nucleic acid segment encodes a fusion polypeptide comprising SEQ ID NO:6.
- 10 21. An isolated and purified nucleic acid segment, wherein said nucleic acid segment encodes a fusion polypeptide comprising SEQ ID NO:10.
22. A knockout non-human animal comprising a defective allele of a nucleic acid encoding a calcineurin associated sarcomeric protein (calsarcin).
- 15 23. The animal of claim 22, further comprising two defective alleles of a nucleic acid encoding a calsarcin.
24. The animal of claim 22, wherein said animal is a mouse.
25. A transgenic non-human animal comprising an expression cassette, wherein said cassette comprises a nucleic acid encoding a calsarcin polypeptide under the control of a promoter active in eukaryotic cells.
- 20 26. The animal of claim 25, wherein said promoter is constitutive.
27. The animal of claim 25, wherein said promoter is tissue specific.
28. The animal of claim 25, wherein said promoter is inducible.
29. The animal of claim 25, wherein said animal is a mouse.

WO 02/46419

PCT/US01/49861

30. A monoclonal antibody that binds immunologically to a polypeptide comprising SEQ ID NO:2, or an antigenic fragment thereof.
31. A polyclonal antisera, antibodies of which bind immunologically to a polypeptide comprising SEQ ID NO:2, or an antigenic fragment thereof.
- 5 32. A monoclonal antibody that binds immunologically to a polypeptide comprising SEQ ID NO:6, or an antigenic fragment thereof.
33. A polyclonal antisera, antibodies of which bind immunologically to a polypeptide comprising SEQ ID NO:6, or an antigenic fragment thereof.
34. A monoclonal antibody that binds immunologically to a polypeptide comprising SEQ ID  
10 NO:10, or an antigenic fragment thereof.
35. A polyclonal antisera, antibodies of which bind immunologically to a polypeptide comprising SEQ ID NO:10, or an antigenic fragment thereof.
36. A method of modulating calcineurin activity in an animal comprising the step of  
15 administering to said organism a calsarcin polypeptide, or a calcineurin-binding fragment thereof.
37. A method of modulating calcineurin activity in an animal comprising the step of administering to said organism a dominant-negative form of a calsarcin polypeptide, or a calcineurin-binding fragment thereof.
38. A method of modulating calcineurin activity in an animal comprising the step of  
20 administering to said animal a nucleic acid which encodes a calsarcin polypeptide, or a calcineurin-binding fragment thereof, said nucleic acid under the control of a promoter operable in cells of said animal.
39. The method of claim 38, wherein said promoter is a constitutive promoter.
40. The method of claim 38, wherein said promoter is a muscle-specific promoter.
- 25 41. The method of claim 40, wherein said muscle-specific promoter is myosin light chain-2 promoter,  $\alpha$  actin promoter, troponin 1 promoter,  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger promoter, dystrophin promoter, creatine kinase promoter,  $\alpha 7$  integrin promoter, brain natriuretic

WO 02/46419

PCT/US01/49861

peptide promoter,  $\alpha$  B-crystallin/small heat shock protein promoter,  $\alpha$  myosin heavy chain promoter or atrial natriuretic factor promoter.

42. The method of claim 38, wherein said nucleic acid comprises a viral vector.

43. A method of screening for a peptide which interacts with a calsarcin comprising the steps of:

5

(a) introducing into a cell:

a first nucleic acid comprising a DNA segment encoding a test peptide, wherein said test peptide is fused to a DNA binding domain; and

10

a second nucleic acid comprising a DNA segment encoding at least a part of calsarcin, wherein said at least part of calsarcin is fused to a DNA activation domain; and

(b) assaying for an interaction between said test peptide and said at least part of calsarcin by assaying for an interaction between said DNA binding domain and said DNA activation domain.

15

44. The method of claim 43, wherein said DNA binding domain and said DNA activation domain are selected from the group consisting of GAL4 and LexA.

45. A method of screening for a modulator of calsarcin binding to  $\alpha$ -actinin comprising:

(a) providing a calsarcin and  $\alpha$ -actinin;

(b) admixing the calsarcin and  $\alpha$ -actinin in the presence of a candidate modulator;

20

(c) measuring calsarcin/ $\alpha$ -actinin binding; and

(d) comparing the binding in step (c) with the binding of calsarcin and  $\alpha$ -actinin in the absence of said candidate modulator,

25

whereby a difference in the binding of calsarcin and  $\alpha$ -actinin in the presence of said candidate modulator, as compared to binding in the absence of said candidate modulator, identifies said candidate modulator as a modulator of calsarcin binding to  $\alpha$ -actinin.

WO 02/46419

PCT/US01/49861

46. The method of claim 45, wherein calsarcin and  $\alpha$ -actinin are part of a cell free system.
47. The method of claim 45, wherein calsarcin and  $\alpha$ -actinin are located within an intact cell.
48. The method of claim 47, wherein said cell is a myocyte.
49. The method of claim 47, wherein said cell is a H9C2 cell, a C2C12 cell, a 3T3 cell, a 293  
5 cell, a neonatal cardiomyocyte cell or a myotube cell.
50. The method of claim 47, wherein said intact cell is located in an animal.
51. The method of claim 45, wherein said modulator increases calsarcin binding to  $\alpha$ -actinin.
52. The method of claim 45, wherein said modulator decreases calsarcin binding to  $\alpha$ -actinin.
53. The method of claim 45, wherein either or both calsarcin and  $\alpha$ -actinin are labeled.
- 10 54. The method of claim 53, wherein both calsarcin and  $\alpha$ -actinin are labeled, one with a  
quenchable label and the other with a quenching agent.
55. The method of claim 53, wherein both calsarcin and  $\alpha$ -actinin are labeled, but said labels  
are not detectable unless brought into proximity of each other.
56. The method of claim 45, wherein measuring comprises immunologic detection of  
15 calsarcin,  $\alpha$ -actinin or both.
57. The method of claim 45, further comprising measuring binding of calsarcin and  $\alpha$ -actinin  
in the absence of a modulator.
58. A method of screening for a modulator of calsarcin binding to calcineurin comprising:
- (a) providing a calsarcin and calcineurin;
  - 20 (b) admixing the calsarcin and calcineurin in the presence of a candidate  
modulator;
  - (c) measuring calsarcin/calcineurin binding; and
  - (d) comparing the binding in step (c) with the binding of calsarcin and calcineurin  
in the absence of said candidate modulator,

WO 02/46419

PCT/US01/49861

whereby a difference in the binding of calsarcin and calcineurin in the presence of said candidate modulator, as compared to binding in the absence of said candidate modulator, identifies said candidate modulator as a modulator of calsarcin binding to calcineurin.

- 5 59. The method of claim 58, wherein calsarcin and calcineurin are part of a cell free system.
60. The method of claim 58, wherein calsarcin and calcineurin are located within an intact cell.
61. The method of claim 60, wherein said cell is a myocyte.
62. The method of claim 60, wherein said cell is a H9C2 cell, a C2C12 cell, a 3T3 cell, a 293  
10 cell, a neonatal cardiomyocyte cell or a myotube cell.
63. The method of claim 60, wherein said intact cell is located in an animal.
64. The method of claim 58, wherein said modulator increases calsarcin binding to calcineurin.
65. The method of claim 58, wherein said modulator decreases calsarcin binding to  
15 calcineurin.
66. The method of claim 58, wherein either or both calsarcin and calcineurin are labeled.
67. The method of claim 66, wherein both calsarcin and calcineurin are labeled, one with a quenchable label and the other with a quenching agent.
68. The method of claim 66, wherein both calsarcin and calcineurin are labeled, but said  
20 labels are not detectable unless brought into proximity of each other.
69. The method of claim 58 wherein measuring comprises immunologic detection of calsarcin, calcineurin or both.
70. The method of claim 58 further comprising measuring binding of calsarcin and calcineurin in the absence of a modulator.
- 25 71. A method of screening for a modulator of calsarcin binding to telethonin comprising:

WO 02/46419

PCT/US01/49861

- (a) providing a calsarcin and telethonin;
- (b) admixing the calsarcin and telethonin in the presence of a candidate modulator;
- (c) measuring calsarcin/telethonin binding; and
- 5 (d) comparing the binding in step (c) with the binding of calsarcin and telethonin in the absence of said candidate modulator,

10 whereby a difference in the binding of calsarcin and telethonin in the presence of said candidate modulator, as compared to binding in the absence of said candidate modulator, identifies said candidate modulator as a modulator of calsarcin binding to telethonin.

72. The method of claim 71, wherein calsarcin and telethonin are part of a cell free system.
73. The method of claim 71, wherein calsarcin and telethonin are located within an intact cell.
74. The method of claim 73, wherein said cell is a myocyte.
75. The method of claim 73, wherein said cell is a H9C2 cell, a C2C12 cell, a 3T3 cell, a 293 cell, a neonatal cardiomyocyte cell or a myotube cell.
- 15 76. The method of claim 73, wherein said intact cell is located in an animal.
77. The method of claim 71, wherein said modulator increases calsarcin binding to telethonin.
78. The method of claim 71, wherein said modulator decreases calsarcin binding to telethonin.
- 20 79. The method of claim 71, wherein either or both calsarcin and telethonin are labeled.
80. The method of claim 79, wherein both calsarcin and telethonin are labeled, one with a quenchable label and the other with a quenching agent.
81. The method of claim 79, wherein both calsarcin and telethonin are labeled, but said labels are not detectable unless brought into proximity of each other.

WO 02/46419

PCT/US01/49861

82. The method of claim 71 wherein measuring comprises immunologic detection of calsarcin, telethonin or both.
83. The method of claim 71 further comprising measuring binding of calsarcin and telethonin in the absence of a modulator.
- 5 84. A method of treating cardiac hypertrophy, heart failure or Type II diabetes comprising the step of administering to an animal suffering therefrom a calsarcin polypeptide, or a calcineurin-binding fragment thereof, wherein said calsarcin polypeptide or fragment thereof inhibits calcineurin activity.
- 10 85. A method of treating cardiac hypertrophy, heart failure or Type II diabetes, comprising the step of administering to an animal suffering therefrom a nucleic acid encoding a calsarcin polypeptide or a calcineurin binding fragment thereof, under the control of a promoter active in cardiac tissue, wherein expression of said calsarcin polypeptide or fragment thereof inhibits calcineurin activity.
- 15 86. The method of claim 85, wherein said polypeptide is a dominant negative form of calsarcin.
87. The method of claim 85, further comprising treating said animal with a compound selected from the group consisting of an ionotrope, a beta blocker, an antiarrhythmic, a diuretic, a vasodilator, a hormone antagonist, an endothelin antagonist, an angiotensin type 2 antagonist and a cytokine inhibitor/blocker.
- 20 88. The method of claim 85 wherein said promoter is a constitutive promoter.
89. The method of claim 85 wherein said promoter is an inducible promoter.
- 25 90. A method of inhibiting calcineurin activation of gene transcription in a cell comprising providing to said cell a fusion protein comprising calsarcin, or a calcineurin-binding fragment thereof, fused to a targeting peptide that localizes said fusion protein to a subcellular region other than a subcellular region of normal function for said calcineurin.

WO 02/46419

PCT/US01/49861

91. The method of claim 90, wherein said targeting peptide comprises a geranylgeranyl group, a nuclear localization signal, a myristilation signal, and an endoplasmic reticulum signal peptide.
92. The method of claim 90, wherein said cell is located in an animal.
- 5 93. The method of claim 92 wherein said animal is a human.
94. The method of claim 93 further comprising treating said animal with a compound selected from the group consisting of an ionotrope, a beta blocker, an antiarrhythmic, a diuretic, a vasodilator, a hormone antagonist, an endothelin antagonist, an angiotensin type 2 antagonist and a cytokine inhibitor/blocker.
- 10 95. A method of identifying a peptide that binds calsarcin comprising the steps of:
- (a) attaching a calsarcin polypeptide, or a fragment thereof, to a support;
  - (b) exposing said calsarcin polypeptide or fragment to a candidate peptide; and
  - (c) assaying for binding of said candidate peptide to said calsarcin polypeptide or fragment thereof.
- 15 96. The method of claim 95, wherein said support is selected from the group consisting of nitrocellulose, a column, or a gel.
97. A method of screening for a candidate substance for anti-cardiomyopic hypertrophy activity or anti-heart failure activity comprising the steps of:
- (a) providing a cell lacking a functional calsarcin polypeptide;
  - 20 (b) contacting said cell with said candidate substance; and
  - (c) determining the effect of said candidate substance on said cell.
98. The method of claim 94, wherein said cell is a muscle cell.
99. The method of claim 97, wherein said cell has a mutation in a regulatory region of calsarcin.

WO 02/46419

PCT/US01/49861

100. The method of claim 97, wherein said mutation is a deletion mutation, an insertion mutation, or a point mutation.
101. The method of claim 97 wherein said cell has a mutation in the coding region of calsarcin.
- 5 102. The method of claim 101, wherein said mutation is a deletion mutation, an insertion mutation, a frameshift mutation, a nonsense mutation, a missense mutation or a splicing mutation.
103. The method of claim 97, wherein said cell is contacted *in vitro*.
104. The method of claim 97, wherein said cell is contacted *in vivo*.
- 10 105. The method of claim 105, wherein said cell is located in a non-human transgenic animal.

1/18

human CAP-1  
 60  
 MLSEHTMKQRKQQAATAIHKVEHGNVDGMDLGKVSIPRDIIMIEELSHSNRGLRFLFKM  
 120  
 RQRSDKYTFENFQYQSRQAQINHSIAMQNGKVDGSLNLEGGSSQAPLTFPENTDFRSPFPNP  
 180  
 DNIAPGYSGLKEIPPEKNTTAVPKYIQSFEWQAISNDPELLEALYPKLFFPEKKAELP  
 240  
 DYRSFNVAATPFGGFEKASRWKFKVPDFELLLLDPRFMSFVNPLSGRRSFNRPAPKRWI  
 SENIPVITTEPTEDATVPESDDL

FIG. 1A

mouse CAP-1  
 60  
 MLSHSVMKQRKQQAATAIHKVEHGNVDGMDLGKVSIPRDIIMIEELSHSNRGLRFLFKM  
 120  
 RQRSDKYTFENFQYQSRQAQINHSIAMQNGKVDGSLNLEGGSSQAPLTFPENTDFRSPFPNP  
 180  
 ENIAPGYSGLKEIPPEKNTTAVPKYRSFEWQAISNDPELLEALYPKLFFPEKKAELR  
 240  
 DYRSFNVAATPFGGFEKASRWKFKVPDFELLLLDPRFMSFVNPLSGRRSFNRPAPKRWI  
 SENIPVITTEPTEDATVPESDDL

FIG. 1B

WO 02/46419

PCT/US01/49861

2/18

human CAP-2

60  
 MFLSCTPAPNKRKRSKLI<sup>60</sup>MELTGGQSSGLNLGKLSVPRDVMLEELSLITNRGSKMF  
 120  
 KLRQMRVEKFIYENHPDVFSDSSMDHFQKFLFVGGQLGTAGQGFYSKSNRGGSGQGG  
 180  
 SSGAGYGSDDQHHLGSGGAGTGGPAGQAGRGGAAAGTAGVGETSGDQAGCGEGKHITV  
 240  
 FKTWISPERANGVDFQKMEIGIDLAYGAKAELEPKYKSNFRNTAMPYGGYKAKSKRMTF  
 QMPKFDLGLLSEPLVLYNQNLNRPFRNRTPIFWLSGSEFVDYNDIGIFLDGETEEL

FIG. 1C

mouse CAP-2

60  
 MFLSGTFAFNKRKRSKLI<sup>60</sup>MELTGGRESSGDLNKGKISVPRDVMLEELSLITNRGSKMF  
 120  
 KLRQMRVEKFIYENHPDVFSDSSMDHFQKFLFVGGQLGTAGQGFYSKSNRGGSGQGG  
 180  
 SAGQYGSRRHQQSGSFGAGGGGPGQAGGGGAPTVGLGEPGSDQAGGGGKHVTVFKT  
 240  
 YISFWRAMGVDPQKVELGIDLAYGAKAELEPKYKSNFRNTAMPYGGYKAKSKRMTFQMP  
 KFDLGLLSEPLVLYNQNLNRPFRNRTPIFWLSGSEHVDYNDVGVIFLDGETEEL

FIG. 1D







WO 02/46419

PCT/US01/49861

6/18

human CAP-2

```

CGGTCACAG AGCTAGTCC TCCAAAGCTG CTGGACCCCA GGGAGAGCTG ACCACTGCCC GAGCAGCCCG CTGAATCCAC CTCACAAATG CCGCTCTCAG      100
GACCCCCCG CCCTAATAAG AAGAGAAAT CCAGCAGCT CATCATGGAA CTCACTGGAG GTGGCAGGA GAGCTCAGGC TTGACCTGG GCAAAAGAGT      200
CAGTGTCCCA AGGATGTCA TTTGGAGGA ACTGTGCTG CTTACCAACC GGGGCTCCA GATCTTCAA CTCGCGACA TTAGGGTGA GAAGTTATTT      300
TATGAGAACC ACCGTGATG TTTCTCTGAC AGCTCAATGG ATCACTTCCA GAAGTTCCTT CCAACAGTGG GGGGCAGCT GGGCAGACT GGTCAAGGAT      400
TCTATACAG CAAGGCAC GGCAGAGCG GAGCCAGGC AGGGGGAT GGCCTGGCG GACATATGG CTCGTATCG CAGCAATG TGGGCTGCG      500
CTCTGAGCT GGGGTACAG CTGTCCCGC GGGCCAGCT GCGAGAGAG GAGCTGCTGG CACAGGGGG GTTGTGAGA CAGGATGAG AGACCAGCCA      600
GGGGAGAG GAAAGATAT CAGTGTGTC AAGACTATA TTTCCCATG GAGCCAGCC ATGGGGGTTG ACCCCAGCA AAAAATGGA CTGGCATG      700
AGCTGCTGG CTATGGGCC AAGCTGAG TTTCCAAATA TAAGTCTTC AACAGGAGC CAATGCCATA TGGTGATAT GAGAAGGCT CCAAGGGGCT      800
GACTTCCAG ATGCCAAGT TTGACTGGG GGCCTTGGT AGTGAACCC TGGTCTCTA CAACCAAAC CTCCTCAACA GGCCTTCTT CAATGGACC      900
CCATTCCTT GGTGAGCTC TGGGAGGCT GTAGACTACA AGCTGCATAT TGGCATCCC TTGATGGAG AAGCAGAGGA GCTGTGAGT GTTCTCTCT      1000
CTGATTTGA TCAATTCGC TCTGTGCTC CAATTTGAG A

```

FIG. 2C

WO 02/46419

PCT/US01/49861

7/18

mouse CAP-2

```

GGGGGGGAGA GGGGACCACC AACGAGGAG CTGGTCAGAT CCACTCCGAC CATGCCACGC TCAGGAAACC CGGGCCCTAA CAGAGGAGGG AAGTCAGGCA 100
AACTGATTAT GGGCTCACT GGAGTGGCC GGGAGAGCTC AGGCTCAAC CTGGGCAGAA AGATCAATGT ECELAGGGAT CTGATGTGG AGGAGCTCTC 200
CTTCTTACC AACCGAGCT CCAGATGTT CAGCTACGG CAGATGGGG TGGAGAAAT TATCTATGAG AATCACCCCG ATCTTTCTC TGCAGCTCA 300
ATGGATCACT TCGAGAACT TCTTCCACA CTGGGAGGAC AGCTGGAGAC AGCTGGTCAG GCTTCTCAT ATGGCAGGGC CAGCATGGCA GGGCAGCTCT 400
GGAGAGTGG CTCTCTGGA CAGTATGGCT CTGACCCTCA TCAGCAGGGC TCTGGGTTG GAGTGGGGG TTCAGGTGT CTGAGGGGCC AGGCTGGTGG 500
AGGAGAGCT CCTGGCAGG TAGGGCTTG AGAGCCGGA TGGGTGACC AGGGAGTGG AGATGGAAA CATCTACTG TCTTCAAGC TTATATTTCC 600
CCATGGGATC GGGCCATGG GCTTATCTT CAGCAAAAAG TGGAACTTG CATTGACCTA CTGGCATAGC CTGGCAAGGC TGAATCCDC AATATATAGT 700
CTTTCAGAG GAGAGAAAT CCGTACGGTG GATATGAGAA GGCCTCAAA CCGATGAGCT TCGAGATGCC CAGTTTGGC CTGGGGCTC TGTGAGTGA 800
ACCCCTGTC CTNCGAAC AGAACCTTC CAGCAGGCT TCTTCAATC GAAACCTAT TCCCTGGTTG AGCTCTGGG AGCATGTAGA CTACAAATG 900
GATTTGGTA TCCCTTGGG TGGAGAGCA GAGGAGCTCT GAACTGCTC CTCCTCTCAT CTGCATCAT TCCCTTCTC GCTTCAAT TGGAGTGA 1000
TGTGGAGAG GATGCCCAA CTGTAACTC AGTATCTTG TGGCAATGA GGTAAAGG TGGGTCTCT TGCCTTCCA CCGTCAAGT TCTGTCTCC 1100
AAGCATCCCT CCGACACG TCAGAGCTCC CATCTGGTG TACCAATAG AATCTCTCT TTTATGGAT TTCT

```

FIG. 2D

8/18

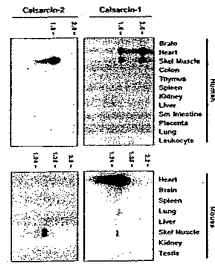


FIG. 3

FIG. 4C

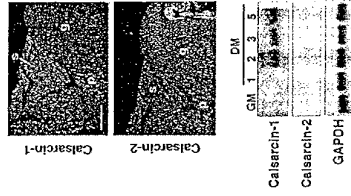


FIG. 4E

FIG. 4A

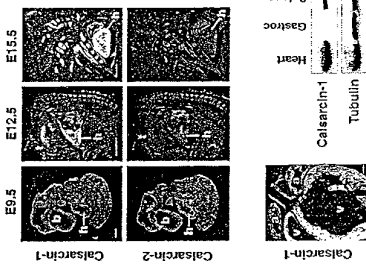


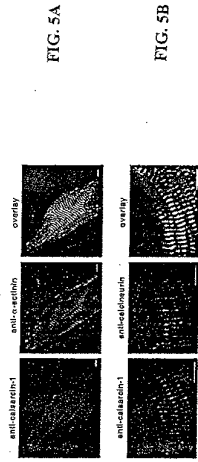
FIG. 4D

FIG. 4B

WO 02/46419

PCT/US01/49861

10/18



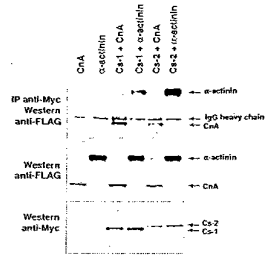


FIG. 6A

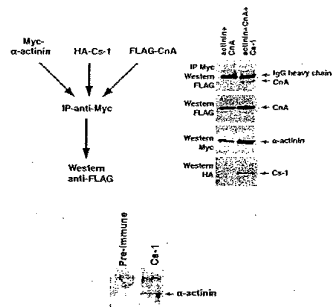


FIG. 6B

FIG. 6C



13/18

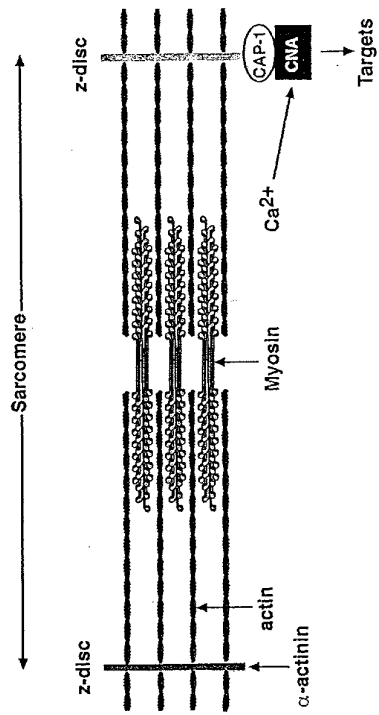


FIG. 8

WO 02/46419

PCT/US01/49861

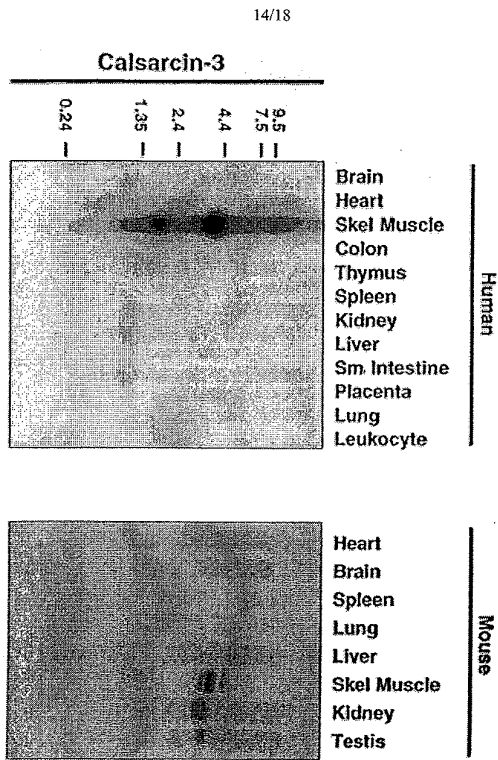


FIG. 9

WO 02/46419

15/18

PCT/US01/49861

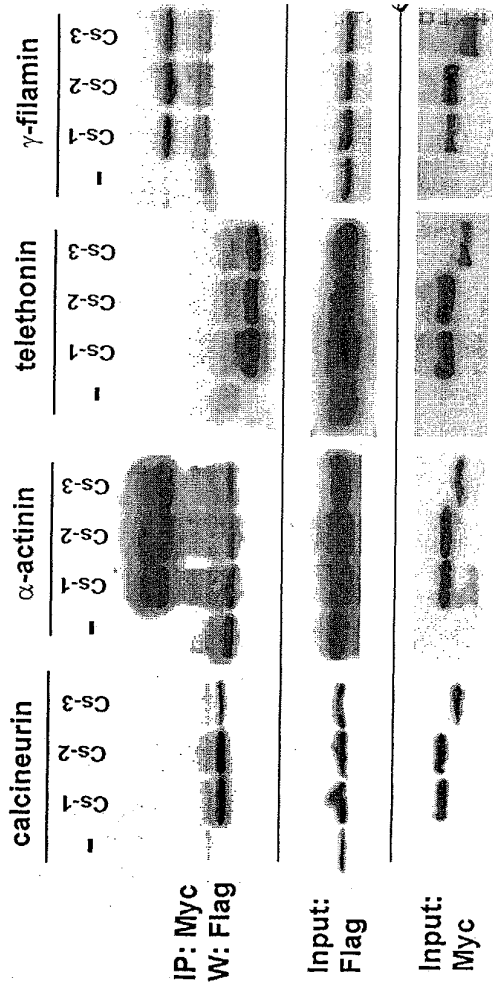


FIG. 10

WO 02/46419  
16/18

PCT/US01/49861

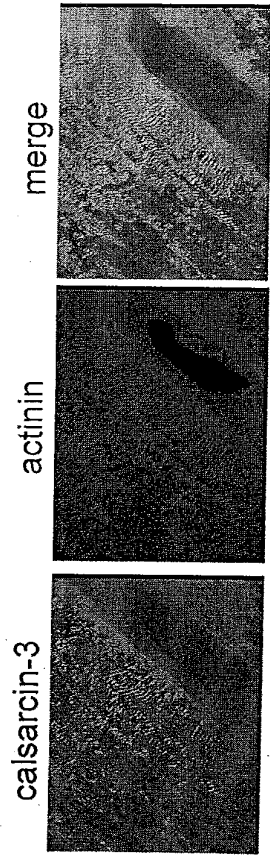


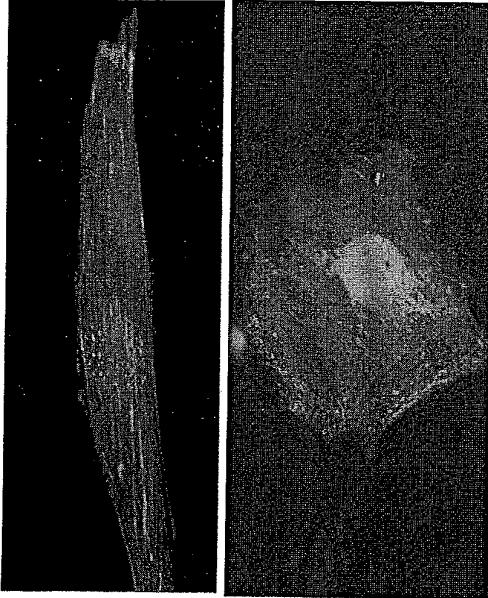
FIG. 11

WO 02/46419

PCT/US01/49861

17/18

FIG. 12



ClustalW Formatted Alignments

```

calarsin3 1  M P L S  T P A A  M R  R Q K Q F  M A A  G L L T P P F  D L G K K  S V P D D  P E I S L R N R R  47
calarsin2 1  M P L S  T P A A  M R  R Q K Q F  M A A  G L L T P P F  D L G K K  S V P D D  P E I S L R N R R  47
calarsin1 1  M P L S  T P A A  M R  R Q K Q F  M A A  G L L T P P F  D L G K K  S V P D D  P E I S L R N R R  47
calarsin3 48  G S I L P F K  R Q R R V  K F T E F  L A S Q F  A M L G A  R K V G  G  S G T V  A  G P E G P N Y  102
calarsin2 48  G S I L P F K  R Q R R V  K F T E F  L A S Q F  A M L G A  R K V G  G  S G T V  A  G P E G P N Y  102
calarsin1 48  G S I L P F K  R Q R R V  K F T E F  L A S Q F  A M L G A  R K V G  G  S G T V  A  G P E G P N Y  102
calarsin3 103  S E L I I P P A  P G A S  L G P E G  H T  A P  A C C V P S  P S  A P G Y  E P F K G  P P  . . . . .  151
calarsin2 103  S E L I I P P A  P G A S  L G P E G  H T  A P  A C C V P S  P S  A P G Y  E P F K G  P P  . . . . .  151
calarsin1 103  S E L I I P P A  P G A S  L G P E G  H T  A P  A C C V P S  P S  A P G Y  E P F K G  P P  . . . . .  151
calarsin3 153  . . . . . E K . . . . . F N H Y A  P N G Y  P P  F S  V E D Y  G  . . . . . S E F  . . . . .  183
calarsin2 153  . . . . . E K . . . . . F N H Y A  P N G Y  P P  F S  V E D Y  G  . . . . . S E F  . . . . .  183
calarsin1 153  . . . . . E K . . . . . F N H Y A  P N G Y  P P  F S  V E D Y  G  . . . . . S E F  . . . . .  183
calarsin3 184  R T P S P N D Y R N P N T I  P F G G P L V O G  . . . . . T L P R P  . . . . . G T P E I P P S  G S  T  P L L  231
calarsin2 214  E L P . . . . S F N R V A  P F G G P L V O G  . . . . . T L P R P  . . . . . G T P E I P P S  G S  T  P L L  231
calarsin1 178  E L P . . . . D Y S F N R V A  P F G G P L V O G  . . . . . T L P R P  . . . . . G T P E I P P S  G S  T  P L L  231
calarsin3 232  R S F N R V A  G W R N L F  . . . . . P P D Y V  I G I P L  O  R  E E L  299
calarsin2 246  R S F N R V A  G W R N L F  . . . . . P P D Y V  I G I P L  O  R  E E L  299
calarsin1 220  R S F N R V A  G W R N L F  . . . . . P P D Y V  I G I P L  O  R  E E L  299

```

FIG. 13

WO 02/46419

PCT/US01/49861

## SEQUENCE LISTING

<110> OLSON, ERIC  
FREY, NORBERT

<120> METHODS AND COMPOSITIONS RELATING TO MUSCLE SPECIFIC  
CALCINEURIN ASSOCIATED PROTEIN (CAP)

<130> UTFD:729-WO

<140> UNKNOWN

<141> 2001-11-07

<150> 60/246,629

<151> 2000-11-07

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2531

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1  
gtcccagggt caaggataaa aaccatcagg cccaagtgcc atccatagtc catctccaga 60  
gtcttctctcc acaaaactggg attcacatccc gctgaaaaag cacaatctaa cagcaaggga  
120  
acaaaaaac catgctatca cataatacta tgatgaagca gagaaaaag caagcaacag  
180  
ccatcatgaa ggaagtccat ggaaatgatg ttgatggcat ggacctgggc aaaaaggtea  
240  
gcacccccag agacatcatg ttggaagaat tatccatct cagtaaccgt ggtgccaggc  
300  
tatttaagat gcgtcaaaga agatctgaca aatacacatt tgaaaattc cagtatcaat  
360  
ctagegcaca aataaatcac agtattgcta tgcagaatgg gaaagtggat ggaagtaact  
420  
tggaagtggt ttgcagcaa gcccccttga ctctcccaa caccocagat ccacgaagcc  
480  
ctccaaatcc agacaacatt gctccaggat attctggacc actgaaggaa attcctctg  
540  
aaaaatcaa caccacagct gtccctaagt actatcaatc tcctgggag caagccatta  
600  
gcaatgatcc ggagcttita gaggctttat atcctaaact tttcaagcct gaeggaaagg  
660  
cagaactgcc tgattacagg agctttaaca gggttgccac accatttga ggttttga  
720  
aagcatcaag aatgggttaa ttaaagtcc cagattttga gotactattg ctaacagatc  
780  
ccaggtttat gtcctttgtc aatccccctt ctggcagacg gtcctttaat aggactccta  
840

WO 02/46419

PCT/US01/49861

```

900   agggatggat atctgagaat attcctatag tgataacaac cgaacctaca gatgatacca
      ctgtaccaga atcagaagac ctatgaaaag aaagttgtat gtgccacata aaactctgaa
960   tataaaaagt gctgttctac tattttaact actggcaaag cacttgcat tttcattagt
1020  agcaacaata gcaatttagt gattttccct ttctgacatt caatttcaat ctcagatcaa
1080  ataactaata acaattagaa atottacttt aaaaaactta taactcactt gtcttcattc
1140  ataattttgt tttcacctgg tttaaagaat ccagatattt tactgcaaaa gttcagatgg
1200  aaaagtaatt gacagcttca cctttgtctc attttatatg atttattaca gtgtaagttt
1260  ttcaagtggg atctagaatc aaaatacagg gagagatatg aagacctatt cagagtttca
1320  tctgggggat aaagctatgg aagatgatgt acaaatgtta ttgatggaga aaatggttgg
1380  tgtgtccttt ctggtgacca tgagaaaata atatgtcttg atgaagtctt ttcattagtc
1440  actcttagaa ttctaaagtg ctttgacttt ttcaatatgt tttgaatcat taggtaattt
1500  attctgggat atattctcca aaattcaatt cagttattat attcatttag cattaagtca
1560  aggagactga gaatgactca agggactgca tagtaccata gttttaagga ccaaggtgtg
1620  cccagaattc aagtttcaca aatcccaatg ctgtgcattg attatgttca actttatgtg
1680  tgcattctta gaagagtaag aacaaataaa gtacaccgta atatacatat aaatacattc
1740  atgtttgtga gagaaggaaa gagtaagtaa tttgaattgg cagctttctt tgctaaatct
1800  ttaattctgy ttaagatcct caagtaactg gggagtacat gctttaggac acaaacaaaa
1860  acaaaaggca tgaagtatc tgaagcaat gtagcacata tctatcgtaa tatatgtaat
1920  atattgacat aaaagacaca aactaatata aagttatagt tatatcttaa aatataatg
1980  aagaagcata tgacatataa cttatagaaa tcagtatcaa ttccctccat ttcaattcag
2040  ttaagactct gtgatagatg tttatagcag agaagaaatg tctcatcaat agggaaacta
2100  tcagataaag tttaggagat aggaagaagg actgtgtgta gtaatgaaaa taccaagttg
2160  caacattaca tgtttacaaa aaaaatctgt gttttagtg tggaagttgg tgaactgttt
2220  aatcatcctc tagacttgtt aagtagaaaa attttaaaaa tttgcttatg aaaatataac
2280  cccagaaaag taacaatgac aaagtattat atttatata atttatttag agaatttgta
2340  tattttttaa gatgtcttaa gatatcttaa ttttatttat aagttttggt gtttacctgt
2400

```

WO 02/46419

PCT/US01/49861

2460 tttaaaatga taatgttggc atctgtgata aactatcaat gaggtctcca tcatgccatt  
 2520 ttttgttcat tttaatcttt aaaaaataaa aattaggcat attaaaaaaa aaaaaaaaaa  
 2531 aaaaaaaaaa a

<210> 2  
 <211> 264  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2  
 Met Leu Ser His Asn Thr Met Met Lys Gln Arg Lys Gln Gln Ala Thr  
 1 5 10 15  
 Ala Ile Met Lys Glu Val His Gly Asn Asp Val Asp Gly Met Asp Leu  
 20 25 30  
 Gly Lys Lys Val Ser Ile Pro Arg Asp Ile Met Leu Glu Glu Leu Ser  
 35 40 45  
 His Leu Ser Asn Arg Gly Ala Arg Leu Phe Lys Met Arg Gln Arg Arg  
 50 55 60  
 Ser Asp Lys Tyr Thr Phe Glu Asn Phe Gln Tyr Gln Ser Arg Ala Gln  
 65 70 75 80  
 Ile Asn His Ser Ile Ala Met Gln Asn Gly Lys Val Asp Gly Ser Asn  
 85 90 95  
 Leu Glu Gly Gly Ser Gln Gln Ala Pro Leu Thr Pro Pro Asn Thr Pro  
 100 105 110  
 Asp Pro Arg Ser Pro Pro Asn Pro Asp Asn Ile Ala Pro Gly Tyr Ser  
 115 120 125  
 Gly Pro Leu Lys Glu Ile Pro Pro Glu Lys Phe Asn Thr Thr Ala Val  
 130 135 140  
 Pro Lys Tyr Tyr Gln Ser Pro Trp Glu Gln Ala Ile Ser Asn Asp Pro  
 145 150 155 160  
 Glu Leu Leu Glu Ala Leu Tyr Pro Lys Leu Phe Lys Pro Glu Gly Lys  
 165 170 175  
 Ala Glu Leu Pro Asp Tyr Arg Ser Phe Asn Arg Val Ala Thr Pro Phe  
 180 185 190  
 Gly Gly Phe Glu Lys Ala Ser Arg Met Val Lys Phe Lys Val Pro Asp  
 195 200 205

WO 02/46419

PCT/US01/49861

Phe Glu Leu Leu Leu Thr Asp Pro Arg Phe Met Ser Phe Val Asn  
 210 215 220

Pro Leu Ser Gly Arg Arg Ser Phe Asn Arg Thr Pro Lys Gly Trp Ile  
 225 230 235 240

Ser Glu Asn Ile Pro Ile Val Ile Thr Thr Glu Pro Thr Asp Asp Thr  
 245 250 255

Thr Val Pro Glu Ser Glu Asp Leu  
 260

<210> 3  
 <211> 1207  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<400> 3  
 gagagcgcac caccaactga gcagctggtc agatccacct ccaccatgcc actctcagga 60  
 accccggccc ctaacaagag gaggaagtca agcaaaactga ttatggagct cactggagggt  
 120 ggccgggaga gctcaggcct gaacctgggc aagaagatca gtgtcccaag ggatgtgatg  
 180 ttggaggagc tgtcccttct taccaaccga ggctccaaga tgttcaagct acggcagatg  
 240 cgggtggaga aatttatcta tgagaatcac cccgatgttt tctctgacag ctcaatggat  
 300 cacttccaga agttttctcc cacagtggga ggacagctgg agacagctgg tcagggtctc  
 360 tcatatggca agggcagcag tggaggccag gctggcagca gtggctctgc tggacagtat  
 420 ggctctgacc gtcacagca gggctctggg ttggagctg ggggtcagg tggctctggg  
 480 ggccaggctg gtggaggagg agctcctggc acagtgggc ttggagagcc cggatcaggt  
 540 gaccaggcag gtggagatgg aaaacatgtc actgtgttca agaactatat ttcccatgg  
 600 gatcgggcca tgggggttga tcctcagcaa aaagtggaac ttggcattga cctactggca  
 660 tacggtgcca aagctgaact ccccaaatat aagtccttca acaggacagc aatgccttac  
 720 ggtggatatg agaaggcctc caaacgcctg acctccaga tgccaagtt tgacctgggg  
 780 cctctgtgta gtgaaccctt ggtcctctac aaccagaacc tctccaacag gcttctttc  
 840 aatcgaaecc ctattccctg gttgagctct ggggagcatg tagactacaa cgtggatggt  
 900 ggtatccoct tggatggaga gacagaggag ctgtgaagtg cctcctcctg tcatgtgcat  
 960 catttccctt ctctggttcc aatttgagag tggatgctgg acaggatgcc ccaactgtta  
 1020

WO 02/46419

PCT/US01/49861

1080 atccagtatt cttgtggcaa tggagggtaa aggggtgggt ccgttgcctt tccacccttc  
 1140 aagttcctgc tccgaagcat cctcctcac cagctcagag ctcccatcct getgtaccat  
 1200 atggaatctg ctcttttatg gaattttctc tgcaccgggt aacagtcaat aaacttcaag  
 1207 gaaatga

<210> 4  
 <211> 296  
 <212> FRT  
 <213> Mus musculus

<400> 4  
 Met Pro Leu Ser Gly Thr Pro Ala Pro Asn Lys Arg Arg Lys Ser Ser  
 1 5 10 15  
 Lys Leu Ile Met Glu Leu Thr Gly Gly Arg Glu Ser Ser Gly Leu  
 20 25 30  
 Asn Leu Gly Lys Lys Ile Ser Val Pro Arg Asp Val Met Leu Glu Glu  
 35 40 45  
 Leu Ser Leu Leu Thr Asn Arg Gly Ser Lys Met Phe Lys Leu Arg Gln  
 50 55 60  
 Met Arg Val Glu Lys Phe Ile Tyr Glu Asn His Pro Asp Val Phe Ser  
 65 70 75 80  
 Asp Ser Ser Met Asp His Phe Gln Lys Phe Leu Pro Thr Val Gly Gly  
 85 90 95  
 Gln Leu Glu Thr Ala Gly Gln Gly Phe Ser Tyr Gly Lys Gly Ser Ser  
 100 105 110  
 Gly Gly Gln Ala Gly Ser Ser Gly Ser Ala Gly Gln Tyr Gly Ser Asp  
 115 120 125  
 Arg His Gln Gln Gly Ser Gly Phe Gly Ala Gly Gly Ser Gly Gly Pro  
 130 135 140  
 Gly Gly Gln Ala Gly Gly Gly Gly Ala Pro Gly Thr Val Gly Leu Gly  
 145 150 155 160  
 Glu Pro Gly Ser Gly Asp Gln Ala Gly Gly Asp Gly Lys His Val Thr  
 165 170 175  
 Val Phe Lys Thr Tyr Ile Ser Pro Trp Asp Arg Ala Met Gly Val Asp  
 180 185 190  
 Pro Gln Gln Lys Val Glu Leu Gly Ile Asp Leu Leu Ala Tyr Gly Ala

WO 02/46419

PCT/US01/49861

```

195                200                205
Lys Ala Glu Leu Pro Lys Tyr Lys Ser Phe Asn Arg Thr Ala Met Pro
210                215                220
Tyr Gly Gly Tyr Glu Lys Ala Ser Lys Arg Met Thr Phe Gln Met Pro
225                230                235                240
Lys Phe Asp Leu Gly Pro Leu Leu Ser Glu Pro Leu Val Leu Tyr Asn
245                250                255
Gln Asn Leu Ser Asn Arg Pro Ser Phe Asn Arg Thr Pro Ile Pro Trp
260                265                270
Leu Ser Ser Gly Glu His Val Asp Tyr Asn Val Asp Val Gly Ile Pro
275                280                285
Leu Asp Gly Glu Thr Glu Glu Leu
290                295

<210> 5
<211> 1261
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 5
cggtcacagc agctcagtc tccaaagctg ctggacccca gggagagctg accactgcc 60
gagcagccgg ctgaatccac ctccacaatg ccgctctcag gaaccccggc cctaataag
120
aagaggaaat ccagcaagct gatcatgaa ctoactggag gtggacagga gagctcaggc
180
ttgaacctgg gcaaaaagat cagtgtccca agggatgtga tgttgaggga actgtcctg
240
cttaccaccc ggggtcccaa gatgttcaaa ctgcggcaga tgagggtgga gaagtttatt
300
tatgagaacc accctgatgt tttctctgac agctcaatgg atcaactcca gaagttcctt
360
ccaacagtg gggacagct gggcacagct ggtcagggat tctcatacag caagagcaac
420
ggcagaggcg gcagccagcg agggggcagt ggctctgccg gacagtatgg ctctgatcag
480
cagcaccatc tgggctctgg gtctggagct gggggtacag gtggtccgc gggccaggct
540
ggcaaaggag gagctgctgg cacaacaggg gttggtgaga caggatcagg agaccaggca
600
ggcggagaag gaaaacatat cactgtgttc aagacctata tttcccatg ggagcgagcc
660
atgggggttg acccccagca aaaaatggaa cttggcattg acctgctggc ctatggggcc
720
aaagctgaac ttcccaata taagtccttc aacaggacgg caatgcccta tgggtgatat
780

```

WO 02/46419

PCT/US01/49861

840 gagaaggcct ccaaacgcat gaccttcag atgcccgaagt ttgacctggg gcccttgctg  
 900 agtgaacccc tggctccteta caacccaaac ctctccaaca ggcctcttt caatcgaacc  
 960 cctattccct ggctgagctc tggggagcct gtagactaca acgtggatat tggcatcccc  
 1020 ttggatggag aaacagagga gctgtgaggt gtttctcct ctgatttga tcatttcccc  
 1080 tctctggctc caatttgag agggaatgct gacagatag cccccattgt taatccagta  
 1140 tccttatggg aatggaggga aaaaggagag atctaccttt coactctta ctccaagtec  
 1200 coactccacg catcttctc caccaactca gagctcccct tctacttgc ccatatggaa  
 1260 cctgctcgtt tatggaatt ntctgccacc agtaacagtc aataaacttc aaggaaaatg  
 1261 a

<210> 6  
 <211> 299  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 6  
 Met Pro Leu Ser Gly Thr Pro Ala Pro Asn Lys Lys Arg Lys Ser Ser  
 1 5 10 15  
 Lys Leu Ile Met Glu Leu Thr Gly Gly Gln Glu Ser Ser Gly Leu  
 20 25 30  
 Asn Leu Gly Lys Lys Ile Ser Val Pro Arg Asp Val Met Leu Glu Glu  
 35 40 45  
 Leu Ser Leu Leu Thr Asn Arg Gly Ser Lys Met Phe Lys Leu Arg Gln  
 50 55 60  
 Met Arg Val Glu Lys Phe Ile Tyr Glu Asn His Pro Asp Val Phe Ser  
 65 70 75 80  
 Asp Ser Ser Met Asp His Phe Gln Lys Phe Leu Pro Thr Val Gly Gly  
 85 90 95  
 Gln Leu Gly Thr Ala Gly Gln Gly Phe Ser Tyr Ser Lys Ser Asn Gly  
 100 105 110  
 Arg Gly Gly Ser Gln Ala Gly Gly Ser Gly Ser Ala Gly Gln Tyr Gly  
 115 120 125  
 Ser Asp Gln Gln His His Leu Gly Ser Gly Ser Gly Ala Gly Gly Thr  
 130 135 140

WO 02/46419

PCT/US01/49861

Gly Gly Pro Ala Gly Gln Ala Gly Lys Gly Gly Ala Ala Gly Thr Thr  
 145 150 155 160  
 Gly Val Gly Glu Thr Gly Ser Gly Asp Gln Ala Gly Gly Glu Gly Lys  
 165 170 175  
 His Ile Thr Val Phe Lys Thr Tyr Ile Ser Pro Trp Glu Arg Ala Met  
 180 185 190  
 Gly Val Asp Pro Gln Gln Lys Met Glu Leu Gly Ile Asp Leu Leu Ala  
 195 200 205  
 Tyr Gly Ala Lys Ala Glu Leu Pro Lys Tyr Lys Ser Phe Asn Arg Thr  
 210 215 220  
 Ala Met Pro Tyr Gly Gly Tyr Glu Lys Ala Ser Lys Arg Met Thr Phe  
 225 230 235 240  
 Gln Met Pro Lys Phe Asp Leu Gly Pro Leu Leu Ser Glu Pro Leu Val  
 245 250 255  
 Leu Tyr Asn Gln Asn Leu Ser Asn Arg Pro Ser Phe Asn Arg Thr Pro  
 260 265 270  
 Ile Pro Trp Leu Ser Ser Gly Glu Pro Val Asp Tyr Asn Val Asp Ile  
 275 280 285  
 Gly Ile Pro Leu Asp Gly Glu Thr Glu Glu Leu  
 290 295

<210> 7  
 <211> 982  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<400> 7  
 attcggcaca tgggatcgag ggaccatgcc gttccagggt caaggataaa acccattggg 60  
 ccatagtgcc gtcatatccc accttcagtg ccttctcca caattgggat teaccctg  
 120  
 tgaaaagcgc acgctgacag caaggaaca aaaaactatg ctatcacata gtgccatggt  
 180  
 gaagcaaagg aaacagcaag catcagccat cacgaaggaa atccatggac atgatgttga  
 240  
 cggcatggac ctgggcaaaa aagtttagcat ccccagagac atcatgatag aagaattgtc  
 300  
 ccatttcagt aatcgtgggg ccagggtggt taagatgcgt caaagaagat ctgacaaata  
 360  
 cacctttgaa aatttcagt atgaatctag agcacaatt aatcacaata tcgcatgca  
 420  
 gaatgggaga gttgatggaa gcaacctgga aggtggctca cagcaaggcc cctcaactcc  
 480

WO 02/46419

PCT/US01/49861

```

540 gcccaacacc cccgatccac gaagccccc aaatccagag aacatcgcac caggatattc
600 tggaccactg aaggaaattc ctctgaaag gtttaacacg acggccgttc ctaagtacta
660 ccggtctcca tgggagcagg cgattggcag cgatccggag ctctggagg ctttgtaacc
720 aaaacttttc aagcctgaag gaaaagcaga actgcgggat tacaggagct ttaacagggt
780 tgccactcca ttggagggtt ttgaaaaagc atcaaaaatg gtcaaatca aagttccaga
840 ttttgaacta ctgctgctga cagatcccag gttcttggcc tttgccaatc ctcttccggg
900 cagacgatgc ttaacaggg cgccaaaggg gtgggtatct gagaatatcc ccgtcgtgat
960 cacaactgag cctacagaag acgccactgt accggaatca gatgacctgt gagaggggaag
982 ctgggggatgc          cacaggaagt          tc

```

```

<210> 8
<211> 264
<212> PRT
<213> Mus musculus

```

```

<400> 8
Met Leu Ser His Ser Ala Met Val Lys Gln Arg Lys Gln Gln Ala Ser
  1          5          10          15

Ala Ile Thr Lys Glu Ile His Gly His Asp Val Asp Gly Met Asp Leu
  20          25          30

Gly Lys Lys Val Ser Ile Pro Arg Asp Ile Met Ile Glu Glu Leu Ser
  35          40          45

His Phe Ser Asn Arg Gly Ala Arg Leu Phe Lys Met Arg Gln Arg Arg
  50          55          60

Ser Asp Lys Tyr Thr Phe Glu Asn Phe Gln Tyr Glu Ser Arg Ala Gln
  65          70          75          80

Ile Asn His Asn Ile Ala Met Gln Asn Gly Arg Val Asp Gly Ser Asn
  85          90          95

Leu Glu Gly Gly Ser Gln Gln Gly Pro Ser Thr Pro Pro Asn Thr Pro
 100          105          110

Asp Pro Arg Ser Pro Pro Asn Pro Glu Asn Ile Ala Pro Gly Tyr Ser
 115          120          125

Gly Pro Leu Lys Glu Ile Pro Pro Glu Arg Phe Asn Thr Thr Ala Val
 130          135          140

```

WO 02/46419

PCT/US01/49861

Pro Lys Tyr Tyr Arg Ser Pro Trp Glu Gln Ala Ile Gly Ser Asp Pro  
 145 150 155 160

Glu Leu Leu Glu Ala Leu Tyr Pro Lys Leu Phe Lys Pro Glu Gly Lys  
 165 170 175

Ala Glu Leu Arg Asp Tyr Arg Ser Phe Asn Arg Val Ala Thr Pro Phe  
 180 185 190

Gly Gly Phe Glu Lys Ala Ser Lys Met Val Lys Phe Lys Val Pro Asp  
 195 200 205

Phe Glu Leu Leu Leu Leu Thr Asp Pro Arg Phe Leu Ala Phe Ala Asn  
 210 215 220

Pro Leu Ser Ser Gly Arg Arg Cys Phe Asn Arg Ala Pro Lys Gly Trp Val  
 225 230 235 240

Ser Glu Asn Ile Pro Val Val Ile Thr Thr Glu Pro Thr Glu Asp Ala  
 245 250 255

Thr Val Pro Glu Ser Asp Asp Leu  
 260

<210> 9  
 <211> 3330  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<400> 9  
 gggacgccac gcaactctca gcttcccagc agagggtgta atcttgagg tctaagattc 60  
 cctcctgcct attgaggtcc catcctctca ggatgatccc caaggagcag aaggggccag  
 120  
 tgatggctgc catgggggac ctaactgaac cagtccttac gctggacctg ggcaagaagc  
 180  
 tgagcgtgcc ccaggacctg atgatggagg agctgtcact acgcaacaac agagggtccc  
 240  
 tcctcttcca gaagaggcag cgccgtgtgc agaagttcac tttegagtta gcagccagcc  
 300  
 agcggcgcat gctggccgga agcgcagga ggaagtgac tggaacagcg gactcgggga  
 360  
 cgyttgcaa tgccaatggc cctgaggggc cgaactaccg ctccgagctc cacatcttcc  
 420  
 cggcctcacc cggggcctca ctcgggggtc ccgagggcgc ccaccctgca gcccccctg  
 480  
 ctgggtgcgt ccccagcccc agcgcctcgg cgccaggcta tgcggagccg ctgaagggcg  
 540  
 tccgcgcaga gaagttcaac cacaccgcca tcccgaagg ctaccgctgc ccttgccagg  
 600  
 agttcgtcag ctaccgggac taccagagcg atggccgaag tcacaccccc agccccaaag  
 660

WO 02/46419

PCT/US01/49861

```

720 actaccgaaa ttcaacaag accccggtgc catttgagg acccctcgtg gggggcactt
780 ttcccagacc aggcaccccc ttcatccccg agcccctcag tggcttgga ctcctccgtc
840 tcagaccacc cttcaacaga gtggcccagg gctgggtccg taacctccca gagtccgagg
900 agctgtagcc ctgacctgaa tcttcagttc cccagtctcg ggggcctggt aacatccgga
960 gccaaagact gtggacagca cttcacagtt gaagaaggcc cttcacacac aaaacctgat
1020 tgcaaatggc ttcagaggtc accaagttca gtcgtcccaa aacatgggtg tgtttcaaaa
1080 ttacctgggg atgttgttcc aaatccagac aactggactg tcccagactt gcagcatcag
1140 agtctctcga gtcgaggaat ctgtattatt aatagcaacc agggccgggt gtcgtggctc
1200 acgacctgca tcccagcact ttgggaggcc gaggcaggag gatcacctga ggtcaggagt
1260 tttgagacca gtctggccaa aatagtggaa ccccgctcct actaaaaata caaaaatgag
1320 tcggacatgg tgggtcatgc ctgtaatccc agctacttgg gaggtgaga caggagaatc
1380 acttgaacta ggaggcagag gttgcagtga gccgagattg cgcactgca ccccagcctg
1440 gacaacagag tgagactcct tctcaaaagt aaataaataa atagcaacca gtaactccagg
1500 tgattccagc ataacttacc catggtttgt gtcattagga gtccacatcc acacctctgc
1560 tctttcctgt tctgtagtg taactcccc cgggtgacagg gtgctcactg gcaccccatc
1620 ttctgtgtaa taactcaaat aattagaaaa tgttcccttt actgagatgc agttgtcttt
1680 catctattca tgctctaac agttcctaag cgctgactgt gcgctagaca ctgccaggcc
1740 cgggcctcga ggaggaaaag acagtaggga agacattata gagcatgaag tcaccataat
1800 tttccctaaa gcatgcttat tgacaattga ggaacaaagt gttgggagca gaagaaggag
1860 tccctcaccg taggtgtgag atgggattct ggaagcttcc tgaaggattt gagtgggacc
1920 ttgtgggagg cgtgagatc catgaagggg gtgtgagggg gaggtatatt ctggaagtg
1980 gaccagcatg tgcaaaaata tggaaactgag cacgggtgca ggggttctct cagaaggag
2040 aaggctgtgc tagaggagcc agtgagggcc agcatggggg gggcttccact aaggaaatgg
2100 ggaaggtttt agtgatgggt cttgctgggt gctgtgtggg gcgcatattg gagaagggta
2160 atgccagaag ccaggaagcc tgcaagggat gaggccatgg gaatggagag aaggggccac
2220 ccactgggca cctaacagga caggtgcaaa gtgggggtgct tattaagatt ccttctttcc

```

WO 02/46419

PCT/US01/49861

```

2280 actccatttt gagcaggctg cttaaagtgg tggatgatgat gatgatgatg atggcagctt
2340 tatatcagagt gectcagtgct ttgggctggt agtagtttct ctacatatct tatttctaata
2400 tctcagaaca accctgagag aaagatattg ttgtcccccac tttacagatg tggatattta
2460 ggcoaaaagg aggaagtgcac ttcccaaggga cagacaccaa atgggaatct gattccagtg
2520 gatgtctctt ttcagtgcac tgggtggtca atgcccactc gctctgaaat catctgactg
2580 tgatgccctg ccttgagatt tagaagttga gtgcaggctt gggagtcaga ctggatgggg
2640 taggttctaa ctctgccact gctagccgga tgaacttgag caagtcattt cacatctccg
2700 agcctctggt tctccaagtg taagatgagg acaagtataa aacctccttt atgggtttgt
2760 tgtgaacaca gtgcagggca catttataat aagagctcag tcaatggtag gtttcatgca
2820 actgctgctc taggctggaa aagttgttct tgcactggat gcagcatgag aagctggctg
2880 ctaagatgct actgggggtc actaaagctg aagcctgaag gaaagcctct cattgctgta
2940 gagctctccc tgcctctctc tctgggggctg atgggggaagg tcaggagtcc agcccattcc
3000 caggggtgtg gggatagcga ttgcattttc cttttgctct ggagtttcc tcccctctg
3060 ggtoccaaagg gcccaatggc ctgactttta gaattgcttg caattggtgt tttctcttga
3120 atttgggggc tgccatttaa agccaggttt coactgagctg aagaccagcc attcaagaat
3180 ctgaaaagta gacaagagga ctccagttgc ctcaggttgg ttctgctgtg ctctggaag
3240 taaactgcagc caccaggtat gaaaaggagc ctggtgggga gacctgca cccaaaacaa
3300 atcctttctt cttctgagaa tgtgactttt tctggtgttg taaaaaagaa aaaaaaaag
3330 aatgctcatt          gtaaaaaaa          aaaaaaaaa

```

<210> 10  
<211> 251  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 10  
Met Ile Pro Lys Glu Gln Lys Gly Pro Val Met Ala Ala Met Gly Asp  
1 5 10 15  
Leu Thr Glu Pro Val Pro Thr Leu Asp Leu Gly Lys Lys Leu Ser Val  
20 25 30  
Pro Gln Asp Leu Met Met Glu Glu Leu Ser Leu Arg Asn Asn Arg Gly

WO 02/46419

PCT/US01/49861

35 40 45

Ser Leu Leu Phe Gln Lys Arg Gln Arg Arg Val Gln Lys Phe Thr Phe  
50 55 60

Glu Leu Ala Ala Ser Gln Arg Ala Met Leu Ala Gly Ser Ala Arg Arg  
65 70 75 80

Lys Val Thr Gly Thr Ala Glu Ser Gly Thr Val Ala Asn Ala Asn Gly  
85 90 95

Pro Glu Gly Pro Asn Tyr Arg Ser Glu Leu His Ile Phe Pro Ala Ser  
100 105 110

Pro Gly Ala Ser Leu Gly Gly Pro Glu Gly Ala His Pro Ala Ala Ala  
115 120 125

Pro Ala Gly Cys Val Pro Ser Pro Ser Ala Leu Ala Pro Gly Tyr Ala  
130 135 140

Glu Pro Leu Lys Gly Val Pro Pro Glu Lys Phe Asn His Thr Ala Ile  
145 150 155 160

Pro Lys Gly Tyr Arg Cys Pro Trp Gln Glu Phe Val Ser Tyr Arg Asp  
165 170 175

Tyr Gln Ser Asp Gly Arg Ser His Thr Pro Ser Pro Asn Asp Tyr Arg  
180 185 190

Asn Phe Asn Lys Thr Pro Val Pro Phe Gly Gly Pro Leu Val Gly Gly  
195 200 205

Thr Phe Pro Arg Pro Gly Thr Pro Phe Ile Pro Glu Pro Leu Ser Gly  
210 215 220

Leu Glu Leu Leu Arg Leu Arg Pro Ser Phe Asn Arg Val Ala Gln Gly  
225 230 235 240

Trp Val Arg Asn Leu Pro Glu Ser Glu Glu Leu  
245 250

<210> 11  
 <211> 913  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<400> 11  
 gtcggactgc aatagacaca caggccataa aactccagct tcccgactga agtgtaatc 60  
 ttgggggtct gacatttctt cccatctact gtggcccccac caggatgatc cccaaggagc  
 120  
 agaaggagcc agtgateggct gtcccggggg accttgetga accagtcctc tcgctggacc  
 180

WO 02/46419

PCT/US01/49861

```

240 tgggaaagaa gctgagcgtg cctcaggacc taatgataga ggagctgtct ctacgaaaca
accgcggtac cctcctcttt cagaagaggc agcgccgggt gcagaagttt acctttgagc
300 tatcagaaag ttgcaggccc atcctggcga gtagtgcccg agggaaagtg gctgagcagag
360 cggcgagcggc aacggttccc aatggcttgg aggagcagaa ccaccactcc gagacgcacg
420 tgttccaggg gtcacctggg gaccccggga tcacctatct gggagcagcg gggactgggt
480 cggtcogtag tccaagcgcc ctggcaccag gctatgcaga gccctgaag ggcgtcccac
540 cggagaagtt caaccacact gccatcccca aaggctaccg gtgcccttgg caggagtcca
600 ccagctacca agactactcg agtggcagca gaagtcacac tcccacccc cgagactatc
660 gcaacttcaa caagaccccc gtgccatttg gaggacccca cgtgagggag gccattttcc
720 acgcaggcac cccctttgtc ccggagtctc tcagtggctt ggaacttctc cgcctcagac
780 ccaatttcaa cagggttgct cagggctggg tccggaagct cccgagctct gaggaactgt
840 agcctcagcc tgaagctaca attccctggg ctcaagaaac atgctgtct tgaaaaaaaaa
900 aaaaaaaaaa aaa
913

```

```

<210> 12
<211> 245
<212> PRT
<213> Mus musculus

```

```

<400> 12
Met Ile Pro Lys Glu Gln Lys Glu Pro Val Met Ala Val Pro Gly Asp
1 5 10 15
Leu Ala Glu Pro Val Pro Ser Leu Asp Leu Gly Lys Lys Leu Ser Val
20 25 30
Pro Gln Asp Leu Met Ile Glu Glu Leu Ser Leu Arg Asn Asn Arg Gly
35 40 45
Ser Leu Leu Phe Gln Lys Arg Gln Arg Arg Val Gln Lys Phe Thr Phe
50 55 60
Glu Leu Ser Glu Ser Leu Gln Ala Ile Leu Ala Ser Ser Ala Arg Gly
65 70 75 80
Lys Val Ala Gly Arg Ala Ala Gln Ala Thr Val Pro Asn Gly Leu Glu
85 90 95
Glu Gln Asn His His Ser Glu Thr His Val Phe Gln Gly Ser Pro Gly

```

WO 02/46419

PCT/US01/49861

100 105 110  
Asp Pro Gly Ile Thr His Leu Gly Ala Ala Gly Thr Gly Ser Val Arg  
115 120 125  
Ser Pro Ser Ala Leu Ala Pro Gly Tyr Ala Glu Pro Leu Lys Gly Val  
130 135 140  
Pro Pro Glu Lys Phe Asn His Thr Ala Ile Pro Lys Gly Tyr Arg Cys  
145 150 155 160  
Pro Trp Gln Glu Phe Thr Ser Tyr Gln Asp Tyr Ser Ser Gly Ser Arg  
165 170 175  
Ser His Thr Pro Ile Pro Arg Asp Tyr Arg Asn Phe Asn Lys Thr Pro  
180 185 190  
Val Pro Phe Gly Gly Pro His Val Arg Glu Ala Ile Phe His Ala Gly  
195 200 205  
Thr Pro Phe Val Pro Glu Ser Phe Ser Gly Leu Glu Leu Leu Arg Leu  
210 215 220  
Arg Pro Asn Phe Asn Arg Val Ala Gln Gly Trp Val Arg Lys Leu Pro  
225 230 235 240  
Glu Ser Glu Glu Leu  
245

## 【国際公開パンフレット(コレクション)】

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

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
13 June 2002 (13.06.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/046419 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 15/12, C07K 14/47, 16/18, A01K 67/027, A61K 38/17, 48/00, G01N 33/68
- (52) International Application Number: PCT/US01/49861
- (22) International Filing Date: 7 November 2001 (07.11.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/246,629 7 November 2000 (07.11.2000) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application: US 60/246,629 (CON) Filed on 7 November 2000 (07.11.2000)
- (71) Applicant (for all designated States except US): BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM [US/US]; 201 West 7th Street, Austin, TX 78701 (US).
- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): OLSON, Eric, N. [US/US]; 3700 Southwestern, Dallas, TX 75225 (US); FREY, Norbert [US/US]; 5454 Amesbury Dr.#1813, Dallas, TX 75206 (US).
- (74) Agent: HIGHLANDER, Steven, I.; Fulbright & Jaworski L.L.P., Suite 2400, 600 Congress Avenue, Austin, TX 78701 (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, GH, GI, GM, GR, GU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, NI, NO, NZ, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: with international search report before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- (88) Date of publication of the international search report: 25 September 2003
- 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 02/046419 A3

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS RELATING TO MUSCLE SPECIFIC SARCOMERIC CALCINEURIN-BINDING PROTEINS (CALSARCINS)

(57) Abstract: The present invention relates to the polypeptides known as calcineurin associated protein (calsarcin). Calsarcins-1, -2, and 3 bind to calcineurin, teletromin, and  $\alpha$ -actinin, which provides a link between these molecules and the sarcomere. Sarcomeric dysfunction ultimately leads to activation of calcineurin and consequent hypertrophic cardiomyopathy. Thus, methods utilizing calsarcin as it regards these medical conditions are herein provided and include screening for peptides which interact with calsarcin, screening for modulators of calsarcin binding to calcineurin or  $\alpha$ -actinin, methods to modulate calcineurin activity, methods to inhibit calcineurin activation of gene transcription and methods for treating cardiac hypertrophy, heart failure and Type II diabetes.

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/49861
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 C12N15/12 C07K14/47 C07K16/18 A01K67/027 A61K38/17 A61K48/00 G01N33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K		
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 practical, search terms used)		
EMBL, EPO-internal, BIOSIS, WPI Data, MEDLINE, EMBASE		
<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	DATABASE EMBL 'Online! 12 April 2000 (2000-04-12) AHMAD ET AL: "Homo sapiens muscle-specific protein (C4orf5)" retrieved from EBI Database accession no. AF249873 XP002237022 abstract	1,2,7,10
X	DATABASE EMBL 'Online! 27 May 2000 (2000-05-27) FEVOLELLA C.: "Homo sapiens mRNA for FATZ related protein 2 (ORF1)" retrieved from EBI Database accession no. AJ252149 XP002237023 abstract	1,2,7,10
	---	
	-/-	
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of box C.	<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "I" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the practice or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, each combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
2 April 2003		04.03.03
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5818 Patentamt 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 661 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3019		Authorized officer  Fotaki, M

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1997)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/49861
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 96 12806 A (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR) 2 May 1996 (1996-05-02)  the whole document ---	36,38, 43,44, 58,90
X	WO 99 19473 A (MANTEX BIOTECH INC ;MOLKENTIN JEFFREY D (US); GRANT STEPHEN R (US)) 22 April 1999 (1999-04-22) the whole document ---	90-94
A	ROTHERMEL BEVERLY ET AL: "A protein encoded within the Down syndrome critical region is enriched in striated muscles and inhibits calcineurin signaling" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 275, no. 12, 24 March 2000 (2000-03-24), pages 8719-8725, XP002152092 ISSN: 0021-9258 ---	
A	FUENTES JUAN J ET AL: "DSCR1, overexpressed in Down syndrome, is an inhibitor of calcineurin-mediated signaling pathways" HUMAN MOLECULAR GENETICS, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 9, no. 11, 2000, pages 1681-1690, XP002212245 ISSN: 0964-6906 ---	
A	MOLKENTIN ET AL: "A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy" CELL, CELL PRESS, CAMBRIDGE, MA, US, vol. 93, 17 April 1998 (1998-04-17), pages 215-228, XP002094705 ISSN: 0092-8674 ---	
P,X	FREY NORBERT ET AL: "Cal sarcins, a novel family of sarcomeric calcineurin-binding proteins." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 97, no. 26, 19 December 2000 (2000-12-19), pages 14632-14637, XP002237019 December 19, 2000 ISSN: 0027-8424 the whole document --- -/--	1,2,7, 10-12,19

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/49861
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	FAULKNER GEORGINE ET AL: "FATZ, a filament-, actinin-, and telethonin-binding protein of the Z-disc of skeletal muscle." JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 275, no. 52, 29 December 2000 (2000-12-29), pages 41234-41242, XP002237020 ISSN: 0021-9258 the whole document	1,2,7, 10-12,19
P,X	AHMAD FERHAAN ET AL: "Identification and characterization of a novel gene (C4orf5) located on human chromosome 4q with specific expression in cardiac and skeletal muscle." GENOMICS, vol. 70, no. 3, 15 December 2000 (2000-12-15), pages 347-353, XP002237021 ISSN: 0888-7543	1,2,7, 10-12,19
P,X	WO 01 53312 A (CHEN RUI HONG ;GOODRICH RYLE (US); HYSEO INC (US); WANG DUNRUI (US)) 26 July 2001 (2001-07-26) tables 2,6	1,2,7, 10-12, 19,30,31
E	WO 01 92567 A (HENKEL THOMAS ;MEDIGENE AG (DE); REUNER BIRGIT (DE); BECK JOACHIM) 6 December 2001 (2001-12-06)  page 1-78; figure 8	1,2,7, 10-12, 19, 22-31, 84,85, 87-89
E	WO 02 04491 A (ROTHERMEL BEVERLY ;UNIV TEXAS (US); WILLIAMS SANDERS R (US)) 17 January 2002 (2002-01-17) page 1-100	22-29, 36,38, 58,84,90

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1993)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/US 01/49861
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
<p>1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos. because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 36-42, 47-50, 60-63, 73-76, 84-94, 104 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.</p>	
<p>2. <input type="checkbox"/> Claims 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:</p>	
<p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos. because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	
<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:	
see additional sheet	
<p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.</p>	
<p>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.</p>	
<p>3. <input 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.:</p>	
<p>4. <input checked="" 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.:</p> <p style="margin-left: 40px;">1, 2, 7, 10-12, 19, 30, 31 (all entirely); 22-29, 36-105 (all partially)</p>	
<p><b>Remark on Protest</b></p> <p style="margin-left: 100px;"><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.</p> <p style="margin-left: 100px;"><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

International Application No. PCT/US 01 #9861

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1, 2, 7, 10-12, 19, 30, 31 (all entirely); 22-29, 36-105 (all partially)

An isolated purified polypeptide comprising SEQ ID NO:2; a nucleic acid encoding the same; a nucleic acid encoding a fusion polypeptide of the same; a knockout non-human animal comprising a defective allele of the same; a transgenic non-human animal comprising the same; a monoclonal antibody of the same; a method of modulating calcineurin activity by administering a calsarcin polypeptide or a dominant-negative form of the same; a method of screening for a peptide which interacts with calsarcin; a method of screening for a modulator of calsarcin binding to  $\alpha$ -actinin; a method of screening for a modulator of calsarcin binding to calcineurin; a method of screening for a modulator of calsarcin binding to telethonin; a method of treating cardiac hypertrophy; a method of inhibiting calcineurin activation of gene transcription; a method of identifying a peptide that binds calsarcin; a method of screening for a candidate substance for anti-cardiomyotic hypertrophy.

2. Claims: 3, 4, 8, 13-15, 20, 32, 33 (all entirely); 22-29, 36-105 (all partially)

The same as Invention I but relating to a polypeptide comprising SEQ ID NO:6

3. Claims: 5, 6, 9, 16-18, 21, 34, 35 (all entirely); 22-29, 36-105 (all partially)

The same as Invention I but relating to a polypeptide comprising SEQ ID NO:10

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.  
PCT/US 01/49861

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date				
WO 9612806	A	02-05-1996	US 5723436 A	03-03-1998			
			AU 4006695 A	15-05-1996			
			WO 9612806 A1	02-05-1996			
WO 9919473	A	22-04-1999	AU 755428 B2	12-12-2002			
			AU 1099299 A	03-05-1999			
			AU 748334 B2	30-05-2002			
			AU 9805898 A	03-05-1999			
			CA 2306448 A1	22-04-1999			
			CA 2315244 A1	22-04-1999			
			EP 1023441 A1	02-08-2000			
			EP 1025216 A1	09-08-2000			
			JP 2001520170 T	30-10-2001			
			JP 2001520010 T	30-10-2001			
			WO 9919471 A1	22-04-1999			
			WO 9919473 A1	22-04-1999			
			US 6201165 B1	13-03-2001			
			US 2002056144 A1	09-05-2002			
			WO 0153312	A	26-07-2001	US 6569662 B1	27-05-2003
						AU 2292401 A	31-07-2001
AU 2591801 A	31-07-2001						
AU 2593601 A	31-07-2001						
AU 2595501 A	31-07-2001						
AU 2596501 A	31-07-2001						
AU 2598301 A	31-07-2001						
AU 2728401 A	31-07-2001						
AU 2734401 A	31-07-2001						
AU 2734801 A	31-07-2001						
AU 2738501 A	31-07-2001						
AU 3265701 A	31-07-2001						
CA 2395443 A1	26-07-2001						
CA 2395731 A1	26-07-2001						
CA 2395736 A1	26-07-2001						
CA 2395749 A1	26-07-2001						
CA 2395763 A1	26-07-2001						
CA 2395770 A1	26-07-2001						
CA 2402563 A1	26-07-2001						
EP 1242596 A1	25-09-2002						
EP 1240178 A2	18-09-2002						
EP 1242580 A1	25-09-2002						
EP 1242443 A1	25-09-2002						
EP 1250346 A2	23-10-2002						
EP 1254256 A2	06-11-2002						
EP 1248848 A1	16-10-2002						
WO 0153312 A1	26-07-2001						
WO 0153453 A2	26-07-2001						
WO 0153326 A1	26-07-2001						
WO 0153454 A2	26-07-2001						
WO 0153455 A2	26-07-2001						
WO 0153456 A2	26-07-2001						
WO 0153466 A1	26-07-2001						
WO 0152616 A2	26-07-2001						
WO 0153500 A1	26-07-2001						
WO 0153515 A1	26-07-2001						
WO 0153485 A1	26-07-2001						
US 2003104529 A1	05-06-2003						
US 6586390 B1	01-07-2003						

Form PCT/ISA210 (patent family annex) (July 1998)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/US 01/49861

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 0153312	A	US 6465620 B1	15-10-2002	
		US 2002146692 A1	10-10-2002	
		AU 5362001 A	30-10-2001	
		CA 2406039 A1	25-10-2001	
		EP 1276754 A2	22-01-2003	
		WO 0179446 A2	25-10-2001	
		US 2002197679 A1	26-12-2002	
WO 0192567	A	06-12-2001	AU 7408301 A	11-12-2001
			CA 2410949 A1	06-12-2001
			WO 0192567 A2	06-12-2001
			EP 1311704 A2	21-05-2003
			US 2002150953 A1	17-10-2002
WO 0204491	A	17-01-2002	AU 7330501 A	21-01-2002
			CA 2415967 A1	17-01-2002
			EP 1301597 A2	16-04-2003
			WO 0204491 A2	17-01-2002

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (1 July 1992)

## 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)
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 47/48	4 C 0 8 6
A 6 1 K 47/48	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 7
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 9/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/04	
A 6 1 P 9/04	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 43/00	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 16/18	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 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/58	G 0 1 N 33/58	Z
// C 1 2 P 21/08	A 6 1 K 37/02	
	C 1 2 P 21/08	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, 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, PH, PL, PT, R O, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 フレイ, ノーバート

アメリカ合衆国 テキサス 75206, ダラス, アメスバリー ドライブ 5454 ナンバー 1813

F ターム(参考) 2G045 AA34 AA35 BB10 BB14 BB20 BB24 BB29 BB46 BB51 CB01  
 DA13 DA36 FB02 FB03 FB05 FB08 FB12 GC15  
 4B024 AA11 BA44 BA80 CA04 CA05 CA06 CA07 DA02 EA02 EA04  
 FA02 GA03 GA11 GA18 HA03 HA08 HA14  
 4B063 QA01 QA18 QQ20 QR32 QR41 QR48 QR59 QR63 QR69 QR77  
 QS12 QS36 QX01 QX07  
 4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 DA01 DA13  
 4C076 AA01 AA09 AA11 AA16 AA29 AA36 AA53 BB01 BB13 BB15  
 BB16 BB22 BB25 BB29 BB30 BB31 CC11 EE59 FF34  
 4C084 AA02 AA03 AA07 AA13 AA19 BA35 BA41 BA44 CA53 MA02  
 MA13 MA17 MA22 MA23 MA28 MA31 MA35 MA37 MA43 MA52  
 MA59 MA60 MA63 MA66 NA14 ZA361 ZA362 ZA392 ZA832 ZB022  
 ZC032 ZC202 ZC212 ZC432  
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA02 MA04 MA13 MA17 MA22  
 MA23 MA28 MA31 MA35 MA37 MA43 MA52 MA59 MA60 MA63  
 MA66 NA14 ZA36 ZC20  
 4C087 AA01 AA02 AA03 BB47 BC83 CA10 CA12 MA02 MA13 MA17  
 MA22 MA23 MA28 MA31 MA35 MA37 MA43 MA52 MA57 MA59  
 MA60 MA63 MA66 NA14 ZA36 ZC20  
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 DA76 DA86 EA20 EA50 FA72

FA74

专利名称(译)	与肌肉特异性肌节钙调神经磷酸酶结合蛋白 ( car car ) 相关的方法和组合物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004528822A</a>	公开(公告)日	2004-09-24
申请号	JP2002548136	申请日	2001-11-07
申请(专利权)人(译)	评议委员会, 盐湖城OVU德州系统		
[标]发明人	オルソンエリックエヌ フレイノーバート		
发明人	オルソン, エリック エヌ. フレイ, ノーバート		
IPC分类号	A01K67/027 A61K31/7088 A61K35/34 A61K35/76 A61K38/00 A61K45/00 A61K47/48 A61K48/00 A61P9/00 A61P9/04 A61P43/00 C07K14/47 C07K16/18 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/08 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/58		
CPC分类号	C07K14/4728 A01K2217/05 A01K2217/075 A61K38/00 A61K48/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K31/7088 A61K35/34 A61K35/76 A61K45/00 A61K47/48 A61K48 /00 A61P9/00 A61P9/04 A61P43/00.111 C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 G01N33/58.Z A61K37/02 C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB10 2G045/BB14 2G045/BB20 2G045/BB24 2G045/BB29 2G045 /BB46 2G045/BB51 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB08 2G045/FB12 2G045/GC15 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024 /CA05 4B024/CA06 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/HA03 4B024/HA08 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063 /QQ20 4B063/QR32 4B063/QR41 4B063/QR48 4B063/QR59 4B063/QR63 4B063/QR69 4B063/QR77 4B063/QS12 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX07 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064 /CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4C076/AA01 4C076/AA09 4C076/AA11 4C076/AA16 4C076/AA29 4C076/AA36 4C076/AA53 4C076/BB01 4C076/BB13 4C076/BB15 4C076/BB16 4C076 /BB22 4C076/BB25 4C076/BB29 4C076/BB30 4C076/BB31 4C076/CC11 4C076/EE59 4C076/FF34 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA19 4C084/BA35 4C084/BA41 4C084 /BA44 4C084/CA53 4C084/MA02 4C084/MA13 4C084/MA17 4C084/MA22 4C084/MA23 4C084/MA28 4C084/MA31 4C084/MA35 4C084/MA37 4C084/MA43 4C084/MA52 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084 /MA63 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA361 4C084/ZA362 4C084/ZA392 4C084/ZA832 4C084 /ZB022 4C084/ZC032 4C084/ZC202 4C084/ZC212 4C084/ZC432 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086 /AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/MA13 4C086/MA17 4C086/MA22 4C086/MA23 4C086/MA28 4C086/MA31 4C086/MA35 4C086/MA37 4C086/MA43 4C086/MA52 4C086 /MA59 4C086/MA60 4C086/MA63 4C086/MA66 4C086/NA14 4C086/ZA36 4C086/ZC20 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/AA03 4C087/BB47 4C087/BC83 4C087/CA10 4C087/CA12 4C087/MA02 4C087 /MA13 4C087/MA17 4C087/MA22 4C087/MA23 4C087/MA28 4C087/MA31 4C087/MA35 4C087/MA37 4C087/MA43 4C087/MA52 4C087/MA57 4C087/MA59 4C087/MA60 4C087/MA63 4C087/MA66 4C087 /NA14 4C087/ZA36 4C087/ZC20 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/246629 2000-11-07 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		
摘要(译)			

本发明涉及一种已知为钙调神经磷酸相关蛋白 (Karusarushin) 的多肽。Karusarushin -1, -2, 和-3结合钙依赖磷酸酶, Teretonin, 和 $\alpha$ -辅肌动蛋白, 它提供了这些分子和肌节之间的连接。肌节功能障碍最终导致钙调神经磷酸酶的激活并导致肥厚性心肌病。因此, 提供利用Karusarushin用于这些医疗病况的方法本文中, 并且该方法

Karusarushin的结合的调节剂包括筛选与Karusarushin相互作用的肽的步骤, 以钙调神经磷酸或 $\alpha$ -辅肌动蛋白清洁过程它包括。本发明提供了一种调节钙调神经磷酸酶活性的方法, 一种抑制钙调神经磷酸酶激活基因转录的方法, 以及一种治疗心脏肥大, 心力衰竭和II型糖尿病的方法。

BIBLIOGRAPHY	
ADAMS	ADAMS, J. W. 1981. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 1982. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 1983. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 1984. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 1985. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 1986. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 1987. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 1988. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 1989. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 1990. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 1991. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 1992. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 1993. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 1994. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 1995. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 1996. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 1997. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 1998. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 1999. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 2000. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 2001. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 2002. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 2003. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 2004. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 2005. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 2006. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 2007. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 2008. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 2009. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 2010. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 2011. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 2012. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 2013. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 2014. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 2015. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 2016. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 2017. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 2018. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 2019. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 2020. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 2021. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 2022. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 2023. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 2024. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.
ADAMS	ADAMS, J. W. 2025. <i>Journal of Cell Biology</i> 61: 1-10.