

(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2004-535830

(P2004-535830A)

(43) 公表日 平成16年12月2日(2004.12.2)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 C 0 8 4
A 6 1 K 38/48	A 6 1 K 39/395 D	4 C 0 8 5
A 6 1 K 38/55	A 6 1 K 39/395 N	4 C 0 8 6
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 48/00	4 H 0 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 81 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-517270 (P2003-517270)
 (86) (22) 出願日 平成14年7月31日 (2002. 7. 31)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年1月21日 (2004. 1. 21)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2002/008506
 (87) 国際公開番号 W02003/012093
 (87) 国際公開日 平成15年2月13日 (2003. 2. 13)
 (31) 優先権主張番号 01118401.7
 (32) 優先日 平成13年7月31日 (2001. 7. 31)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

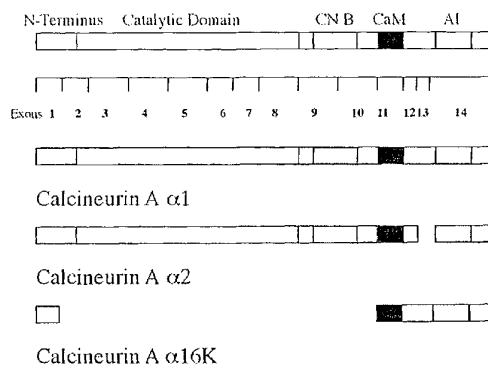
(71) 出願人 504025701
 ゲノピア ビオメディカル ゲゼルシャフ
 ト ミット ベシユレンクテル ハフツ
 グ
 ドイツ連邦共和国 6 6 1 2 3 ザールブ
 リュッケン シュト ウールザッツェンハ
 ウスヴェーク 6 9
 (74) 代理人 110000109
 特許業務法人特許事務所サイクス
 (72) 発明者 フェルケル ヘルゲ
 ドイツ連邦共和国 8 9 0 8 1 ウルム
 ローエルシュトラー セ 1 8 - 1
 Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 DA02
 DA06 EA04

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 カルシニューリンのレギュレーター

(57) 【要約】

カルシニューリンの触媒サブユニットのスプライスバリエーションに基づくカルシニューリンのレギュレーターが提供される。好ましくは、触媒サブユニットは、このサブユニットの 型、型、および/または、型である、本発明は、レギュレーター、および、好ましくは、カルシニューリン活性の障害に関連する病気の治療のための活性剤として、レギュレーターの刺激活性に影響を及ぼす物質、を含む。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

カルシニューリンの触媒サブユニットのsprayバリエーションに基づくことを特徴とする、カルシニューリンのレギュレーター。

【請求項 2】

触媒サブユニットが、前記サブユニットの 型、 型、および/または 型であることを特徴とする、請求項 1 に記載のカルシニューリンのレギュレーター。

【請求項 3】

図 4 (配列番号 7、8)、図 5 (配列番号 9、10)、および/または図 6 (配列番号 11、12) に記載のアミノ酸配列と、少なくとも 70% 一致するアミノ酸配列を特徴とする、請求項 1 または 2 に記載のカルシニューリンのレギュレーター。 10

【請求項 4】

図 1 (配列番号 1、2)、図 2 (配列番号 3、4)、および/または図 3 (配列番号 5、6) に記載のヌクレオチド配列と、少なくとも 70% 一致するヌクレオチド配列によってコードされることを特徴とする、請求項 1 ~ 3 の 1 項に記載のカルシニューリンのレギュレーター。

【請求項 5】

図 1 (配列番号 1、2) および/または図 2 (配列番号 3、4) に記載のヌクレオチド配列と、少なくとも 70% 一致することを特徴とするヌクレオチド配列。

【請求項 6】

カルシニューリンのレギュレーターをコードすることを特徴とする、請求項 5 に記載のヌクレオチド配列。 20

【請求項 7】

図 4 (配列番号 7、8) および/または図 5 (配列番号 9、10) に記載のアミノ酸配列と、少なくとも 70% 一致することを特徴とするアミノ酸配列。

【請求項 8】

カルシニューリンのためのレギュレーターを形成することを特徴とする、請求項 7 に記載のアミノ酸配列。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 4 の 1 項に記載のレギュレーターであることを特徴とする、特に病気の治療のための、活性剤。 30

【請求項 10】

請求項 1 ~ 4 の 1 項に記載のレギュレーターに影響を及ぼすことを特徴とする、特に病気の治療のための、活性剤。

【請求項 11】

前記レギュレーターの活性を高めることを特徴とする、請求項 10 に記載の活性剤。

【請求項 12】

前記レギュレーターの活性を低下させることを特徴とする、請求項 10 に記載の活性剤。

【請求項 13】

前記病気は、カルシニューリン活性の障害に関連することを特徴とする、請求項 9 ~ 12 の 1 項に記載の活性剤であって、好ましくは、前記病気は、神経変性病、心疾患、免疫学的疾患、炎症性疾患、および/または癌である、前記活性剤。 40

【請求項 14】

病気の治療のための請求項 9 ~ 13 の 1 項に記載の活性剤の使用。

【請求項 15】

請求項 9 ~ 13 の 1 項に記載の少なくとも 1 つの活性剤を投与することを特徴とする、病気の治療方法。

【請求項 16】

請求項 9 ~ 13 の 1 項に記載の少なくとも 1 つの活性剤を効果的な量で含み、かつ、少なくとも 1 つの薬学的キャリアーを含むことを特徴とする、薬学的組成物。 50

【請求項 17】

病気の診断のためのカルシニューリンのレギュレーターの使用であって、前記レギュレーターの周波数を分析することを特徴とし、好ましくは、レギュレーターと相互作用する少なくとも1つの物質を使用する、前記使用。

【請求項 18】

前記レギュレーターは、請求項 1 ~ 4 の 1 項に記載のレギュレーターであることを特徴とする、請求項 17 に記載の使用。

【請求項 19】

前記相互作用物質は、レギュレーターに対する抗体であることを特徴とする、請求項 17 または 18 に記載の使用。

10

【請求項 20】

前記相互作用物質は、レギュレーターをコードする核酸配列の少なくとも一部とハイブリダイズする、核酸分子であることを特徴とする、請求項 17 ~ 19 の 1 項に記載の使用。

【請求項 21】

前記病気は、カルシニューリン活性の障害に関連することを特徴とする、請求項 17 ~ 20 の 1 項に記載の使用であって、好ましくは、前記病気は、神経変性病、心疾患、免疫学的疾患、炎症性疾患、および/または癌である、前記使用。

【請求項 22】

請求項 1 ~ 4 の 1 項に記載のレギュレーターと相互作用する、少なくとも1つの物質を含む、病気の診断用キット。

20

【請求項 23】

カルシニューリンの活性に影響を及ぼす物質の探索方法であって、カルシニューリンの触媒サブユニットのsprayパリアントを使用し、sprayパリアントおよび/またはカルシニューリンと相互作用する物質を同定し、および/または、単離することを特徴とする、前記方法。

【請求項 24】

sprayパリアントは、請求項 1 ~ 4 の 1 項に記載のレギュレーターであることを特徴とする、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

請求項 23 または 24 に記載の方法によって同定され、および/または、単離されることを特徴とする、病気の治療のための活性剤。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、カルシニューリン(Calcineurin)のレギュレーター(regulator)、および、このレギュレーターの使用に関する。

【0002】

カルシニューリンは、セリン/スレオニン蛋白質ホスファターゼであり、触媒サブユニット(カルシニューリンA)と制御サブユニット(カルシニューリンB)とからなるヘテロダイマーである。触媒サブユニットは、約60、制御サブユニットは、約18kDaである。この蛋白質ホスファターゼは、カルシウムおよびカルモデュリンの制御下にあり、酵素活性のためには、カルシウムとカルモデュリンとの結合が必要である。

40

【0003】

両サブユニット、触媒サブユニットおよび制御サブユニットは、異なる遺伝子によってコードされる、異なるイソ型において生じる。哺乳動物では、触媒サブユニットに対する3つの異なる遺伝子(A₁、A₂、A₃)が特徴付けられている。一般に、このサブユニットは、5つの異なるドメインを有する：現段階では機能が知られていないN-末端ドメイン、触媒ドメイン、B-サブユニット結合ドメイン、カルモデュリン結合ドメイン、および自己抑制ドメイン。

【0004】

50

カルシニューリンは、細胞応答に対するカルシウムシグナルの結合(coupling)において、重要な役割を果たす。それは偏在的に発現されるが、各サブユニットの様々なイソ型について、異なる組織発現パターンが説明されている。現在、カルシニューリンは、様々な場面で議論されている。例えば、カルシニューリンは、神経シグナル経路と関連付けられているが、神経機能はほとんど理解されていない。更に、カルシニューリンは、免疫抑制との関連で議論されており、そこでは、カルシニューリンは、T細胞応答において、転写因子NFAT(活性化T細胞の核因子; Nuclear Factor Of Activated T-Cells)を介して作用する。

【0005】

カルシニューリン活性の制御に関して、この酵素が、カルシウムおよびカルモデュリンによって制御されることが知られている(ルスナク(Rusnak), F. および メルツ(Mertz), P. (2000), *Physiol. Rev.* 80, 1483-1521)。それは、サイトソルカルシウム発生時のカルシウムとカルモデュリンとの結合によって活性になり、そして、それらの各細胞レセプターとの複合体において、免疫抑制剤サイクロスポリンAおよびFK506の結合において阻害される。更に、いわゆるカルシプレシン(calcipressin)群のカルシニューリンレギュレーターが説明されている(キングスバリー(Kingsbury), T.J. および クニンハム(Cunningham), K.W. (2000), *Genes and Dev.* 14, 1595-1604)。また、細胞のレドックス状態は、カルシニューリンの制御と関連付けられている(ワン(Wang)ら (1996) *ネイチャー(Nature)* 383, 434-437)。

10

【0006】

虚血/再灌流傷害から心臓肥大、心不全、卒中、筋萎縮性側索硬化症、変性運動ニューロン疾患(degenerative motor neuron disease)、骨格筋疾病およびてんかんまでの範囲の様々な機能障害における、カルシニューリン発現、活性、および組織分布の変化が説明されている。

20

【0007】

カルシニューリンは、心不全および卒中のような広範な疾患において、きわめて重要な役割を果たすので、カルシニューリンの活性に関する制御機構は、特に興味深い。制御機構の詳細な知見は、特に、病気の状態において、カルシニューリンの活性に影響を及ぼす可能性を示し得る(would provide a possibility)。よって、本発明は、このきわめて重要な酵素の活性に影響を及ぼすための適当なターゲットを提供すること、および、カルシニューリン活性の障害に関連する病気の治療のための活性剤を提供することを目的とする。

30

【0008】

この目的は、請求項1に記載のカルシニューリンのレギュレーターによって解決される。このレギュレーターの好ましい態様を、従属項である請求項2~4に記載する。対応するヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を、請求項5~8に記載する。請求項9~13に、病気の治療のための活性剤を記載する。請求項14~16は、前記活性剤の使用、病気の治療方法、および、薬学的組成物に関する。請求項17~22は、病気の診断のためのレギュレーターの使用、および、対応するキットに関する。請求項23~25は、物質の探索方法、および、それにより得られる(resulting)活性剤を記載する。これにより、すべての請求項の文言は、本明細書に参照として含まれる(The wording of all claims is hereby made to the content of the specification by reference)。

40

【0009】

本発明は、カルシニューリンの触媒ユニットのスプライスバリエーション(splice variant)に基づく、カルシニューリンのレギュレーターを含む。完全サブユニットと比べて、このレギュレーターは、完全サブユニット、触媒ドメインおよびカルシニューリンB結合ドメイン(the catalytic and the Calcineurin B binding domain)を欠いているので、それ自体は、ホスファターゼ活性を持たない。それは、N末端ドメインの一部、および、完全カルモデュリン結合ドメイン、ならびに、自己抑制ドメインを保持している。本発明のレギュレーターは、特に、低カルシウム濃度において、カルシニューリンのホスファターゼ活性を刺激し得る。スプライスバリエーション自体は、カルシウムに結合する。従って、スプラ

50

イスバリアントの刺激活性は、特に驚くべきものである。なぜなら、スプライスバリアントとカルシニューリンとは、カルシウムのために競争すると考えられていたからである。

【0010】

本発明の好ましい態様において、スプライスバリアントは、カルシニューリンと、特に、触媒性カルシニューリンホロ酵素と、蛋白質複合体を形成する。カルシニューリンとスーパーオキシド・ジスムターゼ(superoxide dismutase)との蛋白質複合体が特に好ましい。

【0011】

一般に、スプライスバリアントの刺激効果は、低カルシウム濃度に依存する。好ましくは、これらのカルシウム濃度は、1 mM以下(below 1mM)である。天然条件下でのスプライスバリアントの推定される機能は、カルシニューリンを、カルシウムに対してより感受性の高い酵素にすることであり、これにより、低カルシウム濃度であっても、カルシニューリン関連シグナル経路がもたらされる(triggering)。本発明のスプライスバリアントは、低カルシウム濃度においてもカルシニューリン活性を保証する、更なる制御メカニズムをもたらす。

10

【0012】

先に略述したように、カルシニューリンの触媒サブユニットのイソ型は3つある。本発明の好ましい態様において、カルシニューリンのレギュレーターは、触媒サブユニットの型、型、および/または型に基づいている。異なるイソ型のスプライスバリアントは、2つの形、(a)および(b)、においてそれぞれ生じ、図1~6に示すように、一方の形の(b)は、10アミノ酸残基に対する30ヌクレオチドが欠けている。特に好ましい態様において、レギュレーターは、型(配列番号7、8)、型(配列番号9、10)、および/または型(配列番号11、12)のスプライスバリアントのアミノ酸配列と、少なくとも70%、好ましくは、少なくとも80%、特に、少なくとも90%一致したアミノ酸配列を特徴とする。好ましくは、本発明のレギュレーターは、型(配列番号1、2)、型(配列番号3、4)、および/または型(配列番号5、6)のスプライスバリアントをコードするヌクレオチド配列と、少なくとも70%、好ましくは、少なくとも80%、特に、少なくとも90%一致したヌクレオチド配列によってコードされる。

20

【0013】

更に、本発明は、スプライスバリアントの型のアミノ酸配列を表し、および/または、スプライスバリアントの型のアミノ酸配列を表す、図2に記載のヌクレオチド配列(配列番号3、4)と、少なくとも70%、好ましくは、少なくとも80%、特に、少なくとも90%一致する、図1に記載のヌクレオチド配列(配列番号1、2)と、少なくとも70%、好ましくは、少なくとも80%、特に、少なくとも90%一致したヌクレオチド配列を含む。好ましくは、これらのヌクレオチド配列は、カルシニューリンのレギュレーターをコードする。

30

【0014】

また、本発明は、スプライスバリアントの型のアミノ酸配列を表し、および/または、スプライスバリアントの型のアミノ酸配列を表す、図5に記載されている(配列番号9、10)、図4に記載のアミノ酸配列(配列番号7、8)と、少なくとも70%、好ましくは、少なくとも80%、特に、少なくとも90%一致したアミノ酸配列を含む。

40

【0015】

更に、本発明は、特に、病気の治療のための活性剤を含む。ここで、活性剤は、前記のカルシニューリンのレギュレーターである。本発明のレギュレーターは、カルシニューリンのホスファターゼ活性を刺激し得るので、その活性剤は、カルシニューリン活性の低下を伴う病気、例えば、アルツハイマー病または筋萎縮性側索硬化症、の治療のために特に有用である。

【0016】

本発明の別の態様において、先に記載したようなカルシニューリンのレギュレーターに影響を及ぼす、病気の治療のための活性剤が提供される。ある態様において、前記活性剤は、カルシニューリンのレギュレーターの活性を高める。そのような活性剤は、低カルシニ

50

ユーリン活性を伴う病気の治療に、特に有用である。別の態様において、活性剤は、カルシニューリンのレギュレーターの活性を低下させる。そのような活性剤は、カルシニューリン活性の増加を伴う病気の治療に、特に有用である。

【0017】

好ましくは、活性剤は、レギュレーターと相互作用することにより、その刺激活性を阻害する物質である。別の態様において、活性剤は、機能レギュレーターと基質のために競争し、および/または、機能蛋白質複合体の形成に影響を及ぼす、レギュレーターの不活性変異体である。そのような機能蛋白質複合体は、カルシニューリンおよびレギュレーター、および/または、スーパーオキシド・ジスムターゼ、および/または、他の成分から構成され得る。

10

【0018】

カルシニューリンのレギュレーターの活性を低下させる活性剤によって効果的に治療され得る病気の一例は、心疾患である。例えば、カルシニューリンが、心不全の器官の組織において、正常な組織中の約4倍多いことが記載されている。刺激剤の活性を低下させる活性剤、即ち、前述のカルシニューリンのレギュレーター、の投与によって、病的状態が和らげられる(counteracted)。

【0019】

本発明の別の態様において、カルシニューリンのレギュレーターの役割(part)は、カルシニューリンの刺激であり、それにより、フィードバックメカニズムにおけるカルシウムチャンネルが閉じられ、必要とされるカルシウム流入が止められるため、カルシニューリンの活性はなくなる。レギュレーターの活性を低下させる、本発明の剤、即ち、カルシニューリンの刺激剤、を添加することにより、フィードバックメカニズムは停止する。従って、カルシウムチャンネルは開いたままであり、カルシウム流入が続き、カルシニューリン活性が維持される。従って、カルシニューリンのレギュレーターの活性を高める活性剤が選択されるか、または、前記活性を低下させる活性剤が選択されるならば、それは、治療されるべき病気の所定の状態(circumstances)に依存する。一般に、例えば、心疾患、ならびに/または、てんかんのような神経変性病、または、筋萎縮性側索硬化症、ならびに、骨格筋疾患、免疫学的疾患、炎症性疾患、および/もしくは、癌のような他の疾患は、本発明による活性剤による治療のための好ましい候補(candidates)である。

20

【0020】

一般に、すべてのCNA類(、および/またはのいずれか)、更に、CNA類の活性に影響を及ぼす活性剤も同様に、アポトーシスに影響を及ぼすために使用され得る。例えば、CNA類の活性化剤(およびDNA類自体)は、アポトーシスの強力な刺激剤であるのに対し、CNA類の阻害剤(および変性CNA類自体)は、アポトーシスの強力な阻害剤として使用され得る。

30

【0021】

本発明によれば、CNA類の活性化剤は、例えば、問題のある細胞においてアポトーシスを引き起こすことによって、例えば、癌、免疫疾患、神経系疾患、心臓病および心疾患、ならびに/または、炎症性疾患を治療するための治療剤として(例えば、治療用蛋白質として)使用され得る。既に記載した本発明の活性化剤に加えて、例えば、遺伝子操作したCNA類および/またはCNA類自体(ヌクレオチドおよび/またはアミノ酸配列)も、アポトーシスの活性化剤として使用され得る。

40

【0022】

一方、CNA類(、および/またはのいずれか)の阻害剤は、問題のある細胞においてアポトーシスを防ぐことによって、例えば、癌、免疫疾患、神経系疾患、心臓病および心疾患、ならびに/または、炎症性疾患を治療するための治療剤として使用され得る。本発明のそのような阻害剤は、既に記載したものに加えて、例えば、CNA類のアンチセンス配列(類)および/またはCNA類に対する抗体であり得る。

【0023】

更に、本発明は、病気の治療のための前述の活性剤の使用、および、前述の本発明の活性

50

剤を少なくとも1つ投与する、病気の治療方法、を含む。前記使用および前記方法の更なる詳細については、前述の説明を参照のこと。

【0024】

また、本発明は、前述の活性剤の少なくとも1つを効果的な量で含み、かつ、少なくとも1つの薬学的キャリアーを含む、薬学的組成物を含む。治療されるべき病気の状態に応じて、薬学的組成物は、例えば、局所または全身投与される。

【0025】

更に、本発明は、生体内での前記レギュレーターの周波数(frequency)を分析する、病気の診断のためのカルシニューリンのレギュレーターの使用を含む。先に略述したように、いくつかの病気は、病気でない状態と比べた場合、カルシニューリンの活性の増加または減少を伴う。多くの場合には、このカルシニューリン活性の変化は、前述のsprayバリエーションに基づく、カルシニューリンのレギュレーターの活性および/または周波数の変化によって引き起こされる。例えば、後述の実施例で詳述するように、筋萎縮性側索硬化症のための動物モデルにおいて、カルシニューリンAの型の本発明のsprayバリエーションは、正常な動物におけるよりもはるかに強く発現される。従って、本発明は、それぞれの病気の診断のための、特に、病気の初期診断における、レギュレーターの使用を含む。本発明の使用の好ましい態様において、カルシニューリンのレギュレーターと相互作用する、少なくとも1つの物質が使用される。カルシニューリンのレギュレーターは、前述のレギュレーターであることが好ましい。

10

【0026】

本発明の使用の好ましい態様において、前記相互作用物質は、好ましくは、蛋白質-蛋白質または蛋白質-ペプチド相互作用のレベルで、レギュレーターと相互作用する抗体である。一般に、当業者に明らかなように、レギュレーターに特異的な抗体、例えば、ポリクローナル抗体および/またはモノクローナル抗体が、本発明の方法に適している。本発明の使用の好ましい態様において、特異的な抗体は、診断試験の迅速かつ容易な実施を可能にするアレイ上に置かれる。例えば、抗体は、免疫診断の分野において知られている、ディップスティック(dip stick)上に置かれる。

20

【0027】

本発明の使用の別の好ましい態様において、相互作用物質は、レギュレーターをコードする核酸配列の少なくとも一部とハイブリダイズする核酸分子である。そのようなハイブリダイゼーションプローブは安価で入手容易であり、かつ、診断試験は一般的な方法によって行われ得るので、この態様は、特に好ましい。例えば、ハイブリダイゼーションプローブ、即ち、レギュレーターをコードする核酸配列の少なくとも一部とハイブリダイズする核酸分子、を、DNAチップ上に載せ、そして、完全な診断反応を、自動化された方法で行うことが好ましい。この態様において、本発明の使用は、異なる病気の迅速な診断に特に有用である。

30

【0028】

前記病気の好ましい例は、カルシニューリン活性の障害に関連する。例えば、前記病気は、筋萎縮性側索硬化症のような神経変性病であり、および/または、前記病気は、心不全のような心疾患である。また、免疫学的疾患、炎症性疾患、および/または癌も、カルシニューリン活性の障害に関連する病気の例である。

40

【0029】

更に、本発明は、カルシニューリンのレギュレーターと相互作用し得る物質を少なくとも1つ含むキットを含む。このキットは、前述の診断のために特に有用である。前記キットの好ましい態様において、キットは、レギュレーターに対して特異的な抗体を少なくとも1つ含む。キットの別の態様において、キットは、レギュレーターをコードする核酸配列の少なくとも一部とハイブリダイズし得る、少なくとも1つの核酸分子を含む。

【0030】

更に、本発明は、カルシニューリンの活性に影響を及ぼす物質の探索方法を含む。この方法は、カルシニューリンの触媒サブユニットのsprayバリエーションを、sprayバリエ

50

アント自体および/もしくはカルシニューリンと相互作用し得る物質を同定し、ならびに/または、単離するために使用することを特徴とする。この方法の好ましい態様において、カルシニューリンの活性はインビトロで測定され、それにより、おそらく、レギュレーターを介してカルシニューリンの活性に影響を及ぼす、(対照としての)更なる物質を用いて、または用いずに、レギュレーターの影響が分析される。この方法の別の好ましい態様において、少なくとも、カルシニューリン、レギュレーター、およびおそらくカルシニューリンの活性に影響を及ぼす物質との間の複合体形成が、読み出し(read-out)システムとして使用される。この方法において使用されるレギュレーターの更なる詳細については、前述の記載を参照のこと。

【0031】

最後に、本発明は、前記方法によって同定され、および/または、単離される、病気の治療のための活性剤を含む。

【0032】

本発明の記載した特徴および更なる特徴は、実施例および従属項と併せて、以下の図面の説明から、より詳細に理解され、それにより、個々の特徴のそれぞれが、単独で、またはお互いに組み合わせて理解されるであろう。

【0033】

図面において、以下のことが示される：

図1：カルシニューリンAの型の本発明のスプライスバリエントのヌクレオチド配列、このスプライスバリエントの更なる変異体は、ヌクレオチド268から297が欠けている。

【0034】

図2：カルシニューリンAの型の本発明のスプライスバリエントのヌクレオチド配列、このスプライスバリエントの更なる変異体は、ヌクレオチド232から261が欠けている。

【0035】

図3：カルシニューリンAの型の本発明のスプライスバリエントのヌクレオチド配列、このスプライスバリエントの更なる変異体は、ヌクレオチド244から273が欠けている。

【0036】

図4：カルシニューリンAの型の本発明のスプライスバリエントのアミノ酸配列、このスプライスバリエントの更なる変異体は、アミノ酸残基90から99が欠けている。

【0037】

図5：カルシニューリンAの型の本発明のスプライスバリエントのアミノ酸配列、このスプライスバリエントの更なる変異体は、アミノ酸残基78から87が欠けている。

【0038】

図6：カルシニューリンAの型の本発明のスプライスバリエントのアミノ酸配列、このスプライスバリエントの更なる変異体は、アミノ酸残基82から91が欠けている。

【0039】

図7：カルシニューリンA - のPCR増幅。カルシニューリンcDNA類を、ネステッド(nested)PCRによって増幅し、アンプリコンを0.8%アガロースゲル上で分離した。1.6kbの既知の転写物のほかに、約450bpの更なるスプライスバリエントが検出された。

【0040】

図8：カルシニューリン(CN)A 16Kのドメインおよびエキソン構造。配列は、エキソン1、11、12、13および14からなり、かつ、N-末端ドメインの一部、カルモデュリン結合ドメイン、および自己抑制ドメインを含む。触媒ドメイン(エキソン2-8)およびカルシニューリンB結合ドメイン(9+10)は欠けている。CN B：カルシニューリンB結合ドメイン；CaM：カルモデュリン結合ドメイン；AI：自己抑制ドメイン、

10

20

30

40

50

【0041】

図9：カルシニューリンの免疫プロット。1：ウシ脳カルシニューリン（シグマ(Sigma)）、2：Cu/Znスーパーオキシド・ジスムターゼによってプルダウンした(pulled down)ウシ脳カルシニューリン（ウシ脳CNA、シグマ(Sigma)、とのインキュベーション前に、Cu/Zn SODを、NiNTA-磁気ビーズと結合させた。）、3：ヒト組換え型SOD、4-9：ネズミ脊髄蛋白質抽出物、4、5、および8番目のレーン：サイトソール画分、5、7、および9番目のレーン：ペレット画分、4-7番目のレーン：野生型、8および9番目のレーン：ヒト突然変異Cu/Zn SODのために組み換えられたマウス。1から3は、モノクローナルマウス抗カルシニューリンA抗体によって目に見えるようになり、4および5は、ウサギ抗カルシニューリンA によって、6から9は、ウサギ抗カルシニューリンA 抗体（ケミコン(Chemicon)、テムキュラ(Temecula)、USA）によって目に見えるようになった。

10

【0042】

図10：CNA 16Kによるホスファターゼ活性の活性化は、カルシウム(Ca)依存性である。カルシニューリンアッセイを、以下に記載するように行った。EDTAの添加によって、フリーのCaの異なる濃度を達成した。値を、平均+/-標準偏差として示す。N=7。**p<0.01、スチューデントt検定(Student's t test)による対照CN活性とは大幅に異なる。

【0043】

図11：プレインキュベーションは、CNA 16Kの有効性を高める。カルシニューリン活性アッセイを、以下に記載するように行った。プレインキュベーションは、基質添加前に、標準的なCNおよびCNA 16Kが添加され、30分間インキュベートされたことを示すのに対し、プレインキュベーションなしに、両蛋白質は、基質添加直前に添加された。値を、平均+/-標準偏差として示す。N=7。**p<0.02、スチューデントt検定による対照CN活性とは大幅に異なる；**p<0.01、スチューデントt検定による対照CN活性とは大幅に異なる。

20

【0044】

図12：カルシニューリンA 16Kと標準的なカルシニューリンとの直接相互作用。1：カルシニューリンポジティブコントロール。2：バクテリアコントロール溶出物を、Ni-NTA磁気ビーズと結合させ、ウシ脳CN（シグマ(Sigma)）をプルダウンするために使用した。3：CNA 16Kによるカルシニューリンのプルダウン(pull-down)（CNA 16Kを、ウシ脳CN、シグマ(Sigma)、によるインキュベーション前に、Ni-NTA磁気ビーズと結合させた）。4：CNA 16Kによる脊髄ホモジェネート(homogenate)のプルダウン（ネズミ脳ホモジェネートとのインキュベーション前に、CNA 16Kを、NiNTA磁気ビーズと結合させた）、5：バクテリアコントロール溶出物を、Ni-NTA磁気ビーズと結合させ、脊髄ホモジェネートをプルダウンするために使用した。

30

【0045】

実施例：

以下の実施例の説明において、カルシニューリンAの型の本発明のスプライスバリエーションのクローニングおよび生化学的特徴付けを示す。この新規な短いスプライスバリエーションは、触媒ドメインおよびカルシニューリンB結合ドメインを欠いている。エキソン11-14を含む、この短いcDNAの翻訳産物は、スーパーオキシド・ジスムターゼによってプルダウンしたカルシニューリンのウエスタンプロットにおけるカルシニューリンAポジティブ免疫反応性によって判断される(aspected)サイズ範囲において、および、ネズミ脊髄抽出物において、検出された。カルシニューリンAの他のイソ型のN末端領域においてエピトープを認識する異なる抗体を使用して、野生型マウスの脊髄において、対応する短いカルシニューリン変異体を検出した。特に、本発明のスプライスバリエーションは、メンブレン画分において、特に、核のメンブレン画分において検出された。

40

【0046】

50

しかし、それ自体はホスファターゼ活性が欠けているにもかかわらず、標準的なカルシニューリンへこれらのスプライスバリエントを添加すると、カルシニューリンのホスファターゼ活性は増加する。この刺激効果は、Ca²⁺-依存性であり、低カルシウム濃度においてのみ見られる。従って、スプライスバリエントの考えられ得る(possible)機能は、カルシニューリンを、よりカルシウム感受性が高い酵素にすることにより、低カルシウム濃度であっても、カルシニューリン関連シグナル経路、例えば、NF- κ Bを介した転写活性化、をもたらすことである。その結果、脱リン酸化のようなカルシニューリンによって制御されるフィードバックメカニズム、およびそれによるグルタメートレセプターの閉鎖(closing)は、有毒なカルシウム流入を低減させるようである。例えば、筋萎縮性側索硬化症について、本発明のスプライスバリエントは、カルシウム流入に対する細胞の感受性(susceptibility)を高めることができ、そのため、例えば、筋萎縮性側索硬化症、ならびに、ニューロンのアポトーシス、卒中、および心不全におけるカルシウム関連シグナルへの影響の、少なくとも部分的な原因となる。

10

【0047】

後に示すように、本発明のスプライスバリエントの刺激効果は、スプライスバリエントがカルシニューリンとプレインキュベートされる場合に高まる。これは、スプライスバリエントと標準的なカルシニューリンとの間の直接的な物理的相互作用の検出によっても強化される、時間依存性メカニズムを示す。おそらく、本発明のスプライスバリエントの効果は、カルモデュリンを介して働き、例えば、カルシニューリン-カルモデュリン複合体を安定化することによりカルモデュリンの活性化効果を高める。

20

【0048】

1. 材料および方法

1.1 カルシニューリンA クローニング

クロンテック(Clontech)、パロ・アルト(Palo Alto)、カリフォルニア、からのヒト脊髄ポリ-A⁺-RNAから、ネステッドPCRによって、カルシニューリンAを増幅した。PCRは、25 μ l容量において行った。それらは、2.5 μ lの10x PCRバッファー(ストラタジーン(Stratagene))、0.25 μ lの25 mM dNTP-ミックス、0.25 μ lのCNA-s1プライマー(10 μ M)、0.25 μ lのCNA-as1プライマー(10 μ M)、2.5 μ lのcDNA、0.25 μ lのTaqポリメラーゼ(プロメガ(Promega))、0.25 μ lのPfuポリメラーゼ、および更に(ad)2.5 μ lの蒸留水を含んでいた。95 $^{\circ}$ Cでの3分間の第一加熱段階によって、PCRを開始した。増幅条件は、95 $^{\circ}$ Cでの40秒の変性、55 $^{\circ}$ Cでの40秒のアニーリング、および72 $^{\circ}$ Cでの3分の伸長の35サイクルであった。72 $^{\circ}$ Cでの10分間の延長(extension)段階によって、PCRを終了させた。

30

【0049】

上記のように、プライマーCNA-s2およびCNA-as4を含む2.5 μ lの第一増幅反応物(amplification reaction)によって、ネステッドPCRを行った。増幅条件は、95 $^{\circ}$ Cでの40秒の変性、55 $^{\circ}$ Cでの40秒のアニーリング、および72 $^{\circ}$ Cでの3分間の伸長の25サイクルであった。72 $^{\circ}$ Cでの10分間の延長段階によって、PCRを終了させた。

40

【0050】

プライマー配列は

【化1】

CNA-s1:ATC TGC TCA GAC GAT GAA CTR GG (配列番号 13)

CNA-as1:GGC ATC CTC TCG TTA ATT CGG (配列番号 14)

CNA-s2:CAT GCC ATG GAT CCA TGT CCG AGC CCA AGG C

(配列番号 15)

CNA-as4:TCC CCC CGG GGT ACC CTA GTT AAT CAC TGA ATA

TTG CTG CTA TTA C (配列番号 16)

【0051】

得られたアンプリコンを、Bam HIおよびXma Iによって消化し、電気泳動し、製造者の勧めに従い、Qiaquickゲル抽出キット(キアゲン(Qiagen)、ヒルデン(Hilden)、ドイツ)によるゲル電気泳動後に精製した。消化したアンプリコンを、Bam HIおよびXma Iによって消化したpQE30ベクター(キアゲン(Qiagen)、ヒルデン(Hilden)、ドイツ)にライゲートした。得られたクローンを、完全に配列決定した。 10

【0052】

1.2 CNA 16 Kクローンの発現および精製

得られたプラスミドpQE30K16を、M15バクテリアに形質転換し、ポジティブクローンを、強く振とうしながら、37℃で一晩、50μg/mlのアmpiシリンを含むLB培地に接種させた。翌朝、0.5mlのバクテリアを、100μg/mlのアmpiシリンを含むLB培地1リットルに接種させ、バクテリアが0.5~0.7のOD₆₀₀に達した後、最終濃度1μmol/lとなるように、IPTGを培養物に添加した。4時間後、5,000g、20分間の遠心分離によって、バクテリアをペレット化し、そのペレットを、-80℃で一晩凍結させた。 20

【0053】

凍結させたペレットを、氷中で15-30分間解凍し、湿潤重量1グラム当たり2.5mlで、溶解バッファー(50mM NaH₂PO₄、300mM NaCl(pH8.0))中に、細胞を再懸濁させた。最終濃度1mg/mlとなるようにリゾチームを添加し、氷上で30分間、細胞をインキュベートし、次いで、10秒間、氷上で6回、細胞を超音波処理した。4、10,000gで30分間遠心分離することによって、細胞デブリをペレット化し、上清を、Ni-NTAの50%スラリー1mlと混合した。 30

【0054】

60分間、4℃で、穏やかに攪拌しながら、混合物をインキュベートし、カラムに導入した。

【0055】

4mlの洗浄バッファー(50mMのNaH₂PO₄、300mM NaCl、50mM イミダゾール(pH8.0))によって3回、カラムを洗浄した後、1.6mlの溶出バッファー(50mM NaH₂PO₄、300mM NaCl、500mM イミダゾール(pH8.0))によって、蛋白質を溶出した。溶出後、限外濾過(セントレックス(centrex) UF-2、シュライシャー・アンド・シュエル(Schleicher & Schuell)、ダッセル(Dassel))によって、バッファーを交換した。

【0056】

1.3 ウエスタンブロッティング

12%ポリアクリルアミドゲル上でのSDS-PAGE後、標準的なプロトコルに従い、ニトロセルロースメンブレンへ、蛋白質を移した。製造者の勧めに従い、シグマ(Sigma)からのモノクローナルマウス抗カルシニューリンA抗体(希釈率1:4000)、ケミコン(Chemicon)からのポリクローナルウサギ抗カルシニューリンAベータおよびアルファ抗体(希釈率1:1000)、ならびに、アマシャム・ファルマシア(Amersham Pharmacia)からの二次HRP結合(conjugated)ヒツジ抗マウスおよびロバ抗ウサギ抗体(希釈率1:1000)を用いて、免疫検出を行った。アマシャム・ファルマシア(Amersham Pharmacia)からのECLプラスキットを用いて検出を行った。

【0057】

10

20

30

40

50

1.4 カルシニューリン活性アッセイ

カルシニューリン活性アッセイキット (カルバイオケム (Calbiochem)、パロ・アルト (Pal o Alto)、USA) を用いて、カルシニューリン活性をアッセイした。簡単に言えば、脱塩カラムによってカルシニューリンを脱塩した後、5 μ l の精製したカルシニューリン (シグマ・アルドリッチ (Sigma Aldrich)、ダイセンホフェン (Deisenhofen)、ドイツ) を、25 μ l の 2 x アッセイバッファー (100mM NaCl, 50mM Tris, 6mM MgCl₂, 0.5mM CaCl₂, 0.5 mM DTT, 0.25% NP-40, 0.25 μ M カルモデュリン)、5 μ l の CNA 16 K 溶液 (1.5 μ g / μ l) を含むか、または含まない、10 μ l の基質溶液 (150 μ M RII ホスホペプチド) に添加した。30分後、100 μ l のグリーン (Green) 試薬を添加することによって、反応を停止し、更に15分経過後、260 nmでの吸収を測定した。ホスファターゼ標準曲線を用いて、放出されたホスファターゼを算出した。活性のカルシウム感受性の検出のために、最終濃度が5 mM (フリーのカルシウム: 5 μ M) および1.5 mM (フリーのカルシウム: 65 μ M) となるように、2 x アッセイバッファーへ、EDTAを添加した。WEBMAXC v. 2.1 (スタンフォード (Stanford)、USA) によって、フリーのカルシウムを算出した。

10

【0058】

1.5 ブルダウンアッセイ

CNA 16 K の精製後、限外濾過によってバッファーを交換し、イミダゾールを除去した。アッセイのために、4 で16時間、50 μ g の CNA 16 K を含むバッファー A (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, pH8.0) を、50 μ l の Ni - NTA 磁気ビーズ (キアゲン (Qiagen)、ヒルデン (Hilden)、ドイツ)、および、10 μ g の精製したウシ脳カルシニューリン (シグマ・アルドリッチ (Sigma Aldrich)、ダイセンホフェン (Deisenhofen)、ドイツ) または100 μ l のネズミ脳ホモジェネートを添加したか、または添加していない、300 μ l のバッファー A とともにインキュベートした。バクテリアからの対応する溶出画分を、pQE30のみによって形質転換し、CNA 16 K と完全に同様に処理し、CNA 16 K のための対照として使用した。

20

【0059】

結合後、一定に振とうしながら (1000 rpm、4)、500 μ l のバッファー A によって、30分間、2回、ビーズを洗浄し、100 μ l のバッファー C バッファー (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 500mM イミダゾール, pH8.0) によって溶出を行った。ウエスタ

30

ンプロットティングによってカルシニューリンを検出した。

【0060】

1.6 カルシニューリン A クローニング

真核生物発現ベクターへのカルシニューリンスプライスバリエーション CNA K16 (配列番号7、図1、図4) のクローニング:

以下のプライマーを使用して、原核生物発現ベクター pQE30 K16 から、カルシニューリンスプライスバリエーションを増幅した:

【化2】

16kfw1: ggg gac aag ttt gta caa aaa agc agg ctt aga agg aga tag aac cat
gag agg atc gca tca cca tca cca tca cgg a (ヒスチジンによってタグされた
(histidine-tagged)変異体のため)

40

または、

【化3】

16kfw2: ggg gac aag ttt gta caa aaa agc agg ctt aga agg aga tag aac c -
ATG GCC GCC CCG GAG CCG GCC CGG GCT GCA (ヒスチジンタグなし)

および、両方のケースにおいて、

【化4】

50

16krev: ggg gac cac ttt gta caa gaa agc tgg gtc cta tca ctg aat att gct gct
att act.

【 0 0 6 1 】

製造者の勧めに従って、組み換えによって、アンプリコンを、真核生物発現ベクター p D E S T 1 2 . 2 に挿入した。得られたクローンを配列決定し、H i s - タグ型については、pEXP12-K101と、非タグ型については、pEXP12-K105と命名した。

【 0 0 6 2 】

1 . 7 アポトース (Apoptose) アッセイ

H e l a 細胞 (セルピックス・カルシノーマ (Cervix Carcinoma)) における T N F によっ 10
て誘発されたアポトースを、癌細胞におけるアポトースのモデルとして使用したが、
それは、原則として、神経細胞、免疫細胞、心筋細胞、および他の組織においても重要で
ある [セル (Cell) 1996 Nov. 1 ; 87 (3): 565-76, T N F レセプター 1 エフェクター機能
の詳細な分析 (Dissection of TNF receptor 1 effector functions): J N K 活性化は、
アポトースとは関係ないが、N F - カッパ B 活性化は、細胞死を防ぐ (JNK activation
is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death)。リ
ウ (Liu) ZG、ハシュ (Hsu) H、ゲデル (Goeddel) DV、カリン (Karin) M.]。プラスミド (pEX
P12-K101 もしくは pEXP12-K105) を含むいずれかの C N A 1 6 K によって、または、空の
(empty) p C D N A 3 ベクターを含むか、もしくはプラスミドをまったく含まない対照と 20
して、H e l a 細胞をトランスフェクトした。T N F によって、細胞アポトースを誘発
した (10 ng/ml、トランスフェクションの 4 8 時間後)。各ケースにおいて、細胞を、L a
c Z を発現する C M V - - プラスミド (CMV- - plasmid expressing LacZ) とともにトラ
ンスフェクトした。よって、L a c Z ポジティブ (青) 細胞を数えることによって、細胞
生存率を試験することができる。トランスフェクションの 2 4 時間後に、X - Gal 染色に
よって試験された、L a c Z ポジティブ細胞の減少は、アポトースによる細胞死を示す
。

【 0 0 6 3 】

1 . 8 蛋白質抽出

2 x 均質化バッファー (500 mM スクロース、4mM EDTA、0.02 % -メルカプトエタノー 30
ル ; 500 μ l / 100 mg 組織) へ、凍結した脊髄組織を移した。プロテアーゼに対する保護
のために、1/10 vol の P M S F (1 0 m g / m l) およびロイペプチン (1 m g / m l)
を、それぞれ添加した、最後に、蒸留水によって、組織 1 0 0 m g 当たり 1 0 0 0 μ l に
容量を平衡化した。この溶液中で、ガラス製ホモジェナイザーによって、組織を均質化し
、次いで、カップに移した。これらのカップを、4 、 1 4 , 0 0 0 g で 3 時間遠心分離
し、粒子 (不溶物) を含む画分から、可溶物を分離した。遠心分離後、可溶性画分を新た
なカップに満たした。十分な量の 2 x 均質化バッファーによって、粒子を含むカップを満
たした。標準としてウシ血清アルブミンを用いて、バイオラド (BioRad) 蛋白質アッセイ試
薬によって、両画分の蛋白質含有量を決定した。

【 0 0 6 4 】

2 . 結果

2 . 1 新規カルシニューリン A スプライスバリエーションのための c D N A の特徴付けお 40 よび構造

ヒト脊髄ポリ - A⁺ - R N A (クロンテック (Clontech)、パロ・アルト (Palo Alto)、USA
) から、ネステッド P C R によって、カルシニューリン A スプライスバリエーションを増幅
した。1 . 6 k b の強いバンドは、カルシニューリン A スプライスバリエーションに対する
転写物を示していた。実際に、クローニングおよび配列決定から、1 . 6 k b のバンドは
、エキソン 1 3 の選択的スプライシングによって 3 0 塩基対異なる 2 つのスプライスバ
リエーションからなることが示された。また、約 4 5 0 b p に、より小さなバンドが得られ、次
いで、それを単離してクローニングした (図 7)。配列決定により、このアンプリコンが
、カルシニューリン A のコーディング塩基対 1 - 5 7 および 1 1 5 8 - 1 5 3 3 と 1 0 50

0%の同一性を示す、438塩基対のオープンリーディングフレームを取り囲んでおり、それにより、カルシニューリンA遺伝子のエキソン1、11、12、13、および14を表す(representing)ことが示された(図3)。CNA 16Kと命名されたcDNAは、15,522ダルトンの算出分子量を有する、N末端ドメインの一部およびカルモデュリン結合ドメイン、ならびに、自己抑制ドメインを含む、145アミノ酸の蛋白質をコードする。標準的なカルシニューリンAからの触媒ドメインおよびカルシニューリンB結合ドメインは、完全に欠けていた(図8)。また、バイオインフォマティック分析は、システインプロテアーゼとのわずかな類似性を示す。

【0065】

このcDNAがクローニング人工産物(artefact)を表すか、または、それが、蛋白質に翻訳される新規カルシニューリンAスプライスバリエーションであるかを決定するために、精製された、市販のウシカルシニューリン(シグマ・アルドリッチ(Sigma Aldrich)、ダイセンホフェン(Deisenhofen)、ドイツ)において、ウエスタンブロット分析を行った。抗カルシニューリンA抗体により、より小さな免疫反応性バンドが、35kDの範囲で目に見えるようになったが、16kDの範囲の免疫反応性は検出できなかった。カルシニューリン活性が、スーパーオキシド・ジスムターゼによって保護され、この酵素と一緒に精製する(copurifies)という事実を考慮して、精製されたカルシニューリンおよび結合パートナーとしてのヒト組み換え型スーパーオキシド・ジスムターゼ(SOD)を用いるプルダウンアッセイを行い、ウエスタンブロットングによって、相互作用蛋白質を分析した。図9からわかるように、結合パートナーとしてのSODなしで、標準的なカルシニューリンおよび既に見られていた35kDのバンドだけが検出できた(レーン1)のに対し、結合パートナーとしてのSODを用いるアッセイにおいて、約16kDの更なるバンドが検出できた(図9、レーン2)。ヒト組み換え型SODのみでは、カルシニューリン免疫反応性は見られなかった(レーン3)。明らかに、ヒト組み換え型SODとのアフィニティーによって、CNA 16Kが豊富になった。

【0066】

しかし、カルシニューリンAのN末端部に対する抗体を用いると、59kDの標準的な変異体のほかに、マウスの脊髄抽出物のサイトソル画分において、約16kDのより小さなバンドを直接検出することができた(図9、レーン4)のに対し、ペレット画分では、16kDのバンドは観察できなかった(図9、レーン5)。

【0067】

また、カルシニューリンAのN末端部に対する抗体を使用する場合、マウスの脊髄からの蛋白質抽出物のサイトソル画分およびペレット画分の両方において、16kDの範囲の免疫反応性が容易に検出できた(図9、レーン6-9)。興味深いことに、ヒト筋萎縮性側索硬化症と非常に似ている表現型を発達させる変異したヒトスーパーオキシド・ジスムターゼのために組み換えられたマウスにおいて、この短いスプライスバリエーションの発現は、はるかに強く(図9、レーン8および9)、運動ニューロン疾患におけるスプライスバリエーションの役割が示唆された。

【0068】

2.2 カルシニューリンA 16Kの組み換え型発現、精製、および生化学的分析
 新たなカルシニューリンAスプライスバリエーションを生化学的に分析するために、cDNAをpQE30発現ベクターにクローニングした結果、バクテリア溶菌液からの迅速な精製のためのN末端HISタグを有する、158アミノ酸および算出分子量16,921.13Daの仮想(hypothetical)蛋白質が得られた。IPTGによる誘導(induction)およびNi-NTAアガロースによる精製により、実際に、17kDaの蛋白質が得られた。発現効率は低く、500mlの培養液から、約600μgのカルシニューリンA 16K蛋白質が得られた。アフィニティーカラム溶出液のウエスタンブロットングにより、抗カルシニューリンA抗体を用いてポジティブな免疫反応性が示された。

【0069】

触媒ドメインの欠如により予想されるように、基質としてホスホ-R11ペプチドを用いるカ

10

20

30

40

50

ルシニューリン活性アッセイにおいて、CNA 16Kはホスファターゼ活性を示さなかった。第二に、精製したウシカルシニューリン(シグマ(Sigma)、ダイセンホフェン(Deisenhofen))を、CNA 16Kとともに、および、CNA 16Kなしでインキュベートすることにより、CNA 16K活性へのCNA 16Kの影響を調べた。対照として、バクテリアをpQE30によって形質転換し、誘発し、採取し、そして、カルシニューリンA 16Kの場合と同様に、精製工程を繰り返した。匹敵する(comparable)溶出画分を、CNA 16Kに対する対照として用いた。図10において見られるように、対照溶出液の添加と比較した場合、精製したカルシニューリンホロ酵素への精製したCNA 16Kの添加は、R11ペプチドの脱リン酸化を刺激した。対照溶出液の添加と比べて(100%)、カルシニューリンのホスファターゼ活性は、118.5%(65 μ MのフリーCa)、および119.6%(5 μ MのフリーCa)に増加した。興味深いことに、この効果は、低カルシウム濃度においてのみ見ることができた(図10)。標準的なアッセイ条件下でのカルシウム濃度において、通常、1mMの範囲において、顕著な効果は検出できなかった。このことは、CNA 16Kによるホスファターゼ活性の活性化は、低い生理学的に関連するカルシウム濃度に、本質的に制限されることを示す。

10

【0070】

基質添加前に、30分間、CNA 16Kとカルシニューリンをブレインキュベーションすることにより、測定直前にカルシニューリンへCNA 16Kを直接添加する場合(対照活性と比べて106%、図11)と比べて、CNA 16Kの活性化効果は増加した(対照活性の126%)。

20

【0071】

結合蛋白質としてCNA 16Kを用いるプルダウンアッセイを行い、CNA 16Kと精製したカルシニューリンとの間にインビトロで直接相互作用があるかを確認した。このアッセイにおいて、CNA 16Kを、磁気Ni-NTAビーズに結合させ、精製したウシカルシニューリンならびにネズミ脊髄溶出液とともにインキュベートした。再び、pQE30によって形質転換され、Ni-NTAアガロースによって精製されたバクテリアからの対応する溶出液を、対照として用いた。図12において見られるように、精製されたウシ脳カルシニューリンまたはネズミ脊髄ホモジェネートのいずれかを使用すると、固定化されたヒスチジンによってタグされたCNA 16Kへのカルシニューリンの強固な結合が見られた(図12、レーン3および4)。それに対して、対照溶出液を使用した場合には、検出可能な結合は見られなかった(図12、レーン2および5)。

30

【0072】

2.3 カルシニューリンA 16Kの発現および機能的特徴付け

カルシニューリンA 16Kについて得られた結果に加え、カルシニューリンA 16KのCNAスプライズバリエーションを発現させ、特徴付けした。最初に、そのスプライズバリエーションのcDNAを、材料および方法のポイント1.7に記載のようにクローニングした。

【0073】

CNA 16Kのクローニング後、材料および方法のポイント1.8に記載のように、アポトースアッセイを行った。前記アッセイの結果を、表1および添付のダイヤグラム1

40

【0074】

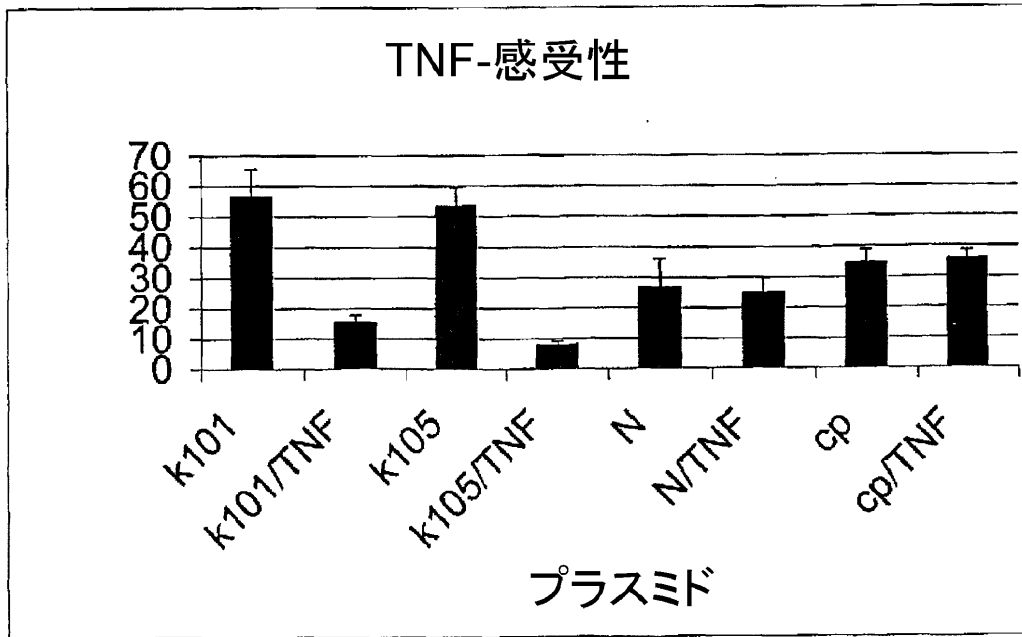
【表1】

表1
アポトーシスへのCNAβ 16Kの効果

サンプル ラベル	His-タグ (His-tagged) CNA ^β -16K		His-タグ (His-tagged) CNA ^β -16K		対照		対照		対照	
	CNA ^β -16K k101	CNA ^β -16K k101/TNF	CNA ^β -16K k105	CNA ^β -16K k105/TNF	非トランスフェクト N	トランスフェクト N/TNF	対照プラスミド cp	対照プラスミド cp/TNF	対照 pCDNA3 cp/TNF	対照 cp/TNF
細胞/プレート1	37	9	62	5	57	26	39	41		
細胞/プレート2	39	17	56	7	21	39	29	44		
細胞/プレート3	71	20	33	7	39	29	50	33		
細胞/プレート4	82	11	69	12	7	21	30	34		
細胞/プレート5	55	20	47	9	10	10	25	27		
ラベル	k101	k101/TNF	k105	k105/TNF	N	N/TNF	cp	cp/TNF		
標準 偏差	8,78455277	2,28944311	6,2388293	1,181138989	3,87746444	4,75608834	4,47097713	3,01793639	35,8	
	トランスフェクトされた カルシニューリンプラスミドバリエーション				非トランスフェクト		対照プラスミド(pCDNA3)			

10

ダイアグラム1



20

30

【0075】

まとめ：ニューロン特異的CNA K16をトランスフェクトされたすべての細胞は、TNFによって誘発されたアポトーシスに対する感受性がより高い。その結果、CNA 16Kは、ニューロンアポトーシスの重要なレギュレーターである。なぜなら、それはニューロン特異的だからである。一般に、CNA 16K類(、、のいずれか)は、アポトーシスにおいて、特に、癌、脳、心臓、免疫系において重要である。そのようなTNFへの影響は、カルシニューリン調節なしでも得られ、即ち、おそらく、その触媒活性に依存しない。

40

【0076】

上記表1によって示され得るように、ニューロン特異的CNA 16Kをトランスフェクトされたすべての細胞は、TNFによって誘発されたアポトーシスに対する感受性がより高い、その結果、CNA 16Kは、ニューロンアポトーシスの重要なレギュレーターである。なぜなら、それはニューロン特異的だからである。一般に、カルシニューリン、および、そのため、レギュレーターは、細胞サイクルおよび免疫系の制御[ルスナク(Rusnak

50

) F (2000), フィジオロジカル・レビュー(Physiological reviews) 80, 1483-1521]、ならびに、He1a 癌細胞による結果によって示されるように、癌に関連するので、CNA 類(、、またはのいずれか)は、アポトーシスにおいて、特に、癌、脳、心臓、免疫系において重要である。

【図面の簡単な説明】

【0077】

【図1】カルシニューリンAの型の本発明のスプライスバリエーションのヌクレオチド配列。

【図2】カルシニューリンAの型の本発明のスプライスバリエーションのヌクレオチド配列。

10

【図3】カルシニューリンAの型の本発明のスプライスバリエーションのヌクレオチド配列。

【図4】カルシニューリンAの型の本発明のスプライスバリエーションのアミノ酸配列。

【図5】カルシニューリンAの型の本発明のスプライスバリエーションのアミノ酸配列。

【図6】カルシニューリンAの型の本発明のスプライスバリエーションのアミノ酸配列。

【図7】カルシニューリンAのPCR増幅。

【図8】カルシニューリン(CN)A16Kのドメインおよびエクソン構造。

【図9】カルシニューリンの免疫プロット。

【図10】CNA16Kによるホスファターゼ活性の活性化は、カルシウム(Ca)依存性であることを示す。

20

【図11】ブレインキューションは、CNA16Kの有効性を高めることを示す。

【図12】カルシニューリンA16Kと標準的なカルシニューリンとの直接相互作用。

【図1】

1 ATGGCCGCC CGGAGCCGG CCGGGTGA CCGCCCCAC CCGCCCCC CCGCCCCC
61 CCGGGCTG ACCGGTGT CAAAGTTCA GCTGAGCC GGAAGAAAT CATAGA AAC
121 AAAATTCAG CAATGGCAA GATGGCAA GCTTCTCTG TTCTCAGGA GGAGGTGAA
181 AGTGTCTGA CACTCAAGG CTTGACTCC ACAGGANGT TCCCTAGTG AGTGTAGCT
241 GGAGGACGGC AGACCTGCA AAGTCCaca gttaggcta tlgaggclga aaaagcaATA
301 CGAGGATCT CTCACCCACA TAGAATCTGC AGTTTGAAG AGGCRAAGG TTGGATAGG
361 ATCAATGAGA GAATGCCACC TCGARAAGAT GCTGTACAGC AAGATGGTIT CAATCTCTG
421 AACACCGCAC ATGCCACTGA GAACCAAGGG ACCGGCAACC ATACTGCCCA GTGA

図1

【図2】

1 ATGTCCGGGA GGGCTTCCA CCTTCCACC ACCGACGGG TCATCAAAGG AAGCACTACA
61 GTTCTTAGG AGATCATCAG GAATRAGATC AGAGCCATTG GGAAGATGGC ACCGGTCTTT
121 TCAATTTCTT GGCAGAAAG TGAGAGTGTG CTGACTCTCA AGGCCCTGAC TCCACACGGC
181 ACACCTCCCT TGGCGTCTCT CTCAGGAGGC AAGCAGACTA TCGAGACAGC CACAGTAgaa
241 GCGgtagag9 cccgg9aagc cATCRAGAGG TTCTCGCTTC AGCACAAAGT CCGGAGTTTT
301 GAAGAAGCGC GAGGTCTGGA CCGAATTAAT GAGCGAATGC CACCCGAAA GGATAGCATA
361 TACCCTGGTG GGCAATGAA ATCTGTAACC TCAGCACACT CACATGTCTGC GCACAGGAGC
421 GACCAAGGGA AGAAAGCCCA TTCATGA

図2

【 3 】

1 ATGTCCGAGC CCAAGGCAAT TGAICCCCAAG TTGTCCACGA CCGACAGGGT GGTGAAAGGT
 61 GCAACAGCTG CAGCCCGGAA AGAGCGATA AGGAACAAGA TCCGAGCAAT AGGCAAAATG
 121 GCCNAGTGT TCTCAGTGT CAGAGAGAG AGTGAGATG TCGTGACGCT GAAAGCCTTG
 181 ACCCCAACTG GCATGCTCCC CAGCGGAGTA CTCTCTGGAG GGAAGCAAC CCTGCAAAAG
 241 GCTactggtg aggtattga gctatcaaaG GATTTTCACC ACAACATAAG
 301 ATCACTAGCT TCGAGGAAGC CAAGGCTTA GACCGAATTA ATGAGAGGAT GCCGCCTGCG
 361 AGAGATGCCA TGCCCTCTGA CGCCACCTT TACTCCATCA ACAAGGCTCT CACCTCAGAG
 421 ACTRACGGCA CGGACACAA TGGCAGTAAI AGCAGCAATA TTCAGTGA

3

【 4 】

/ 翻訳 = "MAAPEFAAAPPPPPPPPPPPPPPPGADRVVKGSAARKEIIRNKIRA
 IGKMARVSVLRESESVLTKGLTPTGMLPSGLAGGROTLOSATVEATEAFKIRG
 FSPPHRCSPEEAKGLDRINERMPPRKDAYQQDGFNSLNTAHATENHGTGNHTAQ."

4

【 5 】

/ 翻訳 = "MSGRRFHLSTTDRVVIKSTTVRKEIIRNKIRAIKGMARVFSILR
 QESESVLTKGLTPTGTLPLVLSGGKOTIETATVEAVEAREAIRGFSLQHKIRSFEE
 ARGLLDRINERMPFRKDSIYPGGPKSVTSAHSHAAHRSDDGKKHHS."

5

【 6 】

/ 翻訳 = "MSEFAIDPKLSTTDRVVYKGTAAARKEAIRNKIRAIKGMARVF
 SVLRESESVLTKGLTPTGMLPSGLSGGKQTLQSATVEATEADEAIKGFSPQHKIT
 SFEEAKGLDRINERMPPRDAMPDANLNSINKALTSETNGTDSNGSNSSNIQ."

6

【 図 7 】

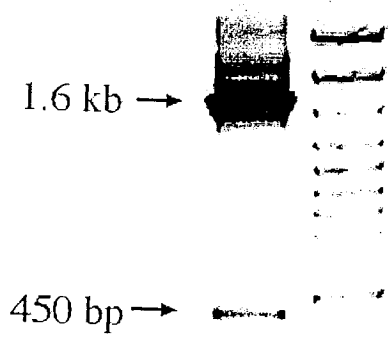


図7

【 図 8 】

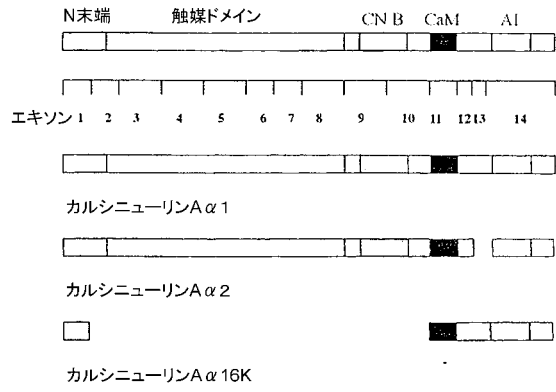


図8

【 図 9 】

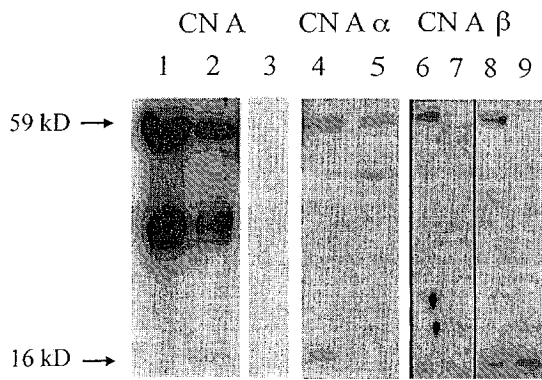


図9

【 図 10 】

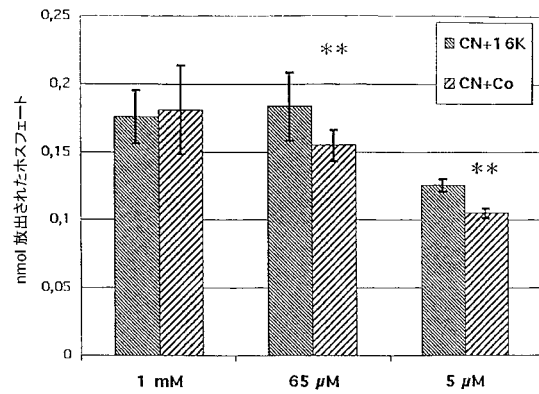


図10

【 図 1 1 】

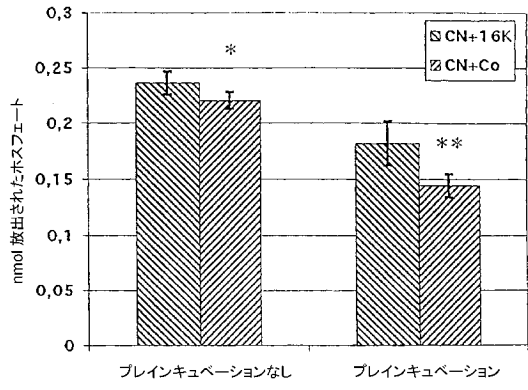


図 11

【 図 1 2 】

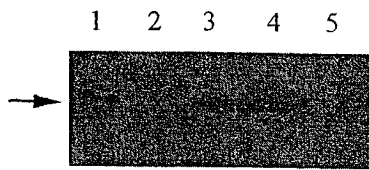


図 12

【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 February 2003 (13.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/012093 A2

- (51) International Patent Classification: C12N 9/16
- (21) International Application Number: PCT/EP02/08506
- (22) International Filing Date: 31 July 2002 (31.07.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
01118401.7 31 July 2001 (31.07.2001) EP
- (71) Applicant (for all designated States except US):
GENOPIA BIOMEDICAL GMBH [DE/DE];
Stuhlsatzenghausweg 69, 66123 Saarlouis (DE).
- (72) Inventor: and
(75) Inventor/Applicant (for US only): VÖLKEL, Helge
[DE/DE]; Lohrstrasse 18/1, 89081 Ulm (DE).
- (74) Agent: MÜTSCHLE, Thomas; Ruff, Wilhelm, Bcior,
Danster & Partner, Zusammenschluss nr. 16, Kronen-
strasse 30, 70174 Stuttgart (DE).
- (81) Designated States (national): AI, 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, GI,
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, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KR, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SI, SK,
TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
without international search report and to be republished
upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/012093 A2

(54) Title: REGULATOR OF CALCINEURIN

(57) Abstract: A regulator of Calcineurin is provided, which is based on a splice variant of the catalytic subunit of Calcineurin. Preferably the catalytic subunit is the β -form, γ -form and/or α -form of this subunit. The invention comprises the regulator and a substance, which influences the stimulating activity of the regulator, as active agents for the treatment of diseases, which are preferably connected with a disturbance of Calcineurin activity.

Regulator of Calcineurin

5 The present invention relates to a regulator of Calcineurin and uses of
this regulator.

Calcineurin is a serine/threonine protein phosphatase, which is a
heterodimer composed of a catalytic subunit (Calcineurin A) and a
10 regulatory subunit (Calcineurin B). The catalytic subunit is about 60 and
the regulatory subunit is about 18 kDa. This protein phosphatase is
under the control of calcium and calmodulin, wherein binding of calcium
and calmodulin is necessary for enzymatic activity.

15 Both subunits, the catalytic subunit and the regulatory subunit, occur in
different isoforms which are encoded by different genes. In mammals,
three distinct genes (A- α , A- β , A- γ) for the catalytic subunit have been
characterized. In general, this subunit has five distinct domains: the N-
terminal domain of sofar unknown function, the catalytic domain, the B-
20 subunit binding domain, the calmodulin-binding domain and the auto-
inhibitory domain.

Calcineurin plays an important role in the coupling of calcium signals to
cellular responses. Although it is ubiquitously expressed, distinct tissue
25 expression patterns have been described for various isoforms of each
subunit. Now Calcineurin is discussed in various contextes. For
example, Calcineurin has been implicated in neuronal signalling
pathways but the neuronal function is only poorly understood.
Furthermore, Calcineurin is discussed in the context of
30 immunosuppression, wherein Calcineurin acts via the transcription factor
NFAT (Nuclear Factor Of Activated T-Cells) on the T-cell response.

WO 03/012093

PCT/EP02/08506

- 2 -

Regarding the regulation of Calcineurin activity it is known that this enzyme is regulated by calcium and calmodulin (Rusnak, F. and Mertz, P. (2000), *Physiol. Rev.* 80, 1483-1521). It becomes activated by binding calcium and calmodulin when cytosolic calcium rises, and is inhibited on binding the immunosuppressants Cyclosporin A and FK 506 in complexes with their respective cellular receptors. Furthermore, Calcineurin regulators of the so-called calcipressin family have been described (Kingsbury, T.J. and Cunningham, K.W. (2000), *Genes and Dev.* 14, 1595-1604). Additionally, the cellular redox state has been implicated in the regulation of Calcineurin (Wang et al. (1996) *Nature* 383, 434-437).

Changes in Calcineurin expression, activity and tissue distribution have been described in a variety of disorders ranging from ischemia/reperfusion injury to cardiac hypertrophy, heart failure, stroke, amyotrophic lateral sclerosis, a degenerative motor neuron disease, skeletal muscle diseases and epilepsy.

Because Calcineurin plays a crucial role in widespread diseases like heart failure and stroke, there is a special interest in the regulatory mechanisms concerning the activity of Calcineurin. The detailed knowledge of the regulation mechanisms would provide a possibility to influence the activity of Calcineurin, especially in pathological situations. Thus, the invention has the object to provide suited targets for influencing the activity of this crucial enzyme and to provide active agents for the treatment of diseases, which are connected with a disturbance of Calcineurin activity.

This object is solved by a regulator of Calcineurin as described in claim 1. Preferred embodiments of this regulator are described in the dependent claims 2 – 4. The corresponding nucleotide sequences and amino acid sequences are claimed in the claims 5 – 8. In claims 9 – 13

WO 03/012093

PCT/EP02/08506

- 3 -

an active agent for the treatment of diseases is described. Claims 14 – 16 relate to a use of said active agent a method for the treatment of diseases and a pharmaceutical composition. Claims 17 – 22 concern the use of the regulator for diagnosis of diseases and a corresponding kit. 5 Claims 23 – 25 describe a method for searching substances, and the resulting active agent. The wording of all claims is hereby made to the content of the specification by reference.

The invention comprises a regulator of Calcineurin, which is based on a splice variant of the catalytic subunit of Calcineurin. In comparison with the complete subunit this regulator lacks the complete subunit, the catalytic and the Calcineurin B binding domain, therefore it possesses no phosphatase activity on its own. It retains part of the N-terminal domain, and the complete calmodulin-binding domain as well as the 15 autoinhibitory domain. This inventive regulator is able to stimulate the phosphatase activity of Calcineurin, especially at low calcium concentrations. The splice variant itself binds calcium. Therefore the stimulating activity of the splice variant is especially surprising, because it should be assumed, that the splice variant and Calcineurin compete 20 for calcium.

In a preferred embodiment of the invention the splice variant forms a protein complex with Calcineurin, especially with the catalytic Calcineurin holoenzyme. Especially preferred is a protein complex with 25 Calcineurin and superoxide dismutase.

In general, the stimulating effect of the splice variant is dependent on low calcium concentrations. Preferably, these calcium concentrations are below 1 mM. A putative function of the splice variant under natural 30 conditions is to render Calcineurin into a more calcium sensitive enzyme thus triggering Calcineurin linked signalling pathways at even lower calcium concentrations. The inventive splice variant provides an

WO 03/012093

PCT/EP02/08506

- 4 -

additional regulatory mechanism that ensures Calcineurin activity even at low calcium concentrations.

As outlined above, there are three isoforms of the catalytic subunit of Calcineurin. In a preferred embodiment of the invention the regulator of Calcineurin is based on a splice variant of the β -form, γ -form and/or α -form of the catalytic subunit. The splice variants of the different isoforms occur each in two forms (a) and (b), wherein one form (b) lacks 30 nucleotides respectively 10 amino acid residues as depicted in figures 1 to 6. In an especially preferred embodiment the regulator is characterized by an amino acid sequence at least 70 % and preferably at least 80 %, especially at least 90 % identical to the amino acid sequence of the splice variant of the β -form (SEQ ID NO 7, 8), the γ -form (SEQ ID NO 9, 10) and/or the α -form (SEQ ID NO 11, 12). Preferably, the inventive regulator is coded by a nucleotide sequence at least 70 % and preferably at least 80 %, especially at least 90 % identical to the nucleotide sequence coding for the splice variant of the β -form (SEQ ID NO 1, 2), the γ -form (SEQ ID NO 3, 4) and/or the α -form (SEQ ID NO 5, 6).

20

Furthermore, the invention comprises a nucleotide sequence, which is at least 70 % and preferably at least 80 %, especially at least 90 % identical to a nucleotide sequence according to figure 1 (SEQ ID NO 1, 2), which represents the sequence of the splice variant of the β -form, and/or which is at least 70 % and preferably at least 80 %, especially at least 90 % identical to a nucleotide sequence according to figure 2 (SEQ ID NO 3, 4), which represents the sequence of the γ -form of the splice variant. Preferably, these nucleotide sequences code for a regulator of Calcineurin.

30

Additionally, the invention comprises an amino acid sequence, which is at least 70 % and preferably at least 80 %, especially at least 90 %

WO 03/012093

PCT/EP02/08506

- 5 -

identical to an amino acid sequence according to figure 4 (SEQ ID NO 7, 8), which represents the amino acid sequence of the β -form of the splice variant, and/or according to figure 5 (SEQ ID NO 9, 10), which represents the amino acid sequence of the γ -form of the splice variant.

5 Preferably these amino acid sequences form a regulator for Calcineurin as described above.

Furthermore, the invention comprises an active agent especially for the treatment of diseases, wherein the active agent is the regulator of
10 Calcineurin as described above. Since the inventive regulator is able to stimulate the phosphatase activity of Calcineurin, the active agent is especially useful for the treatment of diseases, which are accompanied by reduced Calcineurin activity, e.g. Alzheimers disease or amyotrophic lateral sclerosis.

15 In another embodiment of the invention an active agent for the treatment of diseases is provided, which influences the regulator of Calcineurin as it is described above. In one embodiment said active agent increases the activity of the regulator of Calcineurin. Such an active agent is
20 especially useful for the treatment of diseases, which are accompanied by low Calcineurin activities. In another embodiment the active agent reduces the activity of the regulator of Calcineurin. Such an active agent is especially useful for the treatment of diseases which are accompanied by an increased Calcineurin activity.

25 Preferably the active agent is a substance, which interacts with the regulator thereby blocking its stimulating activity. In another embodiment the active agent is an inactive variant of the regulator, which competes for substrates with the functional regulator, and/or influences the forming
30 of functional protein complexes. Such functional protein complexes may be built of Calcineurin and the regulator and/or superoxide dismutase, and/or other components.

WO 03/012093

PCT/EP02/08506

- 6 -

One example of diseases, which could be effectively treated with an active agent, which reduces the activity of the regulator of Calcineurin, are cardiovascular diseases. For example in tissue of heart failure organs it is described, that Calcineurin is about four times higher than in normal tissue. By administering an active agent, which reduces the activity of a stimulator, i.e. the regulator of Calcineurin as described above, the pathological condition is counteracted.

10 In another embodiment of the invention the part of the regulator of Calcineurin is stimulation of Calcineurin, which results in the closing of calcium channels in a feedback mechanism, which terminates the activity of Calcineurin, because the necessary calcium influx is stopped. By adding an inventive agent, which reduces the activity of the regulator, 15 i.e. the stimulator of Calcineurin, the feedback mechanism is stopped. Consequently, the calcium channels stay open and the calcium influx continues, resulting in a maintenance of Calcineurin activity. Consequently it depends on the certain circumstances of the disease to be treated, if an active agent is chosen, which increases the activity of 20 the regulator of Calcineurin or an active agent is chosen, which reduces said activity. In general, cardiovascular diseases and/or neurodegenerative diseases like epilepsy or amyotrophic lateral sclerosis and other diseases like skeletal muscle diseases, immunological diseases, inflammation diseases and/or cancer, for 25 example, are preferred candidates for the treatment with an active agent according to the invention.

In general, all CNAs (either α , β and/or γ), as also active agents influencing the activity of the CNAs, can be used to influence apoptosis. 30 For instance, activators of the CNAs (and the CNAs by their own) are potent stimulators of apoptosis, whereas inhibitors of the CNAs (and

WO 03/012093

PCT/EP02/08506

- 7 -

modified CNAs by their own) can be used as potent inhibitors of apoptosis.

According to the invention, activators of CNAs can be used e.g. as
5 therapeutic agents (for instance as therapeutic proteins) to treat e.g.
cancer, immune diseases, neurological diseases, heart and
cardiovascular diseases and/or inflammation diseases by induction of
apoptosis in problematic cells. In addition to the already described
activators of the inventive matter, also e.g. genetically modified CNAs
10 and/or the CNAs by their own (the nucleotide and/or amino acids
sequences) can be used as activator of apoptosis.

On the other side, inhibitors of the CNAs (either α , β and/or γ) can be
used as therapeutic agents to treat e.g. cancer, immune diseases,
15 neurological diseases, heart and cardiovascular diseases and/or
inflammation diseases by prevention of apoptosis in problematic cells.
Such inhibitors of the inventive matter can be, in addition to the already
described, for instance antisense sequence(s) of the CNAs and/or
antibodies against the CNAs.

20
Furthermore, the invention comprises the use of an active agent as
described above for the treatment of diseases, and a method for the
treatment of diseases, wherein at least one inventive active agent as
described above is administered. Regarding further details of said use
25 and said method reference is made to the description above.

Additionally, the invention comprises a pharmaceutical composition,
which comprises at least one active agent as described above in an
effective amount and at least one pharmaceutical carrier. Depending
30 from the circumstances of the disease to be treated the pharmaceutical
composition is intended for topical or systemical administration, for
example.

WO 03/012093

PCT/EP02/08506

- 8 -

Furthermore, the invention comprises the use of a regulator of Calcineurin for the diagnosis of diseases, wherein the frequency of said regulator in the organism is analysed. As outlined above, several disorders are accompanied by an increased or decreased activity of Calcineurin in comparison with non-pathological conditions. In many cases this altered Calcineurin activity is caused by a changed activity and/or frequency of the regulator of Calcineurin, which is based on a splice variant as described above. For example in an animal model for amyotrophic lateral sclerosis, the inventive splice variant of the β -form of Calcineurin A is considerably stronger expressed than in normal animals, as described in further detail in the examples below. Therefore the invention comprises the use of the regulator for diagnosis of the respective diseases, especially in the early diagnosis of the diseases. In a preferred embodiment of the inventive use at least one substance is used, which interacts with the regulator of Calcineurin. The regulator of Calcineurin is preferably a regulator as described above.

In a preferred embodiment of the inventive use said interacting substance is an antibody, which interacts with the regulator, preferably on the level of protein-protein or protein-peptide interaction. In general, any antibody specific for the regulator is suitable in the inventive manner, for example polyclonal antibodies and/or monoclonal antibodies, as will be obvious for an expert in the art. In a preferred embodiment of this inventive use the specific antibody is placed on an array, which permits a fast and easy performance of the diagnostic test, for example the antibody is placed on a dip stick as it is known in the field of immunodiagnosis.

In another embodiment of the inventive use the interacting substance is a nucleic acid molecule, which hybridizes with at least a portion of a nucleic acid sequence coding for the regulator. This embodiment is

WO 03/012093

PCT/EP02/08506

- 9 -

especially preferred, because such hybridisation probes are cheap and easy to obtain and the diagnostic test can be performed by common methods. For example the hybridisation probe, i.e. the nucleic acid molecule, which hybridizes with at least a portion of the nucleic acid sequence coding for the regulator, is placed on a DNA chip, and the complete diagnostic reaction is preferably performed in an automated manner. In this embodiment the inventive use is especially useful for fast diagnosis of different diseases.

10 Preferred examples of said diseases are connected with a disturbance of Calcineurin activity, for example said diseases are neurodegenerative diseases like amyotrophic lateral sclerosis and/or said diseases are cardiovascular diseases like heart failure. In addition, also immunological diseases, inflammation diseases and/or cancer are
15 examples for diseases connected with a disturbance of calcineurin activity.

Furthermore, the invention comprises a kit, which comprises at least one substance, which is able to interact with the regulator of Calcineurin.
20 This kit is especially useful for diagnosis as described above. In a preferred embodiment of said kit the kit comprises at least one specific antibody for the regulator. In another embodiment of the kit the kit comprises at least one nucleic acid molecule, which is able to hybridize with at least a portion of a nucleic acid sequence coding for the
25 regulator.

Furthermore, the invention comprises a method for searching substances, which influence the activity of Calcineurin. This method is characterized in that a splice variant of the catalytic subunit of
30 Calcineurin is used to identify and/or isolate substances, which are able to interact with the splice variant itself and/or with Calcineurin. In a preferred embodiment of this method the activity of Calcineurin is

WO 03/012093

PCT/EP02/08506

- 10 -

measured in vitro, whereby the influence of the regulator is analysed with or without (as control) additional substances, which possibly influence the activity of Calcineurin via the regulator. In another preferred embodiment of this method the complex formation between at least Calcineurin, the regulator and the substance possibly influencing the activity of Calcineurin is used as read-out system. Regarding further details of the regulator used in this method reference is made to the description above.

10 Finally, the invention comprises an active agent for the treatment of diseases, which is identified and/or isolated by a method as described above.

The described features and further features of the invention read in greater detail from the following description of the figures in conjunction with the examples and the subclaims, whereby each of the individual features could be realized alone or in combination with each other.

In the figures it is shown:

20

Figure 1: Nucleotide sequence of the inventive splice variant of the β -form of Calcineurin A, a further variant of this splice variant lacks nucleotides 268 to 297,

25

Figure 2: Nucleotide sequence of the inventive splice variant of the γ -form of Calcineurin A, a further variant of this splice variant lacks nucleotides 232 to 261,

30

Figure 3: Nucleotide sequence of the inventive splice variant of the α -form of Calcineurin A, a further variant of this splice variant lacks nucleotides 244 to 273,

WO 03/012093

PCT/EP02/08506

- 11 -

Figure 4: Amino acid sequence of the inventive splice variant of the β -form of Calcineurin A, a further variant of this splice variant lacks amino acid residues 90 to 99,

- 5 Figure 5: Amino acid sequence of the inventive splice variant of the γ -form of Calcineurin A, a further variant of this splice variant lacks amino acid residues 78 to 87,

- Figure 6: Amino acid sequence of the inventive splice variant of the α -form of Calcineurin A, a further variant of this splice variant lacks amino acid residues 82 to 91,

- Figure 7: PCR amplification of Calcineurin A- α . Calcineurin cDNAs were amplified by nested PCR and the amplicons were separated on a 0,8 % agarose gel. In addition to the known transcripts at 1.6 kb, an additional splice variant of about 450 bp was detected,

- Figure 8: Domain and exon structure of Calcineurin (CN) A α 16K. The sequence consists of exons 1, 11, 12, 13 and 14 and contains part of the N-terminal domain, the calmodulin-binding domain and the autoinhibitory domain. Catalytic domain (exon 2 – 8) and Calcineurin B-binding domain (exon 9 + 10) are missing. CN B: Calcineurin B-binding domain; CaM: calmodulin-binding domain; AI: autoinhibitory domain,

- 25 Figure 9: Immunoblot of Calcineurin. 1: bovine brain Calcineurin (Sigma), 2: bovine brain Calcineurin pulled down with Cu/Zn superoxide dismutase (Cu/Zn SOD was bound to NINTA-magnetic beads prior to incubation with bovine brain CNA, Sigma). 3: human recombinant SOD. 4-9: murine spinal cord protein extracts, 4th, 6th and 8th lane: cytosolic fraction, 5th, 7th and 9th lane: pellet fraction, 4th – 7th lane: wild-type. 8th and 9th lane: mice transgenic for human mutated Cu/ZnSOD. 1 to 3 were visualized with a monoclonal mouse anti-Calcineurin A antibody, 4 and 5

were visualized with a rabbit anti-Calceineurin A α , 6-9 with a rabbit anti-Calceineurin A β antibody (Chemicon, Temecula, USA).

5 Figure 10: The activation of phosphatase activity by CNA α 16K is calcium (Ca)-dependent. Calcineurin assays were performed as described below. Different concentrations of free Ca were reached by addition of EDTA. Values are given as mean \pm standard deviation. N=7. **p<0.01, significantly different from control CN activity by Student's t test,

10

Figure 11: Preincubation increases the efficiency of CNA α 16K. Calcineurin activity assays were performed as described below. Preincubation indicates that standard CN and CNA α 16K were added and incubated for 30 minutes before addition of substrate, whereas 15 without preincubation both proteins were added immediately before adding substrate. Values are given as mean \pm standard deviation. N=7. *p<0.02, significantly different from control CN activity by Student's t test; **p<0.01, significantly different from control CN activity by Student's t test,

20

Figure 12: Direct interaction of Calcineurin A α 16K and standard Calcineurin. 1: Calcineurin positive control. 2: bacterial control eluate was bound to Ni-NTA magnetic beads and used to pull down bovine brain CN (Sigma). 3: pull-down of Calcineurin with CNA α 16K (CNA α 16K 25 was bound to Ni-NTA-magnetic beads prior to incubation with bovine brain CN, Sigma). 4: pull-down of spinal cord homogenate with CNA α 16K (CNA α 16K was bound to NiNTA-magnetic beads prior to incubation with murine brain homogenate). 5: bacterial control eluate was bound to Ni-NTA-magnetic beads and used to pull down spinal cord 30 homogenate.

- 13 -

Examples:

In the following description of examples it is shown the cloning and biochemical characterization of the inventive splice variant of the α -form of Calcineurin A. This novel short splice variant lacks the catalytic and the Calcineurin B binding domain. The translation product of this short cDNA, which comprises of exons 1 and 11 – 14, was detected in the aspected size range by Calcineurin A-positive immunoreactivity in western blots of Calcineurin pulled down by superoxide dismutase and in murine spinal cord extracts. Using different antibodies which recognize epitopes in the N-terminal region of the other isoforms of Calcineurin A, corresponding short Calcineurin variants were detected in spinal cord of wild-type mice. The inventive splice variants were especially detected in membrane fractions, and in particular in membrane fractions of the nucleus.

However, although lacking any phosphatase activity on its own, addition of these splice variants to standard Calcineurin increases the phosphatase activity of Calcineurin. This stimulating effect is Ca-dependent, for it is seen only in low calcium concentrations. A possible function of the splice variants therefore is to render Calcineurin into a more calcium sensitive enzyme thus triggering Calcineurin linked signalling pathways, for instance transcription activation through NF-AT, at even lower calcium concentrations. As a result, Calcineurin regulated feedback mechanisms like dephosphorylation and thereby closing of glutamate receptors are likely to reduce toxic calcium influxes. For example with respect to amyotrophic lateral sclerosis, the inventive splice variants are able to enhance the susceptibility of cells to calcium-influx and therefore are at least partially responsible for influences on calcium-linked signalling in amyotrophic lateral sclerosis as well as in apoptosis of neurons, stroke and heart failure, for example.

WO 03/012093

PCT/EP02/08506

- 14 -

As shown later on, the stimulating effect of the inventive splice variants increases when a splice variant is preincubated with Calcineurin. This shows a time-dependent mechanism, which is also strengthened by the detection of a direct physical interaction between the splice variant and standard Calcineurin. Possibly the effect of the inventive splice variants works via calmodulin, e.g. increasing the activating effect of calmodulin by stabilizing the Calcineurin-calmodulin complex.

10 1. Materials and methods

1.1 Calcineurin A α cloning

Calcineurin A α was amplified by a nested PCR from human spinal cord poly-A⁺-RNA from Clontech, Palo Alto, California. PCRs were conducted in a 25 μ l volume. They contained 2.5 μ l 10x PCR-buffer (Stratagene), 0.25 μ l 25mM dNTP-mix, 0.25 μ l CNA-s1 primer (10 μ M), 0.25 μ l CNA-as1 primer (10 μ M), 2.5 μ l cDNA, 0.25 μ l Taq Polymerase (Promega), 0.25 μ l Pfu polymerase and distilled water ad 25 μ l. PCR was started by a first heating step at 95°C for 3 min. The amplification conditions were 35 cycles of 40 sec at 95 °C for denaturing, 40 sec at 55 °C for annealing and 3 min at 72 °C for elongation. PCR was terminated with a 10 min extension step at 72 °C.

The nested PCR was performed with 2.5 μ l of the first amplification reaction with the primers CNA-s2 and CNA-as4 as above. The amplification conditions were 25 cycles of 40 sec at 95 °C for denaturing, 40 sec at 55 °C for annealing and 3 min at 72 °C for elongation. PCR was terminated with a 10 min extension step at 72 °C.

30 Primer sequences were:

WO 03/012093

PCT/EP02/08506

- 15 -

- CNA-s1: ATC TGC TCA GAC GAT GAA CTR GG (SEQ ID NO 13)
CNA-as1: GGC ATC CTC TCG TTA ATT CGG (SEQ ID NO 14)
CNA-s2: CAT GCC ATG GAT CCA TGT CCG AGC CCA AGG C
(SEQ ID NO 15)
5 CNA-as4: TCC CCC CGG GGT ACC CTA GTT AAT CAC TGA ATA
TTG CTG CTA TTA C (SEQ ID NO 16)

The resulting amplicons were digested with Bam HI and Xma I, electrophoresed and purified after gel electrophoresis with the Qiaquick
10 gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturers recommendations. The digested amplicons were ligated into pQE30 vector (Qiagen, Hilden, Germany) digested with Bam HI and Xma I. Resulting clones were sequenced completely.

15 1.2 Expression and purification of CNA α 16K clones

The resulting plasmid pQE30K16 was transformed into M15 bacteria, positive clones were inoculated into LB medium containing 50 μ g/ml Ampicillin at 37°C overnight with vigorous shaking. Next morning 0.5 ml
20 bacteria were inoculated into 1 liter LB medium containing 100 μ g/ml ampicillin, after the bacteria reached a OD₆₀₀ Of 0.5 to 0.7, IPTG was added to the culture to a final concentration of 1 μ mol/l. After 4 hours the bacteria were pelleted by centrifugation at 5,000g for 20 min and the pellet was frozen at -80 °C over night.

25 The frozen pellet was thawed in ice for 15–30 min and the cells were resuspended in lysis buffer (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl (pH8.0)) at 2.5 ml per gram wet weight. Lysozyme was added for a final concentration of 1 mg/ml and the cells were incubated on ice for 30 min,
30 then the cells were sonicated on ice 6 times for 10 seconds. Cellular debris was pelleted by a centrifugation of 30 min at 10,000g and 4 °C and the supernatant was mixed with 1 ml of a 50 % slurry of Ni-NTA.

WO 03/012093

PCT/EP02/08506

- 16 -

The mixture was incubated at 4. °C with gentle shaking for 60 min and loaded into a column.

- 5 After washing the column 3 times with 4 ml of wash buffer (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 50mM imidazole (pH8.0)) the protein was eluted with 1.6 ml elution buffer (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 500mM imidazole (pH8.0)). After elution, a buffer exchange was performed by ultrafiltration (centrex UF-2, Schleicher & Schuell, Dassel).

10

1.3 Western blotting

After SDS-PAGE on 12% polyacrylamide gels, protein was transferred to nitrocellulose membranes according to standard protocols.

- 15 Immunodetections were performed with a monoclonal mouse anti-Calcineurin A antibody from Sigma (dilution 1:4000), polyclonal rabbit anti-Calcineurin A beta and alpha antibodies from Chemicon (dilution 1:1000) and secondary HRP-conjugated sheep anti-mouse and donkey anti-rabbit antibodies from Amersham Pharmacia (dilution 1:1000)
- 20 according to the manufacturers recommendations. Detection was performed with the ECL plus kit from Amersham Pharmacia.

1.4 Calcineurin activity assay

- 25 Calcineurin activity was assayed with the Calcineurin Activity Assay kit (Calbiochem, Palo Alto, USA). In short, after desalting the Calcineurin with a desalting column, 5µl purified Calcineurin (Sigma Aldrich, Deisenhofen, Germany) were added to 25 µl 2x assay buffer (100mM NaCl, 50mM Tris, 6mM MgCl₂, 0.5mM CaCl₂, 0.5mM DTT, 0.25% NP-
- 30 40, 0.25µM Calmodulin), 10 µl substrate solution (150µM RII Phosphopeptide) with or without 5 µl CNAα16K solution (1.5 µg/µl). After 30 minutes the reaction was stopped by addition of 100 µl of Green

WO 03/012093

PCT/EP02/08506

- 17 -

reagent and after additional 15 minutes developing time the absorption at 260 nm was measured. Released phosphate was calculated using a phosphate standard curve. For the detection of calcium sensibility of the activity, EDTA was added to the 2x assay buffer to final concentrations of 5 mM (free calcium: 5 μ M) and 1.5 mM (free calcium: 65 μ M). Calculation of free calcium was performed by WEBMAXC v. 2.1 (Stanford, USA).

1.5 Pull-down assay

10

After purification of CNA α 16K, a buffer exchange by ultrafiltration was performed to get rid of imidazole. For the assay, 50 μ g of CNA α 16K in buffer A (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, pH8.0) were incubated with 50 μ l of Ni-NTA magnetic beads (Qiagen, Hilden, Germany) and 300 μ l of buffer A with or without the addition of 10 μ g of purified bovine brain Calcineurin (Sigma Aldrich, Deisenhofen, Germany) or 100 μ l murine brain homogenate for 16 h at 4 °C. Corresponding eluate fractions from bacteria were transformed with pQE30 alone and treated exactly the same as the CNA α 16K served as control for the CNA α 16K.

20

After binding, the beads were washed 2 times for 30 minutes with 500 μ l of buffer A at constant shaking (1000 rpm, 4 °C) and elution was performed with 100 μ l of buffer C buffer (50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 500mM imidazole, pH8.0). The calcineurin was detected by western blotting.

25

1.6 Calcineurin AB cloning

30 Cloning of calcineurin splice variant CNA β K16 (Seq.-ID. No. 7, Fig. 1, Fig. 4) into eucaryotic expression vector:

WO 03/012093

PCT/EP02/08506

- 18 -

CNABK16 calcineurin splice variant was amplified from procaryotic expression vector pQE30K16 using the following primers:

5 16kfw1: ggg gac aag ttt gta caa aaa agc agg ctt aga agg aga tag aac cat
gag agg atc gca tca cca tca cca tca cgg a (for histidine-tagged variant)

or

10 16kfw2: ggg gac aag ttt gta caa aaa agc agg ctt aga agg aga tag aac c –
ATG GCC GCC CCG GAG CCG GCC CGG GCT GCA (without
histidine-tag)

and, in both cases

15 16krev: ggg gac cac ttt gta caa gaa agc tgg gtc cta tca ctg aat att gct gct
att act.

The amplicons were inserted into the eucaryotic expression vector
20 pDEST 12.2 by recombination according to the manufacturers
recommendations. The resulting clones were sequenced and named
pEXP12-K101 for the His-tagged and pEXP12-K105 or the non-tagged
form.

25 1.7 Apoptose Assay

TNF induced apoptosis in Hela cells (Cervix Carcinoma) was used as a
model for apoptosis in cancer cells, but which is in principle also
important in nerve cells, immune cells, heart muscle cells and other
30 tissues [Cell 1996 Nov. 1; 87 (3): 565-76, Dissection of TNF receptor 1
effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-
kappaB activation prevents cell death. Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV,

WO 03/012093

PCT/EP02/08506

- 19 -

Karin M.J. HeLa cells were transfected with either CNA β 16K containing plasmids (pEXP12-K101 or pEXP12-K105) or as a control with an empty pCDNA3 vector or no plasmid at all. Cell apoptosis was induced by TNF (10 ng/ml, 48 h post transfection). In every case cells were cotransfected with an CMV- β -plasmid expressing LacZ. Therefore, cell survival can be tested by counting LacZ positive (blue) cells. Reduction of LacZ positive cell, tested by X-Gal staining 24 h post-transfection, indicates cell death by apoptosis.

10 1.8 Protein extracts

Frozen spinal cord tissues were transferred into 2x homogenization buffer (500 mM Sucrose, 4mM EDTA, 0.02 % β -mercaptoethanol; 500 μ l/100 mg tissue). For protection against proteases 1/10 vol PMSF (10 mg/ml) and Leupeptin (1 mg/ml) were added respectively. Finally the volume was equilibrated to 1000 μ l/100 mg tissue with distilled water. The tissues were homogenized with a glass homogenizer in this solution and then transferred into cups. These cups were centrifuged for 3 hours at 4 °C and 14,000 x g to separate soluble from particle (non-soluble) containing fractions. The soluble fraction was filled in a new cup after centrifugation. The particle containing cup was filled up with an adequate volume of 2x homogenization buffer. Protein content of both fractions was determined by the BioRad protein assay reagent, with bovine serum albumin as the standard.

25

2. Results

2.1 Characterization and structure of a cDNA for a novel Calcineurin A α splice variant

30 Calcineurin A α splice variants were amplified by a nested PCR from human spinal cord poly-A⁺-RNA (Clontech, Palo Alto, USA). A strong

WO 03/012093

PCT/EP02/08506

- 20 -

band at 1.6 kb indicated the transcripts for the Calcineurin A α splice variants. Cloning and sequencing indeed revealed that the 1.6 kb band consisted of two splice variants, differing by 30 base pairs by alternative splicing of exon 13. In addition, a smaller band was obtained at about 5 450 bp that was subsequently isolated and cloned (fig. 7). Sequencing revealed that this amplicon encompassed an open reading frame of 438 base pairs which showed 100% identity to the coding base pairs 1-57 and 1158-1533 of Calcineurin A α , thereby representing the exons 1, 11, 12, 13 and 14 of the Calcineurin A α gene (fig. 3). The cDNA, which was 10 named CNA α 16K, codes for a protein of 145 amino acids with a calculated molecular weight of 15,522 dalton, that contains part of the N-terminal domain and the calmodulin-binding domain as well as the autoinhibitory domain. Catalytic and Calcineurin B-binding domain from standard Calcineurin A α missed completely (fig.8). In addition 15 bioinformatic analysis shows a weak similarity to cystein proteases.

To determine whether this cDNA represents a cloning artefact or whether it is a novel Calcineurin A α splice variant that is transcribed into protein, western blot analysis on purified, commercially available bovine 20 Calcineurin (Sigma Aldrich, Deisenhofen, Germany) were performed. Although a smaller immunoreactive band was visible in the range of 35 kD with an anti-Calcineurin A antibody, immunoreactivity in the range of 16 kD was not detectable. In view of the fact that Calcineurin activity is protected by superoxide dismutase and also copurifies with this enzyme, 25 a pull-down assay with purified Calcineurin and human recombinant superoxide dismutase (SOD) as binding partner was performed and the interacting proteins were analysed by western blotting. As can be seen in fig. 9, without SOD as binding partner only the standard Calcineurin and the already seen 35 kD band was detectable (lane 1), whereas in 30 the assay with SOD as binding partner, an additional band at about 16 kD was detectable (fig. 9, lane 2). No Calcineurin immunoreactivity could

WO 03/012093

PCT/EP02/08506

- 21 -

be seen in the human recombinant SOD alone (lane 3). Obviously, CNA α 16K was enriched through an affinity to human recombinant SOD.

5 However, when using an antibody directed against the N-terminal part of Calcineurin A α , a smaller band at about 16 kD could be detected directly in the cytosolic fraction of spinal cord extracts of mice in addition to the 59 kD standard variant (fig. 9, lane 4), whereas no 16 kD band was observable in the pellet fraction (fig. 9, lane 5).

10 In addition, when using an antibody directed against the N-terminal part of Calcineurin A β , immunoreactivity in the range of 16 kD was easily detectable in both cytosolic and pellet fractions of protein extracts from spinal cord of mice (fig. 9, lanes 6-9). Interestingly, expression of this short splice variant was considerably stronger in mice transgenic for
15 mutated human superoxide dismutase developing a phenotype closely resembling human amyotrophic lateral sclerosis (fig. 9, lane 8 and 9), suggesting a role of the splice variant in motor neuron diseases.

2.2 Recombinant expression, purification and biochemical 20 analysis of Calcineurin A α 16K

To analyse the new Calcineurin splice variant biochemically, the cDNA was cloned into the pQE30 expression vector, resulting in a hypothetical protein of 158 amino acids and a calculated molecular weight of
25 16,921.13 Da, with an N-terminal HIS-tag for quick purification from bacterial lysates. Induction with IPTG and purification with Ni-NTA agarose indeed yielded a protein of 17 kDa. Expression efficiency was low, from a 500 ml culture about 600 μ g of Calcineurin A α 16K protein was yielded. Western-blotting of affinity column eluates revealed positive
30 immunoreactivity with the anti-Calcineurin A antibody.

As expected by the lack of the catalytic domain, CNA α 16K exhibited no phosphatase activity in a Calcineurin activity assay using phospho-R11 peptide as a substrate. Secondly, the influence of CNA α 16K on CN A activity was investigated by incubating purified bovine Calcineurin 5 (Sigma, Deisenhofen) with and without CNA α 16K. As a control, bacteria were transformed with pQE30, induced, harvested and the purification process was repeated exactly as in the case of the Calcineurin A α 16K. Comparable elution fractions served as controls for the CNA α 16K. As seen in fig. 10, addition of purified CNA α 16K to purified Calcineurin 10 holoenzyme stimulated the dephosphorylation of R11 peptide when compared to addition of control eluate. In comparison to addition of control eluate (100%), the phosphatase activity of Calcineurin increased to 118.5% (65 μ M free Ca) and 119.6% (5 μ M free Ca). Interestingly, this effect could only be seen in low calcium concentrations (fig. 10). In 15 calcium concentrations under standard assay conditions, usually in the range of 1 mM, no significant effect could be detected, indicating that activation of phosphatase activity by CNA α 16K is essentially restricted to low but physiological relevant calcium concentrations.

20 A preincubation of Calcineurin with CNA α 16K for 30 minutes before adding the substrate increased the activating effect of CNA α 16K (126 % of control activity) compared with direct addition of CNA α 16K to Calcineurin immediately before measurement (106 % compared to control activity, fig. 11).

25 A pull down assay with CNA α 16K as binding protein was performed, to verify if there is a direct interaction in vitro between CNA α 16K and purified Calcineurin. In this assay, CNA α 16K was bound to magnetic Ni-NTA beads and incubated with purified bovine Calcineurin as well as 30 murine spinal cord eluates. Again, the corresponding eluates from pQE30-transformed and Ni-NTA agarose purified bacteria served as

controls. As seen in fig. 12, strong binding of Calcineurin to immobilized histidine-tagged CNA α 16K could be seen either using purified bovine brain Calcineurin or murine spinal cord homogenate (fig. 12, lanes 3 and 4). In contrast, no detectable binding was seen where the control eluate
5 was used (fig. 12, lanes 2 and 5).

2.3 Expression and functional characterisation of Calcineurin AB16K

- 10 In addition to the results obtained for calcineurin A α 16K, also the CNA splice variant of calcineurin AB16K was expressed and characterised. At the beginning, the cDNA of that splice variant was cloned as described under point 1.7 in material and methods.
- 15 After the cloning of CNA β 16K, apoptose assays were performed as described under point 1.8 in materials and methods. The results of said assays are illustrated in Tab. 1 and the accompanying diagram 1.

Summary: All cells transfected with neuron specific CNA β K16 are more sensitive to TNF induced apoptosis. As a result CNA β 16K is an important regulator of neuronal apoptosis, since it is neuron specific. In
5 general, CNA16Ks (either β , γ , α) are important in apoptosis, in particular in cancer, brain, heart, immune system. Such influence on TNF is even given without Calcineurin modulation, i.e. is possibly independent from its catalytic activity.

10 As can be shown by the above Tab. 1, all cells transfected with neuron specific CNA β 16K are more sensitive to TNF induced apoptosis. As a result, CNA β 16K is an important regulator of neuronal apoptosis, since it is neuron specific. In general, the CNAs (either α β or γ) are important in
15 apoptosis, in particular cancer, brain, heart and immune system, since calcineurin and therefore the regulators are involved in regulation of cell-cyclus and immune system [Rusnak F (2000), Physiological reviews 80, 1483-1521], and in cancer, as is illustrated by the results with the HeLa cancer cells.

20

WO 03/012093

PCT/EP02/08506

- 26 -

Claims

- 5 1. Regulator of Calcineurin, characterized in that it is based on a splice variant of the catalytic subunit of Calcineurin.
- 10 2. Regulator of Calcineurin according to claim 1, characterized in that the catalytic subunit is the β -form, γ -form and/or α -form of said subunit.
- 15 3. Regulator of Calcineurin according to claim 1 or claim 2, characterized by an amino acid sequence at least 70 % identical to an amino acid sequence according to figure 4 (SEQ ID NO 7, 8), figure 5 (SEQ ID NO 9, 10) and/or figure 6 (SEQ ID NO 11, 12).
- 20 4. Regulator of Calcineurin according to one of the preceding claims, characterized in that it is coded by a nucleotide sequence at least 70 % identical to a nucleotide sequence according to figure 1 (SEQ ID NO 1, 2), figure 2 (SEQ ID NO 3, 4) and/or figure 3 (SEQ ID NO 5, 6).
- 25 5. Nucleotide sequence, characterized in that it is at least 70 % identical to a nucleotide sequence according to figure 1 (SEQ ID NO 1, 2) and/or figure 2 (SEQ ID NO 3, 4).
- 30 6. Nucleotide sequence according to claim 5, characterized in that it codes for a regulator of Calcineurin.
7. Amino acid sequence, characterized in that it is at least 70 % identical to an amino acid sequence according to figure 4 (SEQ ID NO 7, 8) and/or figure 5 (SEQ ID NO 9, 10).

WO 03/012093

PCT/EP02/08506

- 27 -

8. Amino acid sequence according to claim 7, characterized in that it forms a regulator for Calcineurin.
- 5 9. Active agent especially for the treatment of diseases, characterized in that the active agent is a regulator according to one of claims 1 to 4.
- 10 10. Active agent especially for the treatment of diseases, characterized in that the active agent influences a regulator according to one of claims 1 to 4.
- 10 11. Active agent according to claim 10, characterized in that the active agent increases the activity of said regulator.
- 15 12. Active agent according to claim 10, characterized in that the active agent reduces the activity of said regulator.
- 20 13. Active agent according to one of claims 9 to 12, characterized in that said diseases are connected with a disturbance of Calcineurin activity, wherein preferably said diseases are neurodegenerative diseases, cardiovascular diseases, immunological diseases, inflammation diseases and/or cancer.
- 25 14. Use of an active agent according to one of claims 9 to 13 for the treatment of diseases.
15. Method for the treatment of diseases, characterized in that at least one active agent according to one of claims 9 to 13 is administered.
- 30 16. Pharmaceutical composition, characterized in that it comprises at least one active agent according to one of claims 9 to 13 in an effective amount and at least one pharmaceutical carrier.

WO 03/012093

PCT/EP02/08506

- 28 -

17. Use of a regulator of Calcineurin for diagnosis of diseases, characterized in that the frequency of said regulator is analysed, wherein preferably at least one substance is used, which interacts with the regulator.
- 5
18. Use according to claim 17, characterized in that said regulator is a regulator according to one of claims 1 to 4.
19. Use according to claim 17 or claim 18, characterized in that said interacting substance is an antibody against the regulator.
- 10
20. Use according to one of claims 17 to 19, characterized in that said interacting substance is a nucleic acid molecule, which hybridizes with at least a portion of a nucleic acid sequence coding for the regulator.
- 15
21. Use according to one of claims 17 to 20, characterized in that said diseases are connected with a disturbance of Calcineurin activity, wherein preferably said diseases are neurodegenerative diseases, cardiovascular diseases, immunological diseases, inflammation diseases and/or cancer
- 20
22. Kit for diagnosis of diseases, comprising at least one substance, which interacts with a regulator according to one of claims 1 to 4.
- 25
23. Method for searching substances influencing the activity of Calcineurin, characterized in that a splice variant of the catalytic subunit of Calcineurin is used to identify and/or isolate substances interacting with the splice variant and/or Calcineurin.
- 30
24. Method according to claim 23, characterized in that the splice variant is a regulator according to one of claims 1 to 4.

WO 03/012093

PCT/EP02/08506

- 29 -

25. Active agent for the treatment of diseases, characterized in that the active agent is identified and/or isolated by a method according to claim 23 or claim 24.

5

10

- - - - -

WO 03/012093

1/12

PCT/EP02/08506

1 ATGGCCGCC CGGAGCCGGC CCGGGCTGCA CCGCCCCCAC CCCCSCCCC GCCGCCCCCT
61 CCGGGGCTG ACGCGTGGT CAAAGGTTCA GTTGGAGCCC GGAAGAAT CATAAGAAAC
121 AAAATTCGAG CAATTGGCAA GATGGCAAG GTTCTCTG TTCTCAGGGA GGAGATGAA
181 AGTGTCTGA CACTCAAGG CCTGCTCC ACAGGGATGT TCCCTAGTGG AGTGTAGCT
241 GGAGGACGC AGACCTTGA AGTGCACCA GTTGGGCTA CCGAGGCTGA AAAGCAATA
301 CGAGGATTC CTCCACCA TAGAATCTG AATTTGAAG AGCAAGGG TTGGATAGG
361 ATCAATGCA GAATGCCAC TCGAACAGT GTGTACAGC AAGATGTTT CAATTCCTG
421 AACACGGCAC ATGCCACTGA GAACCAACGG ACCGGCAACC ATACTGCCCA GTGA

//

Fig. 1

WO 03/012093

2/12

PCT/EP02/08506

```
1  ATGTCGGGA  GGCGTTCCA  CCTCTCCAC  ACGACCGGG  TCATCAAAG  AGCACTACA
61  GTTCGTRAG  AGATCAATCG  GATPAGATC  AGAGCCATG  GSHAGATGG  ACGGTCFTT
121  TCAATTTTC  GCGAAGAAAG  TGAGATGTG  CTGACTCTCA  AGGGCTGAC  TCCCACAGG
181  ACACTCCCT  TGGCTCCT  CTCAGAGGC  AAGCAGACTA  TCGACACAG  CacaLagaa
241  gcgslaggg  ccgggagc  cATCAGAGG  TTCTCGCTT  AGCACAGAT  CCGAGTTTT
301  GACGAGCG  GAGTCTGGA  CCGAATTA  GAGGAAATG  CACCCGAAA  GGATAGCATA
361  TACCTGGTG  GGCATGGA  ATCTGTRAC  TCAGCACACT  CACATGCTG  GCACAGGAG
421  GACCAAGGA  AGAAGCCCA  TTCATGA
```

//

Fig. 2

1 ATGTCCGAGC CCRAGGCAT TGTCCCAAG TTGTCCGACG CCGACAGGGT GGTGAAGGI
61 GCAACAGCTG CAGCCCGAA AGAGCGGATA AGGAACAAGA TCCGAGCAAT AGGCCAAATG
121 GCCAGATGT TCTCAGTGT CAGAGAGAG AGTGAGCTG TGCTGACGCT GAAGGCTTG
181 ACCCCACTG GCAATGCTCC CAGCGAGTA CTCTCTGGAG GGAGCAAAC CCTGCRAAGC
241 GCTactgltg aggtatgga gctatcaaaG GATTTICACC ACAACATAAG
301 ATCATTAGT TCGAGGAAGC CAAGGGCTTA GACCGAATTA ATGAGAGGAT GCCGCTCGC
361 AGAGATGCA TGCCCTCTGA CGCCAACTT AACTCCATCA ACAAGGCTCT CACCTCAGAG
421 ACTAACGGCA CGGACAGCNA TGGCAGTAAT AGCAGCAATA TTCAGTGA

//

Fig. 3

/translation="MAAPEPARAAPPFFFFFFGGADRVVKGSAARKEIIRNKIRA
IGKWARVSVLRESESVLLKGLTPTGMLFSGVLAGGROTLQSATVEAIEAEKAIKRG
FSPPHRICSPFEAKGLDRINERWPRKDAVQDGGFNSLNTAHATENHGTGHTAQ."

Fig. 4

/translation="MSGRRPHLSTDRVIKGGTTVRKEIIRNKIRAIKGMARVFSILR
QEESVLTILKGLTPGTLPLVLSGGKQIETATVEAVEARBAIRGFSLOHKIRSFEE
AKGLDRINERMPFRKDSIYGGPMSVTSAMSHAAHRSQGGKKAHS."

Fig. 5

/translation="MSRFAIDPKLSITDRVVKGATRAAKKEAIRNKIRAIKGMARVF
SVLRESESVTLKGLTPTGMLPSGLVSGKQTLQSAIVAEALAEADAIKGFSPQHKIT
SFEAKGLDRINERMPRRDAPFSDANLNSINKALITSETNGTDSNGSNSNIQ."

Fig. 6

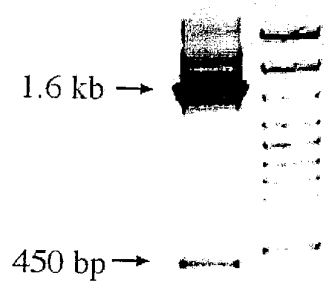


Fig. 7

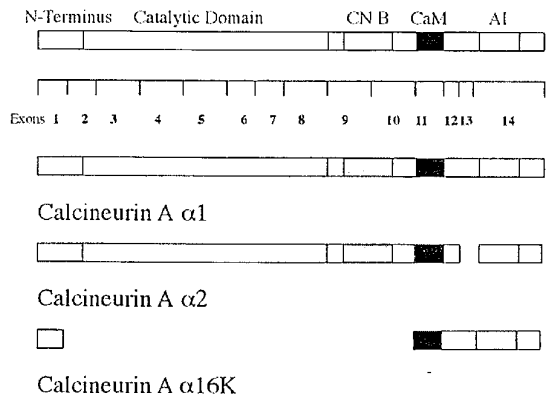


Fig. 8

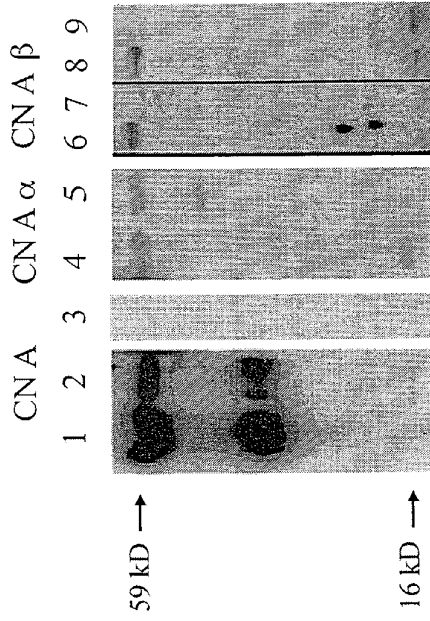


Fig. 9

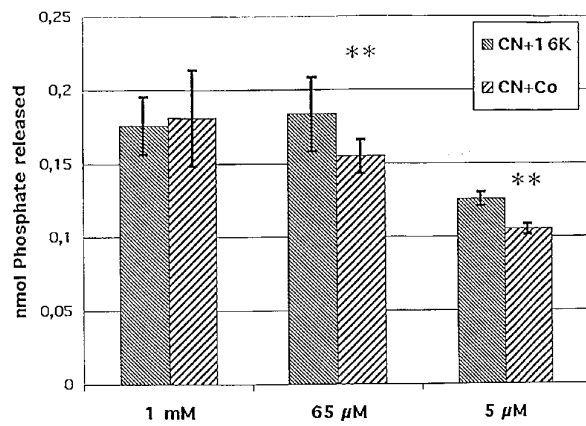


Fig. 10

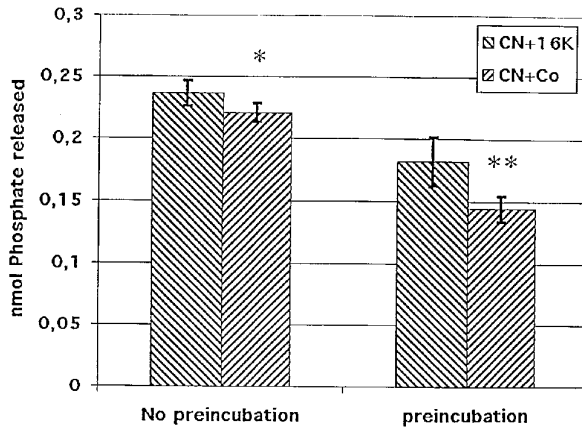


Fig. 11

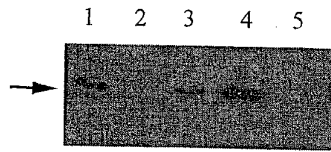


Fig. 12

WO 03/012093

1/11

PCT/EP02/08506

SEQUENCE LISTING

<110> GENOPIA Biomedical GmbH

<120> Regulator of Calcineurin

<130> P 41 239 W0

<160> 16

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 474

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> CNA beta splice variant (a)

```

<400> 1
atggcgcgcc cggagccggc ccgggctgca cgccecccac ccccgccecc gccgccccct    60
cccggggctg accgogtctt caaaggttca gotgcagccc ggaagaaat cataagaac    120
aaaattcgag caattggcaa gatggcaaga gtcttctctg ttctcagggg ggagagtga    180
agtggtctga cactcaaggg cctgactccc acagggatgt tgcctagtgg agtgttagct    240
ggaggacggc agaccctgca aagtgccaca gttgaggcta ttgaggctga aaaagcaata    300
cgaggattct ctccaccaca tagaatctgc agttttgaag aggcaaaggg ttgggatagg    360
atcaatgaga gaatgccacc tcggaagat getgtacagc aagatggttt caattctctg    420
aacaccgcac atgccactga gaaccaaggg acgggcaacc atactgccca gtga        474

```

<210> 2

WO 03/012093
2/11
PCT/EP02/08506

<211> 444
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> CNA beta splice variant (b)

<400> 2
atggccgccc cggagccggc cgggctgca cegcccccaac ccccgcccc gccgcccct 60
ccggggctg accgctcgt caaaggttca gctgcagccc gaaagaaat cataagaaac 120
aaaattcgag caattggcaa gatggcaaga gtcttctctg ttctcagga ggagagtga 180
agtgtgctga cactcaaggg cctgaactcc acaggatgt tgcctagtgg agtgtagct 240
ggaggacggc agacctgca aagtgcata cgaggattct ctcccacaca tagaatctgc 300
agttttgaag aggcaaaggg ttggatagg atcaatgaga gaatgccacc tcggaagat 360
gctgtacagc aagatggttt caattctctg aacaccgcaac atgccactga gaaccacggg 420
acgggcaacc atactgccca gtga 444

<210> 3
<211> 447
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> CNA gamma splice variant (a)

<400> 3
atgtccggga ggcgcttcca cctctccacc accgaccgag tcatcaaagg aagcaetaca 60
gttcgtaagg agatcatcag gaataagatc agagccattg ggaagatggc accggctctt 120
tcaattcttc ggcaagaag tgagagtgtg ctgactctca agggcctgac tcccacaggg 180
acactccctc tggcgctcct ctccaggaggc aagcagacta tcgagacagc cacagttaga 240
gcggtagagg cccgggaagc catcagaggg ttctcgcttc agcacaagat ccggagtttt 300

WO 03/012093 3/11 PCT/EP02/08506

gaagaagcgc gaggtctgga ccgaattaat gagcgaatgc caccocgaaa ggatagcata 360
taccctggtg ggccaatgaa atctgtaacc tcagcacact cacatgctgc gcacaggagc 420
gaccaaggga agaaagccca ttcatga 447

<210> 4
<211> 417
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> CNA gamma splice variant (b)

<400> 4
atgtccggga ggcgcttcca cctctccacc accgaccgag tcacaaagg aagcactaca 60
gttcgtaagg agatcatcag gaataagatc agagccattg ggaagatggc acgggtcttt 120
tcaattcttc ggcagaagag tgagagtgtg ctgactctca agggcctgac tcccacagggc 180
acaactccctc tgggctcctc ctcaggaggc aagcagacta tcgagacagc catcagaggg 240
ttctcgcttc agcacaagat ccggagtttt gaagaagcgc gaggtctgga ccgaattaat 300
gagcgaatgc caccocgaaa ggatagcata taccctggtg ggccaatgaa atctgtaacc 360
tcagcacact cacatgctgc gcacaggagc gaccaaggga agaaagccca ttcatga 417

<210> 5
<211> 468
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<223> CNA alpha splice variant (a)

<400> 5
atgtccgagc ccaaggcaat tgatcccaag ttgtcgacga ccgacagggt ggtgaaaagt 60
gcaacagctg cagccccgaa agaggcgata aggaacaaga tccgagcaat aggcaaaatg 120

WO 03/012093

4/11

PCT/EP02/08506

```

gccagagtgt tctcagtgt cagagaagag agtgagagtg tgctgacgct gaaaggcttg 180
acccaactg gcatgctccc cagcggagta ctctctggag ggaagcaaac cctgcaaagc 240
gctaactgtg aggtatttga ggctgatgaa getatcaaag gattttcacc acaacataag 300
atcaactgct tcgaggaagc caagggttta gaccgaatta atgagaggat gccgcctcgc 360
agagatgcca tgccctctga cgccaacctt aactccatca acaaggctct cacctcagag 420
actaacggca cggacagcaa tggcagtaat agcagcaata ttcagtga 468

```

<210> 6

<211> 438

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<223> CNA alpha splice variant (b)

```

<400> 6
atgtccgagc ccaaggcaat tgatccaag ttgtcgacga cgcacagggt ggtgaaaggt 60
gcaacagctg cagcccgaa agaggcgata aggaacaaga tccgagcaat aggcaaaatg 120
gccagagtgt tctcagtgt cagagaagag agtgagagtg tgctgacgct gaaaggcttg 180
acccaactg gcatgctccc cagcggagta ctctctggag ggaagcaaac cctgcaaagc 240
getatcaaag gattttcacc acaacataag atcaactgct tcgaggaagc caagggttta 300
gaccgaatta atgagaggat gccgcctcgc agagatgcca tgccctctga cgccaacctt 360
aactccatca acaaggctct cacctcagag actaacggca cggacagcaa tggcagtaat 420
agcagcaata ttcagtga 438

```

<210> 7

<211> 157

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

WO 03/012093

5/11

PCT/EP02/08506

<221> MISC_FEATURE

<223> CNA beta splice variant (a)

<400> 7

Met Ala Ala Pro Glu Pro Ala Arg Ala Ala Pro Pro Pro Pro Pro Pro
 1 5 10 15

Pro Pro Pro Pro Pro Gly Ala Asp Arg Val Val Lys Gly Ser Ala Ala
 20 25 30

Ala Arg Lys Glu Ile Ile Arg Asn Lys Ile Arg Ala Ile Gly Lys Met
 35 40 45

Ala Arg Val Phe Ser Val Leu Arg Glu Glu Ser Glu Ser Val Leu Thr
 50 55 60

Leu Lys Gly Leu Thr Pro Thr Gly Met Leu Pro Ser Gly Val Leu Ala
 65 70 75 80

Gly Gly Arg Gln Thr Leu Gln Ser Ala Thr Val Glu Ala Ile Glu Ala
 85 90 95

Glu Lys Ala Ile Arg Gly Phe Ser Pro Pro His Arg Ile Cys Ser Phe
 100 105 110

Glu Glu Ala Lys Gly Leu Asp Arg Ile Asn Glu Arg Met Pro Pro Arg
 115 120 125

Lys Asp Ala Val Gln Gln Asp Gly Phe Asn Ser Leu Asn Thr Ala His
 130 135 140

Ala Thr Glu Asn His Gly Thr Gly Asn His Thr Ala Gln
 145 150 155

<210> 8

<211> 147

<212> FRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> CNA beta splice variant (b)

WO 03/012093

6/11

PCT/EP02/08506

<400> 8

Met Ala Ala Pro Glu Pro Ala Arg Ala Ala Pro Pro Pro Pro Pro Pro
 1 5 10 15

Pro Pro Pro Pro Pro Gly Ala Asp Arg Val Val Lys Gly Ser Ala Ala
 20 25 30

Ala Arg Lys Glu Ile Ile Arg Asn Lys Ile Arg Ala Ile Gly Lys Met
 35 40 45

Ala Arg Val Phe Ser Val Leu Arg Glu Glu Ser Glu Ser Val Leu Thr
 50 55 60

Leu Lys Gly Leu Thr Pro Thr Gly Met Leu Pro Ser Gly Val Leu Ala
 65 70 75 80

Gly Gly Arg Gln Thr Leu Gln Ser Ala Ile Arg Gly Phe Ser Pro Pro
 85 90 95

His Arg Ile Cys Ser Phe Glu Glu Ala Lys Gly Leu Asp Arg Ile Asn
 100 105 110

Glu Arg Met Pro Pro Arg Lys Asp Ala Val Gln Gln Asp Gly Phe Asn
 115 120 125

Ser Leu Asn Thr Ala His Ala Thr Glu Asn His Gly Thr Gly Asn His
 130 135 140

Thr Ala Gln
 145

<210> 9

<211> 148

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> CNA gamma splice variant (a)

WO 03/012093

7/11

PCT/EP02/08506

<400> 9

Met Ser Gly Arg Arg Phe His Leu Ser Thr Thr Asp Arg Val Ile Lys
1 5 10 15Gly Ser Thr Thr Val Arg Lys Glu Ile Ile Arg Asn Lys Ile Arg Ala
20 25 30Ile Gly Lys Met Ala Arg Val Phe Ser Ile Leu Arg Gln Glu Ser Glu
35 40 45Ser Val Leu Thr Leu Lys Gly Leu Thr Pro Thr Gly Thr Leu Pro Leu
50 55 60Gly Val Leu Ser Gly Gly Lys Gln Thr Ile Glu Thr Ala Thr Val Glu
65 70 75 80Ala Val Glu Ala Arg Glu Ala Ile Arg Gly Phe Ser Leu Gln His Lys
85 90 95Ile Arg Ser Phe Glu Glu Ala Arg Gly Leu Asp Arg Ile Asn Glu Arg
100 105 110Met Pro Pro Arg Lys Asp Ser Ile Tyr Pro Gly Gly Pro Met Lys Ser
115 120 125Val Thr Ser Ala His Ser His Ala Ala His Arg Ser Asp Gln Gly Lys
130 135 140Lys Ala His Ser
145

<210> 10

<211> 138

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> CNA gamma splice variant (b)

<400> 10

Met Ser Gly Arg Arg Phe His Leu Ser Thr Thr Asp Arg Val Ile Lys

WO 03/012093 8/11 PCT/EP02/08506

1 5 10 15

Gly Ser Thr Thr Val Arg Lys Glu Ile Ile Arg Asn Lys Ile Arg Ala
20 25 30

Ile Gly Lys Met Ala Arg Val Phe Ser Ile Leu Arg Gln Glu Ser Glu
35 40 45

Ser Val Leu Thr Leu Lys Gly Leu Thr Pro Thr Gly Thr Leu Pro Leu
50 55 60

Gly Val Leu Ser Gly Gly Lys Gln Thr Ile Glu Thr Ala Ile Arg Gly
65 70 75 80

Phe Ser Leu Gln His Lys Ile Arg Ser Phe Glu Glu Ala Arg Gly Leu
85 90 95

Asp Arg Ile Asn Glu Arg Met Pro Pro Arg Lys Asp Ser Ile Tyr Pro
100 105 110

Gly Gly Pro Met Lys Ser Val Thr Ser Ala His Ser His Ala Ala His
115 120 125

Arg Ser Asp Gln Gly Lys Lys Ala His Ser
130 135

<210> 11
<211> 155
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> CNA alpha splice variant (a)

<400> 11
Met Ser Glu Pro Lys Ala Ile Asp Pro Lys Leu Ser Thr Thr Asp Arg
1 5 10 15
Val Val Lys Gly Ala Thr Ala Ala Ala Arg Lys Glu Ala Ile Arg Asn
20 25 30

WO 03/012093

PCT/EP02/08506

9/11

Lys Ile Arg Ala Ile Gly Lys Met Ala Arg Val Phe Ser Val Leu Arg
 35 40 45
 Glu Glu Ser Glu Ser Val Leu Thr Leu Lys Gly Leu Thr Pro Thr Gly
 50 55 60
 Met Leu Pro Ser Gly Val Leu Ser Gly Gly Lys Gln Thr Leu Gln Ser
 65 70 75 80
 Ala Thr Val Glu Ala Ile Glu Ala Asp Glu Ala Ile Lys Gly Phe Ser
 85 90 95
 Pro Gln His Lys Ile Thr Ser Phe Glu Glu Ala Lys Gly Leu Asp Arg
 100 105 110
 Ile Asn Glu Arg Met Pro Pro Arg Arg Asp Ala Met Pro Ser Asp Ala
 115 120 125
 Asn Leu Asn Ser Ile Asn Lys Ala Leu Thr Ser Glu Thr Asn Gly Thr
 130 135 140
 Asp Ser Asn Gly Ser Asn Ser Ser Asn Ile Gln
 145 150 155
 <210> 12
 <211> 145
 <212> FRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> CNA alpha splice variant (b)
 <400> 12
 Met Ser Glu Pro Lys Ala Ile Asp Pro Lys Leu Ser Thr Thr Asp Arg
 1 5 10 15
 Val Val Lys Gly Ala Thr Ala Ala Ala Arg Lys Glu Ala Ile Arg Asn
 20 25 30
 Lys Ile Arg Ala Ile Gly Lys Met Ala Arg Val Phe Ser Val Leu Arg
 35 40 45

WO 03/012093

10/11

PCT/EP02/08506

Glu Glu Ser Glu Ser Val Leu Thr Leu Lys Gly Leu Thr Pro Thr Gly
50 55 60

Met Leu Pro Ser Gly Val Leu Ser Gly Gly Lys Gln Thr Leu Gln Ser
65 70 75 80

Ala Ile Lys Gly Phe Ser Pro Gln His Lys Ile Thr Ser Phe Glu Glu
85 90 95

Ala Lys Gly Leu Asp Arg Ile Asn Glu Arg Met Pro Pro Arg Arg Asp
100 105 110

Ala Met Pro Ser Asp Ala Asn Leu Asn Ser Ile Asn Lys Ala Leu Thr
115 120 125

Ser Glu Thr Asn Gly Thr Asp Ser Asn Gly Ser Asn Ser Ser Asn Ile
130 135 140

Gln
145

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<223> Primer for Calcineurin CNA-s1

<400> 13
atctgctoag acgatgaact rgg

23

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

WO 03/012093

11/11

PCT/EP02/08506

<221> misc_feature

<223> Primer for Calcineurin CNA-as1

<400> 14
ggcatcctct cgtaattcg g

21

<210> 15

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<223> Primer for Calcineurin CNA-s2

<400> 15
catgcatgg atccatgtcc gagccaagg c

31

<210> 16

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> misc_feature

<223> Primer for Calcineurin CNA-as4

<400> 16
tccccccggg gtaccctagt taactactga atattgtgc tattac

46

【 国際公開パンフレット (コレクトバージョン) 】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
13 February 2003 (13.02.2003)

PCT

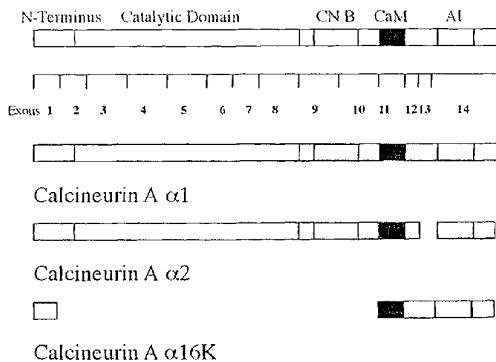
(10) International Publication Number
WO 03/012093 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 9/16, A61K 38/00, G01N 33/573, C12Q 1/68
- (21) International Application Number: PCT/JP02/08506
- (22) International Filing Date: 31 July 2002 (31.07.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 01118401.7 31 July 2001 (31.07.2001) EP
- (71) Applicant (for all designated States except US): GENOPIA BIOMEDICAL GMBH [DE/DE]; Stuhlsatzenhauweg 69, 66123 Saarbrücken (DE).
- (72) Inventor; and
- (75) Inventor/Applicant (for US only): VÖLKEL, Helge [DE/DE]; Lohrerstrasse 18/1, 89081 Ulm (DE).
- (74) Agent: MÜTSCHLE, Thomas; Ruff, Wilhelm, Beier, Dauster & Partner, Zusammenschluss nr. 16, Kronenstrasse 30, 70174 Stuttgart (DE).
- (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, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LI, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published: with international search report — before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

[Continued on next page]

(54) Title: REGULATOR OF CALCINEURIN



(57) Abstract: A regulator of Calcineurin is provided, which is based on a splice variant of the catalytic subunit of Calcineurin. Preferably the catalytic subunit is the β-form, γ-form and/or α-form of this subunit. The invention comprises the regulator and a substance, which influences the stimulating activity of the regulator, as active agents for the treatment of diseases, which are preferably connected with a disturbance of Calcineurin activity.



WO 03/012093 A3

WO 03/012093 A3 

(88) Date of publication of the international search report:
20 November 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.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/08506
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N9/16 A61K38/00 G01N33/573 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N		
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) EPC-Internal; CHEM ABS Data, MEDLINE, BIOSIS, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 05363 A (VOELKEL HELGE) 3 February 2000 (2000-02-03) Seq. Id. No. 4, 6, 7, 10, 12, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 26, 27, 30, 32, 33	1-25
X	WO 96 16172 A (ICOS CORP.; OREGON STATE (US)) 30 May 1996 (1996-05-30) Seq. ID. No. 6, 7	1-25
X	WO 01 32927 A (INCYTE GENOMICS INC ; SEILHAMER JEFFREY J (US); WATSON GEORGE A (US)) 10 May 2001 (2001-05-10) Seq. Id. No. 247, 410, 379	1-25
	-/--	
<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 *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim 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 after than the priority date claimed		** Inter document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle 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 ** document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *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	
10 July 2003	03. 10. 03	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2340, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-2016	Authorized officer Meyer, W.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 02/08506

C:(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FERRINO BRIAN A: "Regulation of calcineurin phosphatase activity by its autoinhibitory domain" ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, NEW YORK, US, US, vol. 372, no. 1, 1 December 1999 (1999-12-01), pages 159-165, XP002162576 ISSN: 0003-9861 abstract; figure 1B	1-25
X	CLIPSTONE N A ET AL: "MOLECULAR ANALYSIS OF THE INTERACTION OF CALCINEURIN WITH DRUG-IMMUNOPHILIN COMPLEXES" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 269, no. 42, 21 October 1994 (1994-10-21), pages 26431-26437, XP000882791 ISSN: 0021-9258 abstract; figure 7	1-25
A	RUSNAK, FRANK ET AL: "Calcineurin: form and function" PHYSIOL. REV. (2000), 80(4), 1483-1521, 2000, XP002182662 cited in the application Fig. 1 the whole document	
A	NACIFF J M ET AL: "Targeted neutralization of calcineurin, by expression of an inhibitor peptide under the control of a cholinergic specific promoter in PC12 cells, promotes neurite outgrowth in the presence of NGF." METABOLIC BRAIN DISEASE, (2000 MAR) 15 (1) 65-81, XP001029754 the whole document	

Form PCT/ISA/210 (continuation of revised sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 02/08506

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0005363	A	03-02-2000	EP 0976823 A1 02-02-2000
			AU 5412499 A 14-02-2000
			CA 2335278 A1 03-02-2000
			WO 0005363 A1 03-02-2000
			EP 1100912 A1 23-05-2001
			JP 2002522015 T 23-07-2002
WO 9616172	A	30-05-1996	US 5807693 A 15-09-1998
			US 5744354 A 28-04-1998
			US 5871945 A 16-02-1999
			AU 712168 B2 28-10-1999
			AU 4513396 A 17-06-1996
			BR 9506540 A 07-10-1997
			CA 2181826 A1 30-05-1996
			CN 1148407 A 23-04-1997
			CZ 9602136 A3 14-05-1997
			EP 0748379 A1 18-12-1996
			FI 962932 A 20-09-1996
			HU 75826 A2 28-05-1997
			JP 9509849 T 07-10-1997
			NO 963049 A 23-09-1996
			PL 315627 A1 25-11-1996
			RU 2185441 C2 20-07-2002
			SK 95096 A3 09-07-1997
			WO 9616172 A2 30-05-1996
			US 5629163 A 13-05-1997
			US 6107104 A 22-08-2000
			WO 0132927
CA 2388511 A1 10-05-2001			
EP 1255859 A2 13-11-2002			
WO 0132927 A2 10-05-2001			

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP 02/08506
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)		
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	<input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
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:
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).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:		
see additional sheet		
1.	<input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.	<input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input 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.:
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.: partially 1-25
Remark on Protest		<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: partially 1-25
Claims relating to Seq. Id. No. 1 and 7

2. claims: partially 1-25
Claims relating to Seq. Id. No. 2 and 8

3. claim: partially
Claims relating to Seq. Id. No. 3 and 9

4. claims: partially 1-25
Claims relating to Seq. Id. No. 4 and 10

5. claims: partially 1-25
Claims relating to Seq. Id. No. 5 and 11

6. claims: partially 1-25
Claims relating to Seq. Id. No. 6 and 12

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P 37/00	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	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	
	A 6 1 K 37/547	
	A 6 1 K 37/64	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, 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, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA07 AA13 BA01 BA08 BA22 CA18 CA53 DC03 NA14
 ZA01 ZA36 ZB07 ZB11 ZB26 ZC19 ZC20
 4C085 AA13 AA14 BB22 CC07 CC08 CC21 CC31 DD62 EE01
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 MA01 MA04 NA14 ZA01 ZA36 ZB07
 ZB11 ZB26 ZC19 ZC20
 4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 DA89 EA20 EA50

专利名称(译)	钙调神经磷酸酶调节剂		
公开(公告)号	JP2004535830A	公开(公告)日	2004-12-02
申请号	JP2003517270	申请日	2002-07-31
[标]申请(专利权)人(译)	基因组同行比奥医疗GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru霍夫Tsungu		
申请(专利权)人(译)	Genopia比奥医疗GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru有限公司		
[标]发明人	フェルケルヘルゲ		
发明人	フェルケル ヘルゲ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/00 A61K31/7088 A61K38/00 A61K38/48 A61K38/55 A61K39/395 A61K48/00 A61P9/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P43/00 C07K14/47 C12N9/16 C12N15/09 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61K31/00 A61K38/00 A61P9/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P43/00 C12N9/16		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48/00 A61P9/00 A61P25/00 A61P29/00 A61P35/00 A61P37/00 A61P43/00.111 C07K14/47 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 A61K37/547 A61K37/64		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/CA18 4C084/CA53 4C084/DC03 4C084/NA14 4C084/ZA01 4C084/ZA36 4C084/ZB07 4C084/ZB11 4C084/ZB26 4C084/ZC19 4C084/ZC20 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB22 4C085/CC07 4C085/CC08 4C085/CC21 4C085/CC31 4C085/DD62 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZA01 4C086/ZA36 4C086/ZB07 4C086/ZB11 4C086/ZB26 4C086/ZC19 4C086/ZC20 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA89 4H045/EA20 4H045/EA50		
优先权	2001118401 2001-07-31 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了钙调磷酸酶的调节剂，其基于钙调磷酸酶的催化亚基的剪接变体。优选地，催化亚基是该亚基的β-形式，γ-形式和/或α-形式。本发明包括调节剂和影响调节剂的刺激活性的物质，作为用于治疗疾病的活性剂，所述疾病优选与钙调神经磷酸酶活性的干扰有关。

