



(10) **DE 10 2004 031 579 B4** 2012.12.27

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2004 031 579.5**
(22) Anmeldetag: **29.06.2004**
(43) Offenlegungstag: **09.02.2006**
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: **27.12.2012**

(51) Int Cl.: **C07K 14/71 (2006.01)**
C07K 14/435 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

Innerhalb von drei Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:
Forschungsverbund Berlin e.V., 12489, Berlin, DE

(74) Vertreter:
HERTIN Anwaltssozietät, 10707, Berlin, DE

(72) Erfinder:
**Rosenthal, Walter, Prof. Dr., 14532,
Kleinmachnow, DE; Klußmann, Enno, Dr., 12209,
Berlin, DE; Hundsrucker, Christian, Dipl. -Biol.,
10965, Berlin, DE**

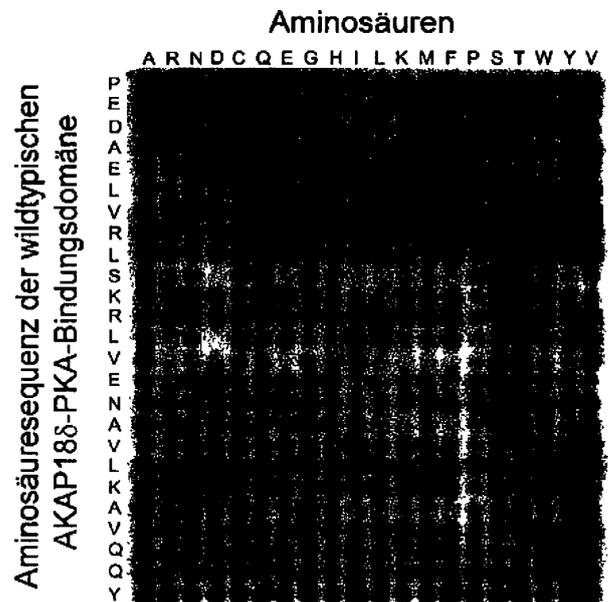
(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:

DE 103 06 085 A1

**UNIPROT, AKAP9, PRIMARY ACCESSION
NUMBER Q 99996**

(54) Bezeichnung: **Peptide zur Inhibition der Interaktion von Proteinkinase A und Proteinkinase A-Ankerproteinen, diese umfassendes Nukleinsäuremolekül, Vektor, Wirtszelle, gegen diese gerichtetes Erkennungsmolekül, diese enthaltende pharmazeutische Zusammensetzung, diese enthaltender Kit und deren Verwendung**

(57) Hauptanspruch: Polypeptid, dadurch gekennzeichnet, dass das Polypeptid ausgewählt ist aus einer Gruppe Aminosäuresequenzen bestehend aus SEQ ID-Nr. 20 bis 27.



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft Nukleinsäuresequenzen, die für Peptide kodieren, die die Interaktion von Proteinkinase A (PKA) und Proteinkinase A-Ankerproteinen (AKAP) inhibieren, einen Wirtsorganismus, der die Nukleinsäuresequenz umfasst und die erfindungsgemäßen Peptide exprimiert sowie die Verwendung der Peptide sowie des Wirtsorganismus bei der Therapie und experimentellen Untersuchung von Krankheiten, die mit einer modifizierten AKAP-PKA-Interaktion assoziiert sind sowie die Verwendung der Peptide als pharmazeutisches Mittel für die Behandlung solcher Krankheiten, insbesondere Diabetes insipidus, Ulcus duodeni, Hypertonie und Diabetes mellitus gemäß den Patentansprüchen.

[0002] Die biologische Wirkung von Hormonen und Neurotransmittern wird über die Aktivierung von Signalkaskaden, welche den Phosphorylierungsstatus von Effektorproteinen verändern, vermittelt. An diesem reversiblen Prozess sind zwei Klassen von Enzymen beteiligt: Proteinkinasen und Phosphoproteinphosphatasen. Die Phosphorylierung erfolgt durch Kinasen, welche die Übertragung der endständigen Phosphatgruppe von ATP auf spezifische Serin- oder Threoninreste katalysieren, die Dephosphorylierung wird durch Phosphoproteinphosphatasen vermittelt. Ein Mechanismus zur Kontrolle und Regulation dieser Enzymaktivitäten ist die Kompartimentierung dieser Enzyme durch die Assoziation mit Ankerproteinen, die in der Nähe ihrer Substrate lokalisiert sind. Die Proteinkinase A (PKA) ist eine der multifunktionellen Kinasen mit einer breiten Substratspezifität, welche durch die so genannten Protein kinase A anchoring Proteins (KKAPs) an subzellulären Strukturen verankert wird.

[0003] Bei vielen wichtigen zellulären Prozessen wie Kontraktion, Sekretion, Stoffwechsel, Gentranskription, Zellwachstum und -teilung erfolgt die Weiterleitung extrazellulärer Signale über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, das G-Protein G_s , Aktivierung einer Adenylzyklase und Bildung des second messenger zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP). Die Effekte von cAMP werden durch die cAMP-abhängige PKA vermittelt.

[0004] Das Proteinkinase A (PKA)-Holoenzym besteht aus einem Dimer regulatorischer (R) Untereinheiten, an die jeweils eine katalytische (C) Untereinheit gebunden ist. Die Aktivierung der Kinase durch die Bindung von zwei Molekülen cAMP an jede R-Untereinheit induziert die Dissoziation der C-Untereinheiten, die die in ihrer Nähe befindlichen Substrate phosphorylieren. Entsprechend dem Vorhandensein von Typ I (RI) oder Typ II (RII) regulatorischen Untereinheiten wird das PKA-Holoenzym als Typ I- oder Typ II-PKA bezeichnet. Bei den RI-Untereinheiten existieren RI α und RI β , bei den RII-Untereinheiten RII α und RII β und bei den C-Untereinheiten C α , C β und C γ . Die unterschiedlichen PKA-Untereinheiten werden von verschiedenen Genen kodiert (Klussmann, 2004; Tasken und Aandahl, 2004).

[0005] Die regulatorischen Untereinheiten zeigen ein unterschiedliches Expressionsmuster. Während RI α und RII α ubiquitär in den Geweben vorkommen, ist die regulatorische Untereinheit RI β in erster Linie im Gehirn zu finden.

[0006] Die Assoziation der beiden R-Untereinheiten mit intrazellulären Kompartimenten wird durch AKAPs vermittelt. Bei den Ankerproteinen handelt es sich um eine Gruppe funktionell verwandter Moleküle, die durch die Interaktion mit Typ I bzw. Typ II der regulatorischen Untereinheiten (RI bzw. RII) des PKA-Holoenzym charakterisiert sind. Die ersten Ankerproteine wurden bei der affinitätschromatographischen Reinigung der R-Untereinheiten über cAMP-Sepharose isoliert. Diese assoziierten Proteine zeigten auch nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran eine RII-Bindung. Auf dieser Beobachtung beruht auch die gebräuchlichste Methode (RII-overlay) zur Detektion von AKAPs. Es handelt sich hierbei um einen modifizierten Western Blot, bei dem statt eines primären Antikörpers radioaktiv markierte RII-Untereinheiten als Sonde eingesetzt werden.

[0007] Zur funktionellen Bedeutung der RI-AKAP-Interaktion ist noch wenig bekannt. Auch wenn RI α hauptsächlich zytosolisch lokalisiert ist, zeigen verschiedene Studien eine Verankerung *in vivo*. Dabei scheint die dynamische Verankerung der RI α -Untereinheiten im Gegensatz zur statischen Verankerung der RII-Untereinheiten von entscheidender Bedeutung für die Zelle zu sein. So wurde die Assoziation der RI-Untereinheiten mit der Plasmamembran von Erythrozyten und aktivierten T-Lymphozyten beschrieben. Bei der cAMP-vermittelten Inhibition der T-Zell-Proliferation durch die PKA Typ I könnte die Lokalisation des Enzyms möglicherweise auch durch AKAPs vermittelt werden. In knockout-Mäusen, die im Skelettmuskelgewebe keine regulatorischen Untereinheiten Typ II exprimieren, binden die RI α -Untereinheiten an ein mit Kalziumkanälen assoziiertes AKAP und erhalten so die normale, cAMP-abhängige Kanalleitfähigkeit durch die korrekte Verfügbarkeit der katalytischen Untereinheiten der PKA.

[0008] In vivo konnte weiterhin gezeigt werden, dass die katalytischen Untereinheiten in der Zelle bevorzugt mit den RII-Untereinheiten assoziieren und Typ I-PKA-Holoenzym gebildet wird, wenn die Menge der freien katalytischen Untereinheiten die Menge der freien RII-Untereinheiten übersteigt.

[0009] Die Spezifität in der PKA-Verankerung wird durch die targeting-Domäne erreicht, ein Strukturmotiv, das im Gegensatz zu der anchoring-Domäne weder in der Sequenz noch in der Struktur der AKAPs konserviert ist. So werden AKAPs durch Protein-Protein-Interaktionen an strukturelle Elemente in der Zelle und durch Protein-Lipid-Interaktionen an Membranen verankert.

[0010] In der Literatur sind verschiedene AKAPs beschrieben, die mit unterschiedlichen zellulären Kompartimenten assoziieren, so zum Beispiel mit den Zentrosomen, den Mitochondrien, dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat, der Plasma- und Kernmembran und mit Vesikeln.

[0011] Die genauen Mechanismen der Verankerung sind bisher nur für einige AKAPs bekannt. So wird das herzmuskelspezifische Ankerprotein mAKAP durch eine Region mit drei spektrinartigen Wiederholungssequenzen an der perinukleären Membran der Kardiomyozyten verankert. Zwei Isoformen der AKAP15/18 werden durch Lipidmodifikationen (Myristoylierung und Palmitoylierung) an der Plasmamembran verankert. Drei polybasische Regionen in der targeting-Domäne des AKAP79 sind an der Lokalisation des Proteins an der inneren postsynaptischen Membran (PSD, postsynaptic density) beteiligt (Klußmann, Vortrag, Leibniz-Institut für molekulare Pharmakologie, Campus Berlin-Buch, 2004).

[0012] Die AKAPs wurden zuerst durch die Interaktion mit der PKA charakterisiert. Einige dieser Proteine können jedoch auch andere an der Signaltransduktion beteiligte Enzyme binden. Durch die gleichzeitige Verankerung von Enzymen, die gegensätzliche Reaktionen katalysieren, wie zum Beispiel Kinasen und Phosphatasen, können diese, auch als scaffolding (gerüstbildende) Proteine bezeichneten AKAPs ganze Signalkomplexe in der Nähe bestimmter Substrate lokalisieren und so zur Spezifität und Regulation der zellulären Antwort auf extrazelluläre Signale beitragen. AKAP79 war das erste AKAP, für das die Interaktion mit mehreren Enzymen nachgewiesen werden konnte. Dieses Protein bindet die Proteinkinase A, die Proteinkinase C und die Proteinphosphatase Calcineurin (PP2B), wobei jedes Enzym in gebundenem Zustand inhibiert ist. Da unterschiedliche Signale für die Aktivierung jedes einzelnen Enzyms notwendig sind, können an dieser Stelle verschiedene second messenger wie cAMP, Kalzium und Phospholipide zusammentreffen. Weitere Beispiele sind das AKAP220, welches die PKA und die Proteinphosphatase PP1 an den Peroxisomen lokalisiert und das AKAP Yotiao, das neben der PKA ebenfalls die Proteinphosphatase PP1 bindet. Das AKAP CG-NAP bindet nicht nur die PKA und die Proteinphosphatase 221, sondern auch noch die Rho-abhängige Kinase PKN (NGF (nerve growth factor) -aktivierte Proteinkinase) und die Proteinphosphatase PP2A.

[0013] Auch andere Proteine können mit AKAPs assoziieren, so bindet Ezrin, ein Mitglied der zytoskelett-assoziierten ERM-Familie Ezrin, Radixin und Moesin, das als AKAP identifiziert wurde, an ein Protein (EBP50/NHERF), welches an der Regulation- des Natrium-Protonen-Transportes in der apikalen Membran von Epithelzellen beteiligt ist. AKAPs vermitteln die Modulation der Leitfähigkeit der Innenkanäle durch die Lokalisation der Proteinkinasen und -phosphatasen in der Nähe bestimmter Kanaluntereinheiten, die wahrscheinlich durch Phosphorylierung und Däphosphorylierung reguliert werden.

[0014] Die Aktivität des NMDA-Rezeptors wird durch das AKAP Yotiao, welches auch die Proteinphosphatase PP1 bindet, moduliert. Die in gebundenem Zustand aktive Phosphatase limitiert die Kanalleitfähigkeit des NMDA-Rezeptors, bis die PKA durch cAMP aktiviert wird und den Innenkanal oder ein assoziiertes Protein phosphoryliert, wodurch die Leitfähigkeit rapide ansteigt. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass myristoylierte Ht31-Peptide, die die Interaktion zwischen PKA und AKAP inhibieren, die cAMP-abhängige Inhibition der Interleukin 2-Transkription in Jurkat-T-Zellen aufheben und dass S-Ht31-Peptide die Spermienmotilität einschränken.

[0015] Auch bei den wichtigen komplexen biologischen Prozessen, wie die durch das Hormon GLP-1 (glucagon-like peptide)-vermittelte Verstärkung der Insulinsekretion in den β -Zellen des Pankreas und in RINm5F-Zellen (klonale β -Zelllinie der Ratte) sind AKAPs beteiligt. Die Aktivierung der PKA durch GLP-1 führt zur Phosphorylierung von L-Typ-Kalziumkanälen und begünstigt die Exozytose von Insulin aus sekretorischen Granula. Die Ht31-Peptid-vermittelte Inhibition der PKA-Verankerung führte zu einer deutlichen Verringerung der Insulinsekretion. Dabei wurden weder die cAMP-Bildung noch die Aktivität der katalytischen Untereinheiten der PKA durch die Peptide beeinflusst. Weiterhin konnte nach Expression des wildtypischen AKAP18a in RINm5F-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen, welche AKAP18a nicht exprimierten, eine Erhöhung der Insulinsekretion nach GLP-1-Applikation nachgewiesen werden.

[0016] Die vom antidiuretischen Hormon Arginin-Vasopressin(AVP)abhängige Umverteilung des Wasserkanals Aquaporin-2 aus intrazellulären Vesikeln in die Plasmamembran von Hauptzellen des renalen Sammelrohres, die molekulare Basis der Vasopressin-vermittelten Wasserrückresorption, ist ein weiteres Beispiel für einen Prozess, der die Interaktion der PKA mit AKAP-Proteinen erfordert (Klussmann et al., 1999). Wird die Interaktion unterbunden, kann die Umverteilung nicht stattfinden. Die Interaktion spielt jedoch auch bei zahlreichen anderen Vorgängen in einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen eine wichtige Rolle, zum Beispiel erhöht die Interaktion die Herzmuskelkontraktilität (Hulme et al., 2003).

[0017] Im Stand der Technik (DE 103 06 085 A1) sind neue Spleißvarianten eines Proteinkinase A-Ankerproteins offenbart worden. Die DE 103 06 085 löst die Aufgabe, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem Rückschlüsse auf die zelluläre Lokalisation der Interaktion zwischen AKAP und PKA erhalten werden können. In dieser Druckschrift wird nicht offenbart, neue Peptide bereitzustellen, die die Interaktion von AKAP und PKA entkoppeln.

[0018] Im Stand der Technik ist weiterhin die Sequenz AKAP 415 offenbart (der UNIPROT, AKAP9, PRIMARY ACCESSION NUMBER Q 99996). Diese Druckschrift offenbart keine Peptide, die verwendet werden können, um die Interaktion von AKAP und PKA zu entkoppeln.

[0019] Keine der beiden genannten Druckschriften motiviert den Fachmann, aus den dort offenbarten Gesamtsequenzen Peptide zu isolieren, die geeignet sind, die AKAP-PKA-Interaktion zu modifizieren bzw. bevorzugt zu entkoppeln. Der Fachmann sieht ausgewählte Peptide in diesen Druckschriften als nicht mit offenbart an.

[0020] Um die Wirkung der PKA-AKAP-Interaktion zu analysieren, ist es erforderlich, die Interaktion effizient und selektiv zu modifizieren, insbesondere zu inhibieren bzw. zu entkoppeln. Derzeit steht für die Entkopplung der PKA von AKAP-Proteinen ein Ht31. Peptid zur Verfügung. Das Peptid Ht31 kann an Stearat gekoppelt werden, um membranpermeabel vorzuliegen. Das Peptid Ht31 entkoppelt PKA und AKAP jedoch in einer Weise, die für viele Untersuchungen oder gar für eine therapeutische Verwendung nicht ausreichend ist. Vor allem ist das Peptid Ht31 nicht in der Lage, selektiv mit den regulatorischen Untereinheiten RII α , oder RII β der PKA zu interagieren, so dass die Bedeutung der Untereinheiten für ausgewählte Prozesse nicht analysiert werden kann (Klußmann, 2004).

[0021] Aufgabe der Erfindung ist es daher, die genannten Nachteile zu überwinden und insbesondere neue Nukleinsäuresequenzen bereitzustellen, die für Peptide kodieren, die die Interaktion von AKAP und PKA effizient und spezifisch modifizieren, insbesondere entkoppeln und die weiterhin als überexprimierende Stoffe in Wirtsorganismen eingesetzt werden können, um mit Hilfe dieser Wirtsorganismen – beispielsweise von Mäusen – modellhaft Krankheiten zu analysieren, die mit der AKAP-PKA-Interaktion assoziiert sind, vorzugsweise Diabetes insipidus, aber auch Ulcus duodeni, Hypertonie und Diabetes mellitus.

[0022] Die vorliegende Erfindung löst dieses technische Problem durch die Bereitstellung eines Polypeptids, dadurch gekennzeichnet, dass das Polypeptid ausgewählt ist aus einer Gruppe Aminosäuresequenzen bestehend aus SEQ ID-Nr. 20 bis 27.

[0023] Die Erfindung betrifft auch ein isoliertes Nukleinsäuremolekül ausgewählt aus der Gruppe umfassend

- a) ein Nukleinsäuremolekül bestehend aus einer Nukleotidsequenz kodierend eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID Nr. 20–27,
- b) ein Nukleinsäuremolekül, welches mit einer Nukleotidsequenz gemäß a) unter stringenten Bedingungen hybridisiert,
- c) ein Nukleinsäuremolekül bestehend aus einer Nukleotidsequenz, die eine ausreichende Homologie aufweist, um zu einer Nukleotidsequenz gemäß a) oder b) funktionsanalog zu sein, wobei funktionsanaloge Nukleinsäuresequenzen solche sind, deren kodierte Strukturen eine effiziente und selektive Entkopplung der PKA-AKAP-Interaktion ermöglichen und eine hohe Affinität für die Bindung an RII-Untereinheiten an PKA besitzen.
- d) ein Nukleinsäuremolekül, das infolge des genetischen Codes zu einer Nukleotidsequenz gemäß a)–c) degeneriert ist.

[0024] Es war überraschend, dass die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen eingesetzt werden können, um Peptide gemäß Tab. 1 (SEQ ID Nr. 20–27) zu kodieren, die die Wechselwirkung von AKAP und PKA modifizieren, vorzugsweise inhibieren, besonders bevorzugt entkoppeln. Mit Vorteil eignen sich die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle zur Kodierung von Peptiden, die selektiv an regulatorische Untereinheiten der PKA binden, insbesondere an RII α bzw. RII β . Weiterhin ermöglichen es die – durch die erfindungsgemä-

ßen Nukleinsäuremoleküle kodierten – Peptide, eine Modifizierung, Inhibition bzw. Entkopplung von AKAP und PKA in Abhängigkeit der verwendeten Spezies vorzunehmen. Die Nukleinsäuremoleküle bzw. die aus diesen abgeleiteten Peptide eignen sich mit Vorteil zur Herstellung transgener Organismen, beispielsweise von Mäusen, in denen die AKAP-PKA-Interaktion gewebs- und/oder zellspezifisch modifiziert ist.

[0025] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die Nukleinsäuresequenz, die eine ausreichende Homologie aufweist, um zu einer Nukleotidsequenz funktionsanalog zu sein, zumindest zu 80%, bevorzugt 90% homolog. Im Sinne der Erfindung heißt, um zu den genannten Nukleinsäuresequenzen bzw. den mit diesen Nukleinsäuresequenzen hybridisierenden Sequenzen funktionsanalog zu sein, dass die kodierten homologen Strukturen eine effiziente und selektive Entkoppelung der PKA-AKAP-Interaktion ermöglichen und eine hohe Affinität für die Bindung an RII-Untereinheiten von PKA besitzen.

[0026] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist das Nukleinsäuremolekül eine genomische DNA und/oder eine RNA; besonders bevorzugt ist das Nukleinsäuremolekül eine cDNA.

[0027] Die Erfindung betrifft auch einen Vektor, der mindestens ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül umfasst. Weiterhin betrifft die Erfindung auch eine Wirtszelle, die den Vektor umfasst. Die Erfindung betrifft auch ein Polypeptid, das durch mindestens ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül kodiert wird.

[0028] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfasst das Polypeptid eine Aminosäuresequenz nach SEQ ID Nr. 20 bis SEQ ID Nr. 27, bzw. mindestens ein Polypeptid gemäß dieser Sequenzen. Die Erfindung betrifft auch ein Polypeptid, welches funktionsanalog zu einem Polypeptid nach SEQ ID Nr. 20 bis 27 ist und/oder ein Polypeptid, welches ein Polypeptid umfasst, das eine auseichende Homologie aufweist, um zu einem Polypeptid nach SEQ ID Nr. 20 bis 27 funktionsanalog zu sein.

[0029] Ein funktionsanaloges Peptid ist ein Peptid, das in der Lage ist, die PKA-AKAP-Interaktion zu Modifizieren bevorzugt zu entkoppeln.

[0030] Mit Hilfe von Organismen kann beispielsweise untersucht werden, wie die Entkoppelung der PKA bzw. von ausgewählten Untereinheiten von AKAP-Proteinen als therapeutisches Prinzip angesehen und genutzt werden kann. In der Folge derartiger Untersuchungen können dann vorteilhafterweise optimierte Substanzen (Pharmaka) analysiert werden, die ebenso wirken. Derart optimierte Substanzen wirken bevorzugt als Aquaretika und können daher mit Vorteil bei Patienten mit Ödemen, beispielsweise bei Herzinsuffizienz oder bei Lebercirrhose, eingesetzt werden.

[0031] Die Erfindung betrifft auch ein Erkennungsmolekül, das gegen das Nukleinsäuremolekül, den Vektor, die Wirtszelle und/oder das Polypeptid gerichtet ist. Erkennungssubstanzen im Sinne der Erfindung sind Moleküle, die mit den genannten Strukturen wie Nukleinsäuremolekülen oder -sequenzen, Vektoren, Wirtszellen und/oder Polypeptiden bzw. deren Fragmenten wechselwirken können; insbesondere so Wechselwirken, dass eine Detektion bzw. eine Manipulation dieser Strukturen möglich ist. Die Erkennungssubstanzen können insbesondere spezifische Nukleinsäuren sein, die an die genannten Nukleinsäuremoleküle oder Polypeptide binden, wie zum Beispiel Antisense-Konstrukte, cDNA oder mRNA-Moleküle bzw. deren Fragmente, aber auch Antikörper, Fluoreszenzmarker, markierte Kohlenhydrate oder Lipide bzw. Chelatoren. Es ist selbstverständlich auch möglich, dass die Erkennungssubstanzen nicht Proteine oder Nukleinsäuren bzw. Antikörper sind, sondern gegen diese gerichtete Antikörper. Die Erkennungssubstanzen können in solch einem Fall insbesondere sekundäre Antikörper sein.

[0032] In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung ist das Erkennungsmolekül ein Antikörper, ein Antikörperfragment und/oder ein Antisensekonstrukt, insbesondere ein RMA-Interferenzmolekül.

[0033] Die Antikörper im Sinne der Erfindung binden die erfindungsgemäßen Peptide spezifisch. Die Antikörper können auch modifizierte Antikörper sein (zum Beispiel oligomere, reduzierte, oxidierte und markierte Antikörper). Der in der vorliegenden Beschreibung verwendete Begriff Antikörper umfasst sowohl intakte Moleküle als auch Antikörper-Fragmente, wie Fab, F(ab')₂ und Fv, die bestimmte Epitop-Determinanten der Polypeptide binden können. Bei diesen Fragmenten ist die Fähigkeit des Antikörpers zur selektiven Bindung seines Antigens oder Rezeptors teilweise erhalten geblieben, wobei die Fragmente wie folgt definiert sind:

- (1) Fab, das Fragment, das ein monovalentes Antigenbindungsfragment eines Antikörper-Moleküls enthält, lässt sich mittels Spaltung eines ganzen Antikörpers mit dem Enzym Papain erzeugen, wobei eine intakte leichte Kette und ein Teil einer schweren Kette erhalten werden;
- (2) das Fab'-Fragment eines Antikörper-Moleküls lässt sich mittels Behandlung eines ganzen Antikörpers mit Pepsin und anschließender Reduktion gewinnen, wobei eine intakte leichte Kette und ein Teil der schweren Kette erhalten werden; pro Antikörper-Molekül werden zwei Fab'-Fragmente erhalten;
- (3) F(ab')₂, das Fragment des Antikörpers, das sich mittels Behandlung eines ganzen Antikörpers mit dem Enzym Pepsin ohne anschließende Reduktion erhalten lässt; F(ab')₂ ist ein Dimer von zwei Fab'-Fragmenten, die durch zwei Disulfid-Bindungen zusammengehalten werden;
- (4) Fv, definiert als gentechnisch verändertes Fragment, das den variablen Bereich der leichten Kette und den variablen Bereich der schweren Kette enthält und in Form von zwei Ketten exprimiert wird; und
- (5) Einzelketten-Antikörper ("SCA"), definiert als gentechnisch verändertes Molekül, das den variablen Bereich der leichten Kette und den variablen Bereich der schweren Kette enthält, die durch einen geeigneten Polypeptid-Linker zu einem genetisch fusionierten Einzelketten-Molekül verbunden sind.

[0034] Die Erfindung betrifft auch eine pharmazeutische Zusammensetzung, die das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül, den erfindungsgemäßen Vektor, die erfindungsgemäße Wirtszelle, das erfindungsgemäße Polypeptid und/oder das erfindungsgemäße Erkennungsmolekül, gegebenenfalls zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger, umfasst.

[0035] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist die pharmazeutische Zusammensetzung ein Aquaretika. Aquaretika im Sinne der Erfindung modifizieren die Wechselwirkung zwischen PKA und AKAP-Proteinen, insbesondere entkoppeln sie die Wechselwirkung zwischen diesen beiden. Selbstverständlich ist es auch möglich, die erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle als pharmazeutische Zusammensetzung einzusetzen, insbesondere die, die gegen das erfindungsgemäße Peptid oder die kodierende Nukleinsäure gerichtet sind.

[0036] Insbesondere die die erfindungsgemäßen Peptide, die erfindungsgemäßen Vektoren oder die erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle umfassenden pharmazeutischen Zusammensetzungen können bevorzugt bei Patienten mit Ödemen, insbesondere bei Herzinsuffizienz oder Leberzirrhose eingesetzt werden. Die erfindungsgemäßen Vektoren bzw. Nukleinsäuremoleküle können im Sinne der Erfindung als pharmazeutische Zusammensetzung auf der Nukleinsäureebene eingesetzt werden, wohingegen die erfindungsgemäßen Peptide, aber zum Teil auch die erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle, auf der Aminosäureebene eingesetzt werden können. Je nachdem, ob die Therapie in der Entkoppelung von AKAP und PKA – z. B. mittels der erfindungsgemäßen Peptide – bzw. in der Verhinderung der Entkoppelung zwischen AKAP und PKA – z. B. mittels der erfindungsgemäßen Antikörper gerichtet gegen die Peptide – besteht, kann der Fachmann bevorzugt die erfindungsgemäßen Peptide bzw. die erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle, die zum Beispiel gegen diese Peptide oder andere Strukturen gerichtet sind, als pharmazeutische Zusammensetzung verwenden. Die erfindungsgemäßen Peptide sind insbesondere für die Entkoppelung von AKAP/PKA einsetzbar und somit beispielsweise bei Ödemen. Die erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle (z. B. Antikörper) sind insbesondere bei der Verhinderung der Entkoppelung von AKAP/PKA einsetzbar z. B. bei Diabetes insipidus.

[0037] Selbstverständlich ist es möglich, dass die erfindungsgemäßen Peptide übliche Hilfsstoffe, bevorzugt Träger, Adjuvantien und/oder Vehikel umfassen. Bei den Trägern kann es sich beispielsweise um Füllmittel, Streckmittel, Bindemittel, Feuchthaltemittel, Sprengmittel, Lösungsverzögerer, Resorptionsbeschleuniger, Netzmittel, Adsorptionsmittel und/oder Gleitmittel handeln. In diesem Fall wird das Peptid insbesondere als Arzneimittel oder pharmazeutisches Mittel bezeichnet.

[0038] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird das erfindungsgemäße Mittel als Gel, Puder, Pulver, Tablette, Retard-Tablette, Premix, Emulsion, Aufgussformulierung, Tropfen, Konzentrat, Granulat, Sirup, Pellet, Boli, Kapsel, Aerosol, Spray und/oder Inhalat zubereitet und/oder in dieser Form angewendet. Die Tabletten, Dragees, Kapseln, Pillen und Granulate können mit den üblichen, gegebenenfalls Opakisierungsmitteln enthaltenden, Überzügen und Hüllen versehen sein und auch so zusammengesetzt sein, dass sie den oder die Wirkstoffe nur oder bevorzugt in einem bestimmten Teil des Intestinaltraktes gegebenenfalls verzögert abgeben, wobei als Einbettungsmassen zum Beispiel Polymersubstanzen und Wachse verwendet werden können.

[0039] Die Arzneimittel dieser Erfindung können beispielsweise zur oralen Verabreichung in einer beliebigen oral verträglichen Dosierungsform verwendet werden, die Kapseln, Tabletten und wässrige Suspensionen und Lösungen einschließt, aber nicht darauf beschränkt ist. Im Fall von Tabletten zur oralen Verwendung schlie-

ßen Träger, die häufig verwendet werden, Lactose und Maisstärke ein. Gleitmittel, wie Magnesiumstearat, werden auch typischerweise zugesetzt. Zur oralen Verabreichung in Kapselform schließen verwendbare Verdünnungsmittel Lactose und getrocknete Maisstärke ein. Wenn wässrige Suspensionen oral verabreicht werden, wird der Wirkstoff mit Emulgier- und Suspendiermitteln kombiniert. Falls gewünscht, können bestimmte Süßmittel und/oder Geschmacksstoffe und/oder Farbmittel zugesetzt werden.

[0040] Der oder die Wirkstoffe können gegebenenfalls mit einem oder mehreren der oben angegebenen Trägerstoffe auch in mikroverkapselter Form vorliegen.

[0041] Suppositorien können neben dem oder den Wirkstoffen die üblichen wasserlöslichen oder wasserunlöslichen Trägerstoffe enthalten, zum Beispiel Polyethylenglycole, Fette, zum Beispiel Kakaofett und höhere Ester (zum Beispiel C₁₄-Alkohol mit C₁₆-Fettsäure) oder Gemische dieser Stoffe.

[0042] Salben, Pasten, Cremes und Gele können neben dem oder den Wirkstoffen die üblichen Trägerstoffe enthalten, zum Beispiel tierische und pflanzliche Fette, Wachse, Paraffine, Stärke, Tragant, Cellulosederivate, Polyethylenglycole, Silikone, Bentonite, Kieselsäure, Talkum und Zinkoxid oder Gemische dieser Stoffe.

[0043] Puder und Sprays können neben dem oder den Wirkstoffen die üblichen Trägerstoffe enthalten, zum Beispiel Milchzucker, Talkum, Kieselsäure, Aluminiumhydroxid, Calciumsilikat und Polyamidpulver oder Gemische dieser Stoffe. Sprays können zusätzlich die üblichen Treibmittel, zum Beispiel Chlorfluorkohlenwasserstoffe, enthalten.

[0044] Lösungen und Emulsionen können neben den Wirkstoffen CHP und Gemcitabin die üblichen Trägerstoffe wie Lösungsmittel, Lösungsvermittler und Emulgatoren, zum Beispiel Wasser, Ethylalkohol, Isopropylalkohol, Ethylcarbonat, Ethylacetat, Benzylalkohol, Benzylbenzoat, Propylenglykol, 1,3-Butylenglykol, Dimethylformamid, Öle, insbesondere Baumwollsaatöl, Erdnussöl, Maiskeimöl, Olivenöl, Ricinusöl und Sesamöl, Glycerin, Glycerinformal, Tetrahydrofurfurylalkohol, Polyethylenglycole und Fettsäureester des Sorbitans oder Gemische dieser Stoffe enthalten. Zur parenteralen Applikation können die Lösungen und Emulsionen auch in steriler und blutisotonischer Form vorliegen.

[0045] Suspensionen können neben den Wirkstoffen die üblichen Trägerstoffe wie flüssige Verdünnungsmittel, zum Beispiel Wasser, Ethylalkohol, Propylenglyköl, Suspendiermittel, zum Beispiel ethoxilierte Isostearylalkohole, Polyoxyethylensorbit- und Sorbitan-Ester, mikrokristalline Cellulose, Aluminiummetahydroxid, Bentonit, Agar-Agar und Tragant oder Gemische dieser Stoffe enthalten.

[0046] Die Arzneimittel können in Form einer sterilen injizierbaren Zubereitung, zum Beispiel als sterile injizierbare wässrige oder ölige Suspension, vorliegen. Diese Suspension kann auch mit im Fachgebiet bekannten Verfahren unter Verwendung geeigneter Dispergier- oder Netzmittel (wie zum Beispiel Tween 80) und Suspendiermittel formuliert werden. Die sterile injizierbare Zubereitung kann auch eine sterile injizierbare Lösung oder Suspension in einem ungiftigen parenteral verträglichen Verdünnungs- oder Lösungsmittel, zum Beispiel als Lösung in 1,3-Butandiol, sein. Zu den verträglichen Vehikeln und Lösungsmitteln, die verwendet werden können, gehören Mannit, Wasser, Ringer-Lösung und isotonische Natriumchloridlösung. Außerdem werden üblicherweise sterile, nichtflüchtige Öle als Lösungsmittel oder Suspendiermedium verwendet. Zu diesem Zweck kann ein beliebiges mildes nichtflüchtiges Öl einschließlich synthetischer Mono- oder Diglyceride verwendet werden. Fettsäuren, wie Ölsäure und ihre Glyceridderivate sind bei der Herstellung von Injektionsmitteln verwendbar, wie es natürliche pharmazeutisch verträgliche Öle, wie Olivenöl oder Rizinusöl, insbesondere in ihren polyoxyethylierten Formen sind. Diese Öllösungen oder Suspensionen können auch einen langkettigen Alkohol oder einen ähnlichen Alkohol enthalten als Verdünnungs- oder Dispergiermittel.

[0047] Die genannten Formulierungsformen können auch Färbemittel, Konservierungsstoffe sowie geruchs- und geschmacksverbesserte Zusätze, zum Beispiel Pfefferminzöl und Eukalyptusöl und Süßmittel, zum Beispiel Saccharin, enthalten. Die erfindungsgemäßen Peptide sollen in den aufgeführten pharmazeutischen Zubereitungen vorzugsweise in einer Konzentration von etwa 0,01 bis 99,9, vorzugsweise von etwa 0,05 bis 99 Gew.-% der Gesamt Mischung vorhanden sein.

[0048] Die aufgeführten pharmazeutischen Zubereitungen könnenaußer dem Peptid oder Strukturhomologen – z. B. Peptiden mit D-Aminosäuren – oder Funktionsanalogen – z. B. Peptidmimetika – weitere pharmazeutische Wirkstoffe enthalten. Die Herstellung der oben aufgeführten pharmazeutischen Zubereitungen erfolgt in üblicher Weise nach bekannten Methoden, zum Beispiel durch Mischen des oder der Wirkstoffe mit dem oder den Trägerstoffen.

[0049] Die genannten Zubereitungen können bei Mensch und Tier entweder oral, rektal, parenteral (intravenös, intramuskulär, subkutan), intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, lokal (Puder, Salbe, Tropfen) und zur Therapie der genannten Krankheiten angewendet werden. Als geeignete Zubereitung kommen Injektionslösungen, Lösungen und Suspensionen für die orale Therapie, Gele, Aufgussformulierungen, Emulsionen, Salben oder Tropfen in Frage. Zur lokalen Therapie können ophthalmologische und dermatologische Formulierungen, Silber- und andere Salze, Ohrentropfen, Augensalben, Puder oder Lösungen verwendet werden. Bei Tieren kann die Aufnahme auch über das Futter oder Trinkwasser in geeigneten Formulierungen erfolgen. Ferner können die Arzneimittel oder die Kombinationsmittel in andere Trägermaterialien wie zum Beispiel Kunststoffe, (Kunststoffketten zur lokalen Therapie), Kollagen oder Knochenzement eingearbeitet werden.

[0050] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die Peptide in einer Konzentration von 0,1 bis 99,5, bevorzugt von 0,5 bis 95, besonders bevorzugt von 20 bis 80 Gew.-% in einer pharmazeutischen Zubereitung eingebracht.

[0051] Das heißt, die Peptide sind in den oben aufgeführten pharmazeutischen Zubereitungen, zum Beispiel Tabletten, Pillen, Granulaten und anderen, vorzugsweise in einer Konzentration von 0,1 bis 99,5 Gew.-% der Gesamtmischung in einem bestimmten Verhältnis vorhanden. Die Wirkstoffmenge, das heißt die Menge einer erfindungsgemäßen Verbindung, die mit den Trägermaterialien kombiniert wird, um eine einzige Dosierungsform zu erzeugen, wird von dem Fachmann in Abhängigkeit von dem zu behandelnden Patienten und der besonderen Verabreichungsart variieren können. Nach Besserung des Zustandes des Patienten kann der Anteil der wirksamen Verbindung in der Zubereitung so geändert werden, dass eine Erhaltungsdosis vorliegt, die die Krankheit zum Stillstand bringt. Anschließend kann die Dosis oder Frequenz der Verabreichung oder beides als Funktion der Symptome auf eine Höhe verringert werden, bei der der verbesserte Zustand beibehalten wird. Wenn die Symptome auf das gewünschte Niveau gelindert worden sind, sollte die Behandlung aufhören. Patienten können jedoch eine Behandlung mit Unterbrechung auf Langzeitbasis nach beliebigem Wiederauftreten von Erkrankungssymptomen benötigen. Demgemäß ist der Anteil der Verbindungen, das heißt ihre Konzentration, in der Gesamtmischung der pharmazeutischen Zubereitung ebenso wie ihre Zusammensetzung oder Kombination variabel und kann vom Fachmann aufgrund seines Fachwissens modifiziert und angepasst werden.

[0052] Dem Fachmann ist bekannt, dass die erfindungsgemäßen Peptide mit einem Organismus, bevorzugt einem Menschen oder einem Tier, auf verschiedenen Wegen in Kontakt gebracht werden können. Weiterhin ist dem Fachmann bekannt, dass insbesondere die pharmazeutischen Mittel in verschiedenen Dosierungen appliziert werden können. Die Applikation sollte hierbei so erfolgen, dass die Erkrankung möglichst effektiv bekämpft wird bzw. der Ausbruch einer solchen Krankheit in einer prophylaktischen Gabe verhindert wird. Die Konzentration und die Art der Applikation können vom Fachmann durch Routineversuche eruiert werden. Bevorzugte Applikationen der erfindungsgemäßen Verbindungen sind die orale Applikation in Form von Pulver, Tabletten, Saft, Tropfen, Kapseln oder ähnlichem, die rektale Applikation in Form von Zäpfchen, Lösungen und ähnlichem, parenteral in Form von Injektionen, Infusionen und Lösungen sowie lokal in Form von Salben, Pflastern, Umschlägen, Spülungen und ähnlichem. Bevorzugt erfolgt das In-Kontakt-Bringen der erfindungsgemäßen Verbindungen prophylaktisch oder therapeutisch.

[0053] Die Eignung der gewählten Applikationsformen wie auch der Dosis, des Applikationsschemas, der Adjuvantswahl und dergleichen kann beispielsweise durch Entnahme von Serum-Alliquoten aus dem Patienten, d. h. dem Mensch oder dem Tier, und dem Testen auf das Vorhandensein von Krankheitsindikatoren im Verlauf des Behandlungsprotokolls bestimmt werden. Alternativ und begleitend hierzu kann der Zustand der Niere, aber auch die Menge von T-Zellen oder anderen Zellen des Immunsystems, auf herkömmliche Weise begleitend bestimmt werden, um einen Gesamtüberblick über die immunologische Konstitution des Patienten und insbesondere die Konstitution von stoffwechselwichtigen Organen, zu erhalten. Zusätzlich kann der klinische Zustand des Patienten auf die gewünschte Wirkung hin beobachtet werden. Wenn eine unzureichende therapeutische Effektivität erzielt wird, kann der Patient mit erfindungsgemäßen Mitteln ggf. mit anderen bekannten Medikamenten modifiziert weiterbehandelt werden, von denen eine Verbesserung der Gesamtkonstitution erwartet werden kann. Selbstverständlich ist es auch möglich, die Träger oder Vehikeln des pharmazeutischen Mittels zu modifizieren oder den Verabreichungsweg zu variieren.

[0054] Neben der oralen Aufnahme kann es dann zum Beispiel vorgesehen sein, dass Injektionen beispielsweise intramuskulär oder subkutan oder in die Blutgefäße ein weiterer bevorzugter Weg für die therapeutische Verabreichung der erfindungsgemäßen Verbindungen sind. Zeitgleich kann auch die Zufuhr über Katheter oder chirurgische Schläuche angewendet werden; beispielsweise über Katheter, die direkt zu bestimmten Organen wie den Nieren führen.

[0055] Die erfindungsgemäßen Verbindungen können in einer bevorzugten Ausführungsform in einer Gesamtmenge von bevorzugt 0,05 bis 500 mg/kg Körpergewicht je 24 Stunden eingesetzt werden, bevorzugt von 5 bis 100 mg/kg Körpergewicht. Hierbei handelt es sich vorteilhafterweise um eine therapeutische Menge, die verwendet wird, um die Symptome einer Störung oder responsiven, pathologisch physiologischen Kondition zu verhindern oder zu verbessern.

[0056] Selbstverständlich wird die Dosis vom Alter, der Gesundheit und dem Gewicht des Empfängers, dem Grad der Krankheit, der Art einer notwendigen gleichzeitigen Behandlung, der Häufigkeit der Behandlung und der Art der gewünschten Wirkungen und der Nebenwirkungen abhängen. Die tägliche Dosis von 0,05 bis 500 mg/kg Körpergewicht kann einmalig oder mehrfach angewendet werden, um die gewünschten Ergebnisse zu erhalten. Typischerweise werden insbesondere pharmazeutischen Mittel zur etwa 1- bis 10-maligen Verabreichung pro Tag oder alternativ oder zusätzlich als kontinuierliche Infusion verwendet. Solche Verabreichungen können als chronische oder akute Therapie angewendet werden. Die Wirkstoffmengen, die mit den Trägermaterialien kombiniert werden, um eine einzelne Dosierungsform zu erzeugen, können in Abhängigkeit von dem zu behandelnden Wirt und der besonderen Verabreichungsart selbstverständlich variieren. Bevorzugt ist es, die Targetsdosis auf 2 bis 5 Applikationen zu verteilen, wobei bei jeder Applikation 1 bis 2 Tabletten mit einem Wirkstoffgehalt von 0,05 bis 500 mg/kg Körpergewicht verabreicht werden. Selbstverständlich ist es möglich, den Wirkstoffgehalt auch höher zu wählen, beispielsweise bis zu einer Konzentration bis 5000 mg/kg. Die Tabletten können auch retardiert sein, wodurch sich die Anzahl der Applikationen pro Tag auf 1 bis 3 vermindert. Der Wirkstoffgehalt der retardierten Tabletten kann 3 bis 3000 mg betragen. Wenn der Wirkstoff – wie ausgeführt – durch eine Injektion verabreicht wird, ist es bevorzugt, 1 bis 10-mal pro Tag bzw. durch Dauerinfusion den Wirt mit den erfindungsgemäßen Verbindungen in Kontakt zu bringen, wobei Mengen von 1 bis 4000 mg pro Tag bevorzugt sind. Die bevorzugten Gesamtmengen pro Tag haben sich in der Humanmedizin und in der Veterinärmedizin als vorteilhaft erwiesen. Es kann erforderlich sein, von den genannten Dosierungen abzuweichen und zwar in Abhängigkeit von der Art und dem Körpergewicht des zu behandelnden Wirts, der Art und der Schwere der Erkrankung, der Art der Zubereitung der Applikation des Arzneimittels sowie dem Zeitraum bzw. dem Intervall, innerhalb welchem die Verabreichung erfolgt. So kann es in einigen Fällen bevorzugt sein, den Organismus mit weniger als den genannten Mengen in Kontakt zu bringen, während in anderen Fällen die angegebene Wirkstoffmenge überschritten werden muss. Die Festlegung der jeweils erforderlichen optimalen Dosierungen und der Applikationsart der Wirkstoffe kann durch den Fachmann aufgrund seines Fachwissens leicht erfolgen.

[0057] In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird das pharmazeutische Mittel in einer Einzelgabe von 1 bis 100, insbesondere von 2 bis 50 mg/kg Körpergewicht eingesetzt. Wie auch die Gesamtmenge pro Tag kann auch die Menge der Einzelgabe pro Applikation von dem Fachmann aufgrund seines Fachwissens variiert werden. Die erfindungsgemäß verwendeten Verbindungen können in den genannten Einzelkonzentrationen und Zubereitungen zusammen mit dem Futter bzw. mit Futterzubereitungen oder mit dem Trinkwasser auch in der Veterinärmedizin gegeben werden. Eine Einzeldosis enthält vorzugsweise die Menge Wirkstoff, die bei einer Applikation verabreicht wird, und die gewöhnlich einer ganzen, einer halben Tagesdosis oder einem Drittel oder einem Viertel einer Tagesdosis entspricht. Die Dosierungseinheiten können demgemäß bevorzugt 1, 2, 3 oder 4 oder mehrere Einzeldosen oder 0,5, 0,3 oder 0,25 einer Einzeldosis enthalten. Bevorzugt wird die Tagesdosis der erfindungsgemäßen Verbindungen auf 2 bis 10 Applikationen verteilt, bevorzugt auf 2 bis 7, besonders bevorzugt auf 3 bis 5 Applikationen, Selbstverständlich ist auch eine Dauerinfusion der erfindungsgemäßen Mittel möglich.

[0058] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden bei jeder oralen Applikation der erfindungsgemäßen Verbindungen 1 bis 2 Tabletten gegeben. Die erfindungsgemäßen Tabletten können mit dem Fachmann bekannten Überzügen und Hüllen versehen sein und auch so zusammengesetzt werden, dass sie den oder die Wirkstoffe nur bei bevorzugten, in einem bestimmten Teil des Wirts freigeben.

[0059] Bevorzugt ist es in einer weiteren Ausführungsform der Erfindung, dass die Peptidabschnitte gegebenenfalls miteinander assoziiert oder mit einem Träger verbunden in Liposomen eingeschlossen sind, wobei der Einschluss in Liposomen im Sinne der Erfindung nicht zwingend bedeuten muss, dass die Peptide im Inneren der Liposomen vorliegen, ein Einschluss im Sinne der Erfindung kann auch bedeuten, dass die Peptide mit der Membran der Liposomen assoziiert sind, beispielsweise so, dass diese auf der äußeren Membran verankert sind. Eine solche Darstellung der erfindungsgemäßen Peptide in oder auf den Liposomen ist vorteilhaft, wenn der Fachmann die Liposomen so auswählt, dass sie eine immunstimulierende Wirkung haben. Dem Fachmann sind aus der DE 198 51 282 verschiedene Möglichkeiten bekannt, die immunstimulierende Wirkung von Liposomen zu modifizieren. Bei den Lipiden kann es sich um einfache Lipide handeln, wie beispielsweise Ester

und Amide oder um komplexe Lipide wie zum Beispiel um Glycolipide wie Cerebroside oder Ganglioside, um Sphingolipide oder um Phospholipide.

[0060] Beispielsweise ist es möglich, einzelne oder Gruppen von Aminosäuren in den Peptiden auszutauschen, ohne dass die Aktivität der Peptide in Bezug auf die Lösung der erfindungsgemäßen Aufgabe nachteilig beeinflusst wird. Für den Austausch derartiger Aminosäuren sei auf die entsprechenden Standardwerke der Biochemie und der Genetik verwiesen.

[0061] Im Stand der Technik sind verschiedene Möglichkeiten zur Herstellung von Peptiden offenbart. Peptide, die von den erfindungsgemäßen Peptiden ausgehend mit solchen Verfahren entwickelt werden, sind von der erfindungsgemäßen Lehre mit erfasst. Eine Möglichkeit des Generierens von funktionsanalogen Peptiden ist beispielsweise in PNAS USA 1998, Oct. 13; 9521: 12179–84, WO 99/6293 und/oder WO 02/38592 beschrieben; diese Lehren sind in den Offenbarungsgehalt der Erfindung mit aufgenommen. Das heißt, sämtliche Peptide, Peptidfragmente oder Strukturen, die Peptide umfassen, die mit den genannten Verfahren – von den erfindungsgemäßen Peptiden ausgehend – generiert werden, sind Peptide im Sinne der Erfindung, sofern sie die erfindungsgemäße Aufgabe lösen. Die erfindungsgemäßen Peptide sind auch Leitstrukturen für die Entwicklung von Peptidmimetika.

[0062] Dem Fachmann ist weiterhin bekannt, dass einzelne Aminosäuren analoge physikochemische Eigenschaften aufweisen, die mit Vorteil dazu führen, dass diese Aminosäuren untereinander ausgetauscht werden können. Hierzu gehören beispielsweise die Gruppe der Aminosäuren (a) Glycin, Alanin, Valin, Leucin und/oder Isoleucin; bzw. die Aminosäuren (b) Serin und Threonin, die Aminosäuren (c) Asparagin und Glutamin, die Aminosäuren (d) Asparaginsäure und Glutaminsäure; die Aminosäuren (e) Lysin und Arginin sowie die Gruppe der aromatischen Aminosäuren (f) Phenylalanin, Tyrosin und/oder Tryptophan. Aminosäuren innerhalb ein und derselben Gruppe (a–f) können untereinander ausgetauscht werden. Weiterhin ist es möglich, dass Aminosäuren durch modifizierte Aminosäuren oder spezifische Enantiomere ausgetauscht werden. Weitere Modifikationen sind gemäß der Lehre nach der WO 99/62933 oder NO 02/38592 möglich, die in den Offenbarungsgehalt der erfindungsgemäßen Lehre mit aufgenommen sind.

[0063] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst das Peptid einen Linker und/oder einen Spacer, der ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend: u-Aminocarbonsäuren sowie deren Homo- und Heterooligomere, a,ffl-Aminocarbonsäuren sowie deren verzweigte Homo- oder Heterooligomere, sonstige Aminosäuren sowie die linearen und verzweigten Homo- oder Heterooligomere (Peptide); Amino-oligoalkoxy-alkylamine; Maleinimidocarbonsäure-Derivate; Oligomere von Alkylaminen; 4-Alkylphenyl-Derivate; 4-Oligoalkoxyphenyl- oder 4-Oligoalkoxyphenoxy-Derivate; 4-Oligoalkylmercaptophenyl- oder 4-Oligoalkylmercaptophenoxy-Derivate; 4-Oligoalkylamin-phenyl- oder 4-Oligoalkylaminyphenoxy-Derivate; (Oligo-alkylbenzyl)-phenyl- oder 4-Oligoalkylbenzyl)-phenoxy-Derivate sowie 4-Oligoalkoxybenzyl)-phenyl- oder 4-Oligoalkoxybenzyl)-phenoxy-Derivate; Trityl-Derivate; Benzyloxyaryl- oder Benzyloxyalkyl-Derivate; Xanthen-3-yl-oxyalkyl-Derivate; (4-Alkylphenyl)- oder co-(4-Alkylphenoxy)-alkansäure-Derivate; Oligoalkyl-Phenoxyalkyl- oder Oligoalkoxy-phenoxyalkyl-Derivate; Carbamat-Derivate; Amine; Trialkylsilyl- oder Dialkyl-alkoxysilyl-Derivate; Alkyl oder Aryl-Derivate und/oder Kombinationen davon; weitere mögliche Strukturen werden in der EP 1 214 350 beschrieben, die in den Offenbarungsgehalt der Erfindung mit aufgenommen sind.

[0064] Bevorzugt können synthetische Peptide oder Fragmente hiervon durch chemische Crosslinker multimerisiert werden oder an ein Trägermolekül wie BSA, Dextran, KLH oder andere gekoppelt werden. Die hierzu verwendeten chemischen Cross-linker sind in "Bioconjugate Techniques", Greg T. Hermanson, Academic Press, 1996 aufgelistet, die in den Offenbarungsgehalt der erfindungsgemäßen Lehre mit aufgenommen sind. Bevorzugte Crosslinker sind homobifunktionale Crosslinker, bevorzugt: NHS-Ester, wie DSP, DTSSP, DSS, BS, DST, Sulfo-DST, BSOE, Sulfo-BSOE, EGS, Sulfo-EGS, DSG oder DSC, homobifunktionale Imidoester, wie DMA, DMP, DMS oder DTBP, homobifunktionale Sulfhydryl-reaktive Cross-linker, wie DPD-PB, BMH oder BMOE, Difluorobenzenderivate, wie DFDNB oder DFDNPS, homobifunktionale photoreaktive Crosslinker, wie BASED, homobifunktionale Aldehyde, wie Formaldehyd oder Glutaraldehyd, Bis-Epoxide, wie 1,4-Butandiol diglycidylether, homobifunktionale Hydrazide, wie Adipinsäuredihydrazide oder Carbohydrazide, Bis-diazoniumderivate, wie o-Tolidin, bisdiazotisiertes Benzidin oder Bisalkylhaloid.

[0065] Bevorzugt sind auch heterobifunktionale Crosslinker, insbesondere aminreaktive und sulfhydrylreaktive Crosslinker, wie SPDP, LC-SPDP, Sulfo-LC-SPDP, SMPT, Sulfo-LC-SMPT, SMCC, Sulfo-SMCC, MBS, Sulfo-MBS, SIAB, Sulfo-SIAB, SMPB, Sulfo-SMBP, GMBS, Sulfo-GMBS, SIAX, SIAXX, SIAC, SIACX oder NPAA, carbonylreaktive und sulfhydrylreaktive Crosslinker, wie MPBH, M2C2H oder PDPH, aminreaktive und photoreaktive Crosslinker, wie NHS-ASA, Sulfo-NHS-ASA, Sulfo-NHS-LC-ASA, SASD, HSAB, Sulfo-HSAB,

SANPAH, Sulfo-SANPAH, ANB-NOS, SAND, SADP, Sulfo-SADP, Sulfo-SAPB, SAED, Sulfo-SAMCA, p-Nitrophenyldiazopyruvat oder PNP-DTP, Sulfhydryl und photoreaktive Crosslinker, wie ASIB, APDP, Benzophenon-4-iodoacetamid oder Benzophenon-4-maleimid, carbonylreaktive und photoreaktive Crosslinker, wie ABH, carboxylatreaktive und photoreaktive Crosslinker, wie ASBA, argininreaktive Crosslinker, wie APG, trifunktionale Crosslinker, wie 4-Azido-2-nitrophenylbiozytin-4-nitrophenylester, Sulfo-SEBD, TSAT und/oder TMEA.

[0066] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die erfindungsgemäßen Peptide und rekombinant hergestellte Strukturen, durch Peptidbrücken mit einer Länge von 0 bis 50 Aminosäuren verbunden. Dies beinhaltet auch rekombinante Proteine, die aus zwei N-terminalen und einer C-terminalen Sequenz bestehen oder Hexamere bestehend aus drei N-terminalen Sequenzen und drei C-terminalen Sequenzen, oder Multimere der zuvor aufgeführten rekombinanten Strukturen, wobei zwischen den N- und den C-terminalen Sequenzen je eine Peptidbrücke von 0 bis 50 Aminosäuren vorhanden sein kann. Die Peptide können zum Zwecke der Aufreinigung, Solubilisierung bzw. der Konformationsveränderung mit spezifischen Fusionsanteilen entweder am N- oder am C-Terminus versehen sein, wie zum Beispiel CBP (Calmodulin-Bindungsprotein), His-Tag und/oder andere. Ähnliche Konstrukte können auch von DNA, die zum therapieren verwendet wird, kodiert werden.

[0067] Die Erfindung betrifft auch einen Kit, der ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül, einen erfindungsgemäßen Vektor, eine erfindungsgemäße Wirtszelle, ein erfindungsgemäßes Polypeptid, ein erfindungsgemäßes Erkennungsmolekül und/oder eine pharmazeutische Zusammensetzung gegebenenfalls zusammen mit einer Information – zum Beispiel einem Beipackzettel oder eine Internetadresse, die auf Homepages mit weiteren Informationen verweist, etc. – über die Handhabung bzw. über die Kombination der Inhalte des Kits umfasst. Die Information zur Handhabung der Inhalte des Kits kann beispielsweise ein Therapieschema für Ödeme, Herzinsuffizienz, Leberzirrhose, Hyperinsulinismus, Hypertonie, Ulcus duodeni umfassen. Die Information kann jedoch auch Angaben darüber umfassen, wie die erfindungsgemäßen Stoffe und Erzeugnisse innerhalb einer Diagnose von Krankheiten, die mit der AKAP-PKA-Interaktion oder deren Entkoppelung assoziiert sind, einzusetzen sind. Der erfindungsgemäße Kit – kann auch in der Grundlagenforschung verwendet werden. Innerhalb der Grundlagenforschung ist der Kit bevorzugt einsetzbar, um zu detektieren, ob ein Stoffwechselphänomen mit der Wechselwirkung bzw. mit der nicht vorhandenen Wechselwirkung von AKAP und PKA assoziiert ist. Insbesondere ist es möglich, mit Hilfe des erfindungsgemäßen Kits zu bestimmen, welche Untereinheiten von AKAP und/oder PKA für die Interaktion dieser beiden Moleküle oder für das Nichtzustandekommen der Interaktion zwischen diesen verantwortlich sind.

[0068] Die erfindungsgemäßen Erzeugnisse, wie beispielsweise Peptide, Vektoren, Nukleinsäuremoleküle, können andere vorteilhafte Nukleinsäuren, Aminosäuren, Kohlenhydrate bzw. Lipide umfassen. Es kann beispielsweise bevorzugt sein, dass die Peptide mit einem Fettrest, wie zum Beispiel einem Stearat, so modifiziert werden, dass diese gut membranpermeabel sind. Mit derartigen Peptiden können an Zellkulturen Versuche durchgeführt werden. Solche Peptide können als Werkzeuge eingesetzt werden, um die PKA besonders effizient von AKAP-Proteinen in Zellen, Zellkulturen, Gewebekulturen, Organkulturen oder Organismen zu entkoppeln. Die Peptide im Sinne der Erfindung werden in Zellkulturen insbesondere zur Beantwortung der Frage herangezogen werden können, ob ein bestimmter Prozess von der Verankerung der PKA an AKAP-Proteine abhängt. Aufgrund der vorteilhaften hohen Affinität für die humanen RII α Untereinheiten der PKA eignen sich die erfindungsgemäßen Peptide insbesondere für Untersuchungen an humanen Systemen. Durch den Vergleich mit Peptiden, die die PKA mit anderer Affinität binden, werden weiterhin quantitative Aussagen möglich sein, die definieren, bis zu welchem Grad eine PKA-AKAP-Interaktion notwendig ist, um den Ablauf eines physiologischen Prozesses zu gewährleisten. Insbesondere die erfindungsgemäßen Kits können verwendet werden, um diesen Ablauf des physiologischen Prozesses zu studieren. Von Vorteil ist es hierbei, dass die erfindungsgemäßen Peptide, die die RII-Untereinheiten der PKA stärker binden als die typischen PKA-Bindungsdomänen von AKAP185. Da die erfindungsgemäßen Peptide vorteilhafterweise RII α - bzw. RII β -spezifisch sind, können ZUM Beispiel mit dem Kit besonders detaillierte Erkenntnisse über die Interaktion gewonnen werden. Die Entkoppelung der einen oder der anderen regulatorischen Untereinheiten der PKA von AKAP-Proteinen kann insbesondere Aufschluss darüber geben, welche PKA, TyplI α oder TyplI β , an dem jeweiligen zu untersuchenden Prozess beteiligt ist. Insbesondere das Peptid A18 δ RII β Rn1 bindet selektiv RII β Untereinheiten der PKA.

[0069] Die Erfindung betrifft auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Nukleinmoleküls, einer erfindungsgemäßen Wirtszelle, eines erfindungsgemäßen Polypeptids, eines erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküls, einer erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzung und/oder eines erfindungsgemäßen Kits zur Modifikation, insbesondere einer Inhibition, einer AKAP-PKA-Interaktion.

[0070] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung, insbesondere der erfindungsgemäßen Verwendung, wird die Zelle – beispielsweise als Zellkultur – als Modell für die gewebs- und/oder zellspezifische AKAP-PKA-Interaktion verwendet, insbesondere als Modell für Diabetes insipidus. Weitere bevorzugte Modelle sind Zellkulturen, oder Gewebe, die erfindungsgemäße Nukleinsäuremoleküle oder Peptide umfassen.

[0071] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird durch die AKAP-PKA-Modifikation die Vasopressin-induzierte Umverteilung von AQP2 modifiziert, insbesondere verhindert.

[0072] In einer weiteren besonders bevorzugten Ausführungsform werden das Polypeptid und/oder die pharmazeutische Zusammensetzung als Wasserverlust-verursachende Mittel verwendet, insbesondere als Aquaretika.

[0073] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung, insbesondere der erfindungsgemäßen Verwendung, wird die Interaktion der RII α - oder RII β -Untereinheit des PKA mit AKAP modifiziert, insbesondere inhibiert.

[0074] In einer weiteren bevorzugten Verwendung sind die Untereinheiten humanem oder murinem Ursprungs.

[0075] Im Folgenden soll die Erfindung anhand von Beispielen näher erläutert werden, ohne auf dieses beschränkt zu sein.

Material und Methoden

Herstellung von Peptidbibliotheken, die von der Sequenz der PKA-Bindungsdomäne von AKAP18'5 abgeleitet sind, auf Membranen

[0076] Alle Chemikalien und Lösungsmittel wurden bei Fluka (Steinheim) oder Sigma Aldrich (München) gekauft und ohne weitere Reinigungsschritte benutzt. Emoc-geschützte Aminosäurepentafluorophenylester wurden bei Novabiochem Eerck Biosciences GmbH (Darmstadt) gekauft. Peptidbibliotheken wurden durch automatische SPOT-Synthese auf Whatman 50 Zellulosemembranen gemäß Standardprotokollen mittels Fmoc-Chemie und AutoSpot-Robot ASS 222 (Intavis Bioanalytical Instruments AG, Köln) synthetisiert. Schutzgruppen der Aminosäureseitenketten wurden durch eine Mischung aus Trifluoressigsäure (TFA) in Dichlormethan (DCM) abgespalten (Frank, 1992; Kramer und Schneider-Mergener, 1998). Zur Kontrolle wurden Spots (ca. 50 nmol Peptid pro Spot) aus der Zellulosemembran herausgeschnitten, von der Membran durch Behandlung mit 0,05 m NaOH abgespalten und mit HPLC und MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert.

Detektion membranassoziierter Peptide im RII-overlay-Experiment mit regulatorischen RII α - und RII β -Untereinheiten der PKA als Sonde

Material

1. Regulatorische RII α -(human) und RII β -(Ratte)Untereinheiten der PKA erhalten von Prof. Dr. Friedrich W. Herberg, Universität Kassel
2. Katalytische Untereinheiten der PKA, Promega, Mannheim, Bestellnr.: V5161
3. [γ ³²P]ATP 5000 Ci/mmol Amersham Biosciences, Braunschweig, Bestellnr.: AA0018
4. Sephadex G 50, medium Pharmacia, Bestellnr.: 17-0043-01
5. Phosphat-gepufferte Saline (PBS)

[0077]

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g

in 800 ml H₂O lösen, auf pH 7,4 einstellen und mit H₂O auf 1 l auffüllen.

6. Tris-gepufferter Saline mit Tween 20

Tris·HCl	10 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,05%
pH	7,5

1. Reaktionsansatz

	Endkonzentration	Stammlsg.	im Ansatz
RII α oder RII β	15 μ g	2,7 μ g/ μ l	5,6 μ l
Katalytische Untereinheit der PKA	2 μ g	0,9 μ g/ μ l	2 μ l
Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0	25 mM	1 M	12,5 μ l
cAMP	10 μ M	1 mM	5 μ l
MgCl ₂	10 mM	0,5 M	10 μ l
DTT	0,5 mM	50 mM	5 μ l
[γ ³² P]ATP/ATP	0,1 μ M		
radioaktiv: $3,3 \times 10^8$ cpm/ml = 75 μ Ci		5 μ Ci/ μ l	15 μ l
nicht radioaktiv:		10 μ M	5 μ l
H ₂ O		434,9 μ l	
10 min Inkubation bei 0°C (auf Eis).			

2. Einstellung der ATP-Konzentration

[0078] Die ATP-Konzentration wurde durch Zugabe von nicht radioaktivem ATP auf 10 μ M eingestellt (Zugabe von 5 μ l 0 einer 1 mM Lösung). Der Ansatz wurde weitere 50 min auf Eis inkubiert.

3. Stoppen der Reaktion und Überprüfung der Reaktion

[0079] Die Reaktion wurde durch Zugabe von Dextranblau und freier Nukleotide gestoppt. Das freie ATP wurde über eine Sephadex G50-Säule abgetrennt. Abtrennung der markierten RII-Untereinheit der PKA von freien Nukleotiden über Sephadex G50-Säulen. Nicht eingebaute Nukleotide wurden von den RII-Untereinheiten durch die Fraktionierung über Sephadex G 50-Säulen getrennt.

1. Quellen des Sephadex G 50-Materials: 20 g wurden in 400 ml PBS über Nacht bei Raumtemperatur gequollen. Nicht abgesetztes Material wurde anschließend mit einer Pasteurpipette entfernt. Das gequollene Material wurde in 50 ml Falcon Röhrchen aliquottiert und bei 4°C gelagert. Zur Konservierung wurde Natriumazid in einer Endkonzentration von 0,01% zugesetzt.
2. Das Material wurde in eine mit einer Glaskugel verschlossene 10 ml sterile Einmalpipette gegossen. Zum Setzen des Säulenbettes liefen etwa 50 ml PBS, das 1 mg/ml BSA (bovines Serumalbumin) enthielt, durch. Bis zur Benutzung der Säule wurde sie oben mit Parafilm verschlossen.
3. Die markierten RII-Untereinheiten (500 μ l) wurden mit Dextranblau (70 μ l einer 20 mg/ml Lösung) auf die Säule aufgetragen (Gesamtvolumen = 570 μ l).
4. Nachdem die Probe in die Matrix eingewandert war, wurde mit PBS aufgefüllt.
5. Kurz bevor das Dextranblau eluierte, wurde begonnen Fraktionen zu sammeln (2 Fraktionen je 1,5 ml, die Fraktionen je 1 ml).
6. Zur Bestimmung der Inkorporation von ³²P wurde 1% (5,7 μ l) der Probe vor der Säule (das entspricht 1% der eingesetzten Radioaktivität) und 3 μ l jeder Fraktion eingesetzt.
7. Die Fraktionen des ersten Peaks, welcher die Sonde enthielt, wurden vereinigt. Die Einbaurrate wurde in % errechnet und die spezifische Aktivität (cpm/ μ g Protein) bestimmt.

RII-overlay

1. Proteine (40 µg) wurden mittels SDS-PAGE getrennt und durch das semi dry-Elektroblotverfahren auf eine PVDF-Membran (PVDF, Polyvinylidenfluorid) übertragen. Die membranassoziierten Proteine wurde mit Ponceau S gefärbt, um die Markerproteine auf der Membran zu identifizieren. Entfärbt wurde mit TBS.
2. Die Membran wurde in Blotto/BSA für 16 h bei 4°C inkubiert:

[0080]

10 mM Kaliumphosphatpuffer,	pH 7.4
0,15 M NaCl	8,766 g/l
5% (w/v) Magermilchpulver	50 g/l
0,1% (w/v) BSA	1 g/l
(0,01% antifoam (Sigma))	
0,02% NaN ₃	0,2 g/l

3. Das Blotto/BSA wurde durch frisches ersetzt und ³²P markierte RII-Untereinheiten dazugegeben (10⁵ cpm/ml). Es wurde für 4–6 h bei Raumtemperatur inkubiert.
4. Die Membran wurde 4 × 15 min in Blotto/BSA und 2 × 10 min in 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7.4, 0,15 M NaCl gewaschen.
5. RII-bindende Proteine wurden durch Exposition auf eine Phosphoimagerplatte detektiert.

Ergebnisse

[0081] Es wurde eine Peptidbibliothek, abgeleitet von der wildtypischen Aminosäuresequenz der PKA-Bindungsdomäne von AKAP18δ (PEDAELVRLSKRLVENAVLKAVQQY; Henn et al., 2004) auf einer Membran synthetisiert. Dazu wurde jede Aminosäure der wildtypischen Sequenz mit den 20 möglichen Aminosäuren substituiert. [Fig. 1](#) zeigt die Detektion der Peptide mittels der RII-overlay-Methode. Als Sonde wurden in diesem Fall radioaktive PKA RIIα- und RIIβ-Untereinheiten gleichzeitig eingesetzt. In allen späteren Experimenten wurden entweder RIIα- oder RIIβ-Untereinheiten als Sonde eingesetzt. Das Ergebnis zeigt deutliche Unterschiede in der Bindungsfähigkeit der einzelnen Peptide an die R-Untereinheiten (unterschiedliche Signalintensitäten).

[0082] [Fig. 2](#) zeigt eine Wiederholung des Experiments mit ausgewählten Peptiden (AKAP18δ-L304T, AKAP18δ-L308D, AKAP18δ-L314E) deren Bindungsfähigkeit an RIIα- bzw. RIIβ-Untereinheiten aber separat in unterschiedlichen RII-overlay-Experimenten getestet wurde. Als Kontrollen wurden die Peptide Ht31, Ht31-P, AKAP18δ-RI und AKAP18δ-wt (wildtypische Sequenz) auf den gleichen Membranen synthetisiert und dem RII-overlay-Experiment unterzogen. Für die Quantifizierung wurden die Signale densitometrisch ausgewertet und auf das Signal, das für AKAP18δ-wt erhalten wurde, bezogen. Die Quantifizierung spricht für eine stärkere Bindung von AKAP18δ-L304T und AKAP18δ-L314E sowohl an RIIα- als auch an RIIβ-Untereinheiten, AKAP18δ-RI und AKAP18δ-L308D dagegen schwächer. Des bekannte Peptid Ht31 bindet beide regulatorische Untereinheiten etwa 5fach schwächer als das AKAP18δ-wt und etwa 5–6fach schwächer als AKAP18δ-L304T und AKAP18δ-L314E. Die Bindung von Ht31 an die hier verwendeten regulatorischen RIIα- und RIIβ-Untereinheiten ist nur unwesentlich stärker als die Bindung der Untereinheiten an Ht31-P, das die AKAP-PKA-Interaktion nicht hemmt (Klussmann et al., 1999; Alto et al., 2003). Damit sind die Peptide AKAP18δ-wt, AKAP18δ-L304T und und AKAP18δ-L314E wesentlich effizientere Inhibitoren einer AKAP-PKA-Interaktion als Ht31.

[0083] Alto et al. (2003) entwickelten ein Peptid, AKAP_{IS}, das die Interaktion zwischen der murinen RIIα-Untereinheit der PKA mit 5fach höherer Affinität bindet ($K_D = 0,45$ nM) als das Peptid Ht31 ($K_D = 2,2$ nM).

[0084] In unseren RII-overlay-Experimenten binden die Peptide AKAP_{IS} und Ht31 sowohl die humane RIIα- als auch die RIIβ-Untereinheit der PKA aus der Ratte kaum, die von uns identifizierten Peptide AKAP18δ-wt und AKAP18δ-L304T und und AKAP18δ-L314E dagegen stark. Dieses Ergebnis spricht für Speziesunterschiede zwischen den murinen und humanen RIIα-Untereinheiten, die zu unterschiedlichen Bindungsaffinitäten für die gleichen Peptide führen.

Identifizierung von Peptiden, die spezifisch RII β -Untereinheiten der PKA binden

[0085] Um Peptide zu finden, die entweder RII α - oder RII β -Untereinheiten der PKA binden und damit spezifisch die Interaktion von AKAP-Proteinen mit der Typ II α bzw. der Typ II β PKA hemmen, wurden anhand von dreidimensionalen Strukturmodellen der PKA-Untereinheiten aus der wildtypischen PKA-Bindungsdomäne von AKAP18 δ Peptide abgeleitet, die die AKAP-Bindungstasche blockieren könnten. Die Peptide (1–19) wurden parallel auf zwei Membranen synthetisiert und anschließend in RII-overlay-Experimenten auf ihre Bindungsfähigkeit an RII α - oder RII β -Untereinheiten der PKA getestet ([Fig. 3A](#)). Die quantitative Auswertung zeigte u. a. einen deutlichen Unterschied der Bindung der beiden PKA-Untereinheiten an das Peptid 7, dessen Sequenz neben derer der anderen Peptide in der [Fig. 3B](#) aufgelistet ist.

[0086] Ausgehend von der Sequenz des Peptids 7 wurden zwei Peptidbibliotheken auf Membranen synthetisiert und RII-overlay-Experimenten mit RII α - bzw. RII β -Untereinheiten als Sonden unterzogen. [Fig. 4](#) zeigt, dass einige Peptide RII α -binden, aber nicht RII β -Untereinheiten (zum Beispiel die Peptide 10/11 und 10/12) und umgekehrt (zum Beispiel Peptid 21/4). Darüber hinaus weisen einige Peptide eine stärkere Bindung an RII α -Untereinheiten als an RII β -Untereinheiten auf. Bei anderen ist es umgekehrt. Sie binden RII α -Untereinheiten schwächer als an RII β -Untereinheiten. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass wir mit den genannten Peptiden A18 δ RII α Hs1 und 2 und A18 δ RII β Rn1 die ersten Blocker gefunden haben, die selektiv die Interaktion von RII α - bzw. RII β -Untereinheiten der PKA mit AKAP-Proteinen identifiziert haben.

Tab. 1

SEQ ID Nr. 1	ANDAQLVRLSKRLVENAVLKAVQQY	
SEQ ID Nr. 2	ANDAQLVRLSKRLVENAVLKAVQQY	
SEQ ID Nr. 3	ASDAQLVRLSKRLVENAVLKAVQQY	
SEQ ID Nr. 4	ASDAKLVRLSKRLVENAVLKAVQQY	
SEQ ID Nr. 5	ARDAKLVRLSKRLVENAVLKAVQQY	
SEQ ID Nr. 6	ARDAQLVRLSKRLVENAVLKAVQQY	
SEQ ID Nr. 7	ANDARLVRLSKRLVENAVLKAVQQY	
SEQ ID Nr. 8	ASDARLVRLSKRLVENAVLKAVQQY	
SEQ ID Nr. 9	ASDAKTVRLSKRLVENAVLKAVQQY	
SEQ ID Nr. 10	ANDAKTERLSKRLVENAVLKAVQQY	
SEQ ID Nr. 11	ANDAKTERLSQRLVENAVLKAVQQY	
SEQ ID Nr. 12	ANDAKTQRLSQRLVENAVLKAVQQY	
SEQ ID Nr. 13	PEDAELVRLSKRLVENAVLKAVQQY	
SEQ ID Nr. 14	PEDAELVRLSKRLVENAVLQAVQQY	
SEQ ID Nr. 15	PEDAELVRLSKRLVENAVLNGVQQY	
SEQ ID Nr. 16	PEDAELVRLSKRLVENAVLNGQQQY	
SEQ ID Nr. 17	PEDAELVRLSKRLVENAVLNGNQY	
SEQ ID Nr. 18	PEDAELVRLSKRLVENAVKNGNQY	
SEQ ID Nr. 19	PEDAELVRLSKRLVENAVKNGAQDY	
SEQ ID Nr. 20	PEDAELVRLSKRLVENAVLKAVQQY	(Akap18 δ -wt)
SEQ ID Nr. 21	PEDAELVRTSKRLVENAVLKAVQQY	(AKAP18 δ -L304T)
SEQ ID Nr. 22	PEDAELVRLSKRDVENAVLKAVQQY	(AKAP18 δ -L308D)
SEQ ID Nr. 23	PEDAELVRLSKRLVENAVEKAVQQY	(AKAP18 δ -L314E)
SEQ ID Nr. 24	PEDAELVRLSKRLPENAVLKAVQQY	(AKAP18 δ -P)
SEQ ID Nr. 25	PEDAELVRLSKRLPENAPLKAVQQY	(AKAP18 δ -PP)
SEQ ID Nr. 26	PEDAELVRLDKRLPENAPLKAVQQY	(AKAP18 δ -phos)
SEQ ID Nr. 27	EPEDAELVRLSKRLVENAVLKAVQQYLEETQ	(Akap18 δ -RI)
SEQ ID Nr. 28	ANDARLVRLSKRLRENAVAVLKAVQQY	(A18 δ RII α Hs1 (14/14))
SEQ ID Nr. 29	ANDARLVRLSKRLYENAVAVLKAVQQY	(A18 δ RII α Hs2 (14/19))
SEQ ID Nr. 30	ANDARLVRLSKRLVENAVLKAVFVQQY	(A18 δ RII β Rn1 (21/4))
SEQ ID Nr. 31	ANDARLVRLNKRLVENAVLKAVQQY	(A18 δ RII α Rn2 (10/11))
SEQ ID Nr. 32	ANDARLVRLPKRLVENAVLKAVQQY	(A18 δ RII α Rn3 (10/12))
SEQ ID Nr. 33	ANDARLVRLSKRDVENAVLKAVQQY	(A18 δ RII α Rn4 (13/02))
SEQ ID Nr. 34	YQEQLSEEEVAKVIVSMSIAFAQQTE	(AKAP450_1)
SEQ ID Nr. 35	NLQKIVEEKVAAALVSQIQLEAVQE	(AKAP450_2)

Tab. 2

Peptid	RII α -Bindung K _p [nM]	RII β -Bindung K _D [nM]
AKAP18 δ wt	0,4–1,5	1–6
AKAP18 δ L304T	0,3–0,9	35
AKAP18 δ L314E	0,2–1,3	22
AKAP18 δ L308D	keine Bindung	keine Bindung
AKAP18 δ -P	keine Bindung	keine Bindung
AKAP18 δ -PP	keine Bindung	keine Bindung
Ht31	15	35
Ht31-P	keine Bindung	keine Bindung
AKAP _{IS}	keine Bindung	keine Bindung
AKAP _{IS} -P	keine Bindung	keine Bindung

[0087] Tabelle 2. Bindungskonstanten für die Interaktion von humanen RII α - und RII β -Untereinheiten aus der Ratte mit den angegebenen Peptiden, die aus der wildtypischen RII-Bindungsdomäne von AKAP18 δ (AKAP 18 δ wt) abgeleitet wurden.

[0088] Die Werte wurden durch surface plasmon resonance-Messungen erhalten. L, Leuzin, T, Threonin, D, Aspartat, P, Prolin, IS, in silico. 304, 308 und 314 bezeichnen die Position der entsprechenden Aminosäuren in AKAP18 δ .

Bildlegenden

Fig. 1.

[0089] Identifizierung von Peptiden, die die Interaktion von AKAP-Proteinen mit der PKA hemmen. Eine Bibliothek von Peptiden, die von der PKA-Bindungsdomäne des AKAP18 δ abgeleitet wurden, wurde auf einer Membran synthetisiert. Die Membran wurde mit radioaktiv markierten regulatorischen RII α - und RII β -Untereinheiten der PKA inkubiert (RII-overlay-Experiment). Jeder schwarze Punkt repräsentiert ein Peptid, an das die RII-Untereinheiten gebunden haben (detektiert mit einem Phosphoimager). Die Aminosäuresequenzen der Peptide lassen sich anhand der angegebenen Kürzel (Einbuchstabenkodierung) ablesen. Vertikal: Sequenz der wildtypischen PKA-Bindungsdomäne von AKAP18 δ ; horizontal: die 20 Aminosäuren, die für die Substitution der wildtypischen Sequenz eingesetzt wurden.

Fig. 2

[0090] Identifizierung von Peptiden, abgeleitet von AKAP18 δ , die die Interaktion von AKAP-Proteinen mit den regulatorischen RII α - und RII β -Untereinheiten der PKA hemmen. A. Peptide, die von der PKA-Bindungsdomäne des AKAP18 δ abgeleitet wurden, wurden auf zwei Membranen synthetisiert. Die Membranen wurden mit radioaktiv markierten regulatorischen RII α - (obere Reihe) oder RII β -Untereinheiten (untere Reihe) der PKA inkubiert (RII-overlay-Experiment). Jeder schwarze Punkt repräsentiert ein Peptid, an das die RII-Untereinheiten gebunden haben (detektiert mit einem Phosphoimager). Für die Quantifizierung wurden die Signale densitometrisch ausgewertet und auf das Signal, das für AKAP18 δ -wt erhalten wurde, bezogen. B: Die Aminosäuresequenzen der Peptide (Einbuchstabenkodierung), die in A angegeben sind.

Fig. 3A

[0091] Peptide, abgeleitet von AKAP18 δ , die RII α - und RII β -Untereinheiten der PKA unterschiedlich stark binden. A. Die Peptide 1–19, die von der PKA-Bindungsdomäne des AKAP18 δ abgeleitet wurden, wurden auf zwei Membranen synthetisiert. Die Membranen wurden mit radioaktiv markierten regulatorischen RII α - (obere Reihe) oder RII β -Untereinheiten (untere Reihe) der PKA inkubiert (RII-overlay-Experiment). Jeder schwarze Punkt repräsentiert ein Peptid, an das die RII-Untereinheiten gebunden haben (detektiert mit einem Phosphoimager). Für die Quantifizierung wurden die Signale densitometrisch ausgewertet und auf das Signal, das für

AKAP18 δ -wt erhalten wurde, bezogen. Das Peptid 7 ist aufgrund des großen Unterschieds in der Bindung an die beiden RII-Untereinheiten durch rote Schrift hervorgehoben. B: Die Aminosäuresequenzen der Peptide (Einbuchstabenkodierung), die in A mit 1–19 bezeichnet sind.

Fig. 4

[0092] Unterschiedliche Peptide, abgeleitet von AKAP18 δ , binden RII α - und RII β -Untereinheiten der PKA unterschiedlich stark. Zwei Bibliotheken von Peptiden, die von dem Peptid 7 aus Fig. 3 abgeleitet wurden, wurden auf zwei Membranen synthetisiert. Die Membranen wurden mit radioaktiv markierten regulatorischen RII α - (linke Seite) oder RII β -Untereinheiten der PKA (rechte Seite) inkubiert (RII-overlay-Experiment). Jeder schwarze Punkt repräsentiert ein Peptid, an das die RII-Untereinheiten gebunden haben (detektiert mit einem Phosphorimager). Die Aminosäuresequenzen der Peptide lassen sich anhand der angegebenen Kürzel (Einbuchstabenkodierung) ablesen. Vertikal: Sequenz des Peptids 7; horizontal: die 20 Aminosäuren, die für die Substitution der wildtypischen Sequenz eingesetzt wurden. Horizontale und vertikale Reihen sind zusätzlich durch arabische Zahlen beschriftet. Diese Koordinaten erleichtern die Zuordnung, so bedeutet zum Beispiel 10/11: Reihe 10 Peptid 11. Die unten aufgelisteten Peptide werden entsprechend ihrer Bindung an RII α mit A18 δ RII α Hs1 und 2 bzw. entsprechend ihrer Bindung an RII β mit A18 δ RII β Rn1 bezeichnet.

Referenzen

- Alto, N. M., Soderling, S. H., Hoshi, N., Langeberg, L. K., Fayos, R., Jennings, P. A., Scott, J. D. Bioinformatic design of A-kinase anchoring protein-in silico: a potent and selective peptide antagonist of type II protein kinase A anchoring. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 4445–4450, 2003.
- Bregman, D. B., Bhattacharyya, N., Rubin, C. S. High affinity binding protein for the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase II-B. *J. Biol. Chem.* 264, 4648–4656, 1989.
- Burns-Hamuro, L. L., Ma, Y., Kammerer, S., Reineke, U., Self, C., Cook, C., Olson, G. L., Cantor, C. R., Braun, A., Taylor, S. S. Designing isoform-specific peptide disruptors of protein kinase A localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 4072–4077, 2003.
- Frank, R. Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support. *Tetrahedron* 48, 9217–9232, 1992.
- Fraser, I. D., Tavalin, S. J., Lester, L. B., Langeberg, L. K., Westphal, A. M., Dean, R. A., Marrion, N. V., Scott, J. D. A novel lipid-anchored A-kinase Anchoring Protein facilitates cAMP-responsive membrane events. *EMBO J.* 17, 2261–2272, 1998.
- Henn, V., Edemir, B., Stefan, E., Wiesner, B., Lorenz, D., Theilig, F., Schmitt, R., Vossebein, L., Tamma, G., Beyermann, M., Krause, E., Herberg, F. W., Valenti, G., Bachmann, S., Rosenthal, W., Klussmann, E. Identification of a novel A-kinase anchoring protein 18 isoform and evidence for its role in the vasopressin-induced aquaporin-2 shuttle in renal principal cells. *J. Biol. Chem.* JBC published March 22, 2004 as doi: 10.1074/jbc.M312835200
- Hulme J. T., Lin, T. W., Westenbroek, R. E., Scheuer, T., Catterall, W. A. Beta-adrenergic regulation requires direct anchoring of PKA to cardiac CaV1.2 channels via a leucine zipper interaction with A kinase-anchoring protein 15. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 13093–13098, 2003.
- Klussmann, E., Maric, K., Wiesner, B., Beyermann, M., Rosenthal, W. Protein kinase A anchoring proteins are required for vasopressin-mediated translocation of aquaporin-2 into cell membranes of renal principal cells. *J. Biol. Chem.* 274, 4934–4938, 1999.
- Klussmann, E. Protein kinase A. Online pharmacology reference database. Elsevier Science Inc., Amsterdam, The Netherlands. Im Druck.
- Kramer, A., Schneider-Mergener, J. Synthesis and screening peptide libraries on continuous cellulose membrane supports. *Meth. Mol. Biol.* 87, 25–39, 1998.
- Tasken, K., Aandahl, E. M. Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol. Rev.* 84, 137–167, 2004.

Patentansprüche

1. Polypeptid, **dadurch gekennzeichnet**, dass das Polypeptid ausgewählt ist aus einer Gruppe Aminosäuresequenzen bestehend aus SEQ ID-Nr. 20 bis 27.
2. Isoliertes Nukleinsäuremolekül ausgewählt aus der Gruppe umfassend
 - a) ein Nukleinsäuremolekül bestehend aus einer Nukleotidsequenz kodierend eine Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID Nr. 20–27,

- b) ein Nukleinsäuremolekül, welches mit einer Nukleotidsequenz gemäß a) unter stringenten Bedingungen hybridisiert,
- c) ein Nukleinsäuremolekül bestehend aus einer Nukleotidsequenz, die eine ausreichende Homologie aufweist, um zu einer Nukleotidsequenz gemäß a) oder b) funktionsanalog zu sein, wobei funktionsanaloge Nukleinsäuresequenzen solche sind, deren kodierte Strukturen eine effiziente und selektive Entkoppelung der PKA-AKAP-Interaktion ermöglichen und eine hohe Affinität für die Bindung an RII-Untereinheiten an PKA besitzen.
- d) ein Nukleinsäuremolekül, das infolge des genetischen Codes zu einer Nukleotidsequenz gemäß a)–c) degeneriert ist.

3. Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 2, dadurch gekennzeichnet, dass die unter c) angegebene Nukleotidsequenz mindestens 80 bevorzugt-90% homolog zu einer der unter a) angegebenen Nukleotidsequenz ist.

4. Nukleinsäuremolekül gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass es eine genomische DNA, eine cDNA und/oder eine RNA ist.

5. Vektor umfassend ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 2 bis 4.

6. Wirtszelle umfassend den Vektor gemäß Anspruch 5.

7. Erkennungsmolekül gerichtet gegen ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 2 bis 4, einen Vektor gemäß Anspruch 5, eine Wirtszelle gemäß Anspruch 6 und/oder ein Polypeptid gemäß Anspruch 1.

8. Erkennungsmolekül nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass es ein Antikörper, ein Antikörperfragment und/oder ein Antisense-Konstrukt ist, insbesondere ein RNA-Interferenzmolekül.

9. Pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, dass sie ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 2 bis 4, ein Vektor gemäß Anspruch 5, eine Wirtszelle gemäß Anspruch 6 7, ein Polypeptid gemäß Anspruch 1 und/oder ein Erkennungsmolekül gemäß einem der Ansprüche 7 oder 8, gegebenenfalls mit einem pharmazeutischen verträglichen Träger umfasst.

10. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass diese ein Aquaretika ist.

11. Kit, dadurch gekennzeichnet, dass er ein Nukleinsäuremolekül gemäß einem der Ansprüche 2 bis 4, ein Vektor gemäß Anspruch 5, eine Wirtszelle gemäß Anspruch 6, ein Polypeptid gemäß Anspruch 1, ein Erkennungsmolekül gemäß einem der Ansprüche 7 oder 8 und/oder die pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 9 oder 10 umfasst.

12. Verwendung eines Nukleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 2 bis 4, eines Vektors nach Anspruch 5, einer Wirtszelle nach Anspruch 6, eines Polypeptids nach Anspruch 1, eines Erkennungsmoleküls nach Anspruch 7 oder 8, einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach Anspruch 9 oder 10 und/oder eines Kits nach Anspruch 11 zur Modifikation, insbesondere einer Inhibition, einer AKAP-PKA-Interaktion.

13. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass die Interaktion in einer Zelle, einer Zellkultur und/oder einem Gewebe durchgeführt wird.

14. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass durch die Modifikation die Vasopressin-induzierte Umverteilung von AQPII modifiziert wird, insbesondere verhindert wird.

15. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Polypeptid gemäß Anspruch 1 und/oder die pharmazeutische Zusammensetzung gemäß Anspruch 9 oder 10 als Wasserverlust-ursachende Mittel eingesetzt werden, insbesondere als Aquaretika.

16. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Interaktion der RII α - und/oder RII β -Untereinheiten des PKA mit AKAP modifiziert, insbesondere inhibiert wird.

17. Verwendung nach dem vorhergehenden Anspruch, dadurch gekennzeichnet, dass die Untereinheiten humanem oder murinem Ursprungs sind.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

Fig. 1

**Identifizierung von Peptiden, die
die Interaktion von AKAP-
Proteinen mit den
regulatorischen RII-
Untereinheiten der PKA hemmen**

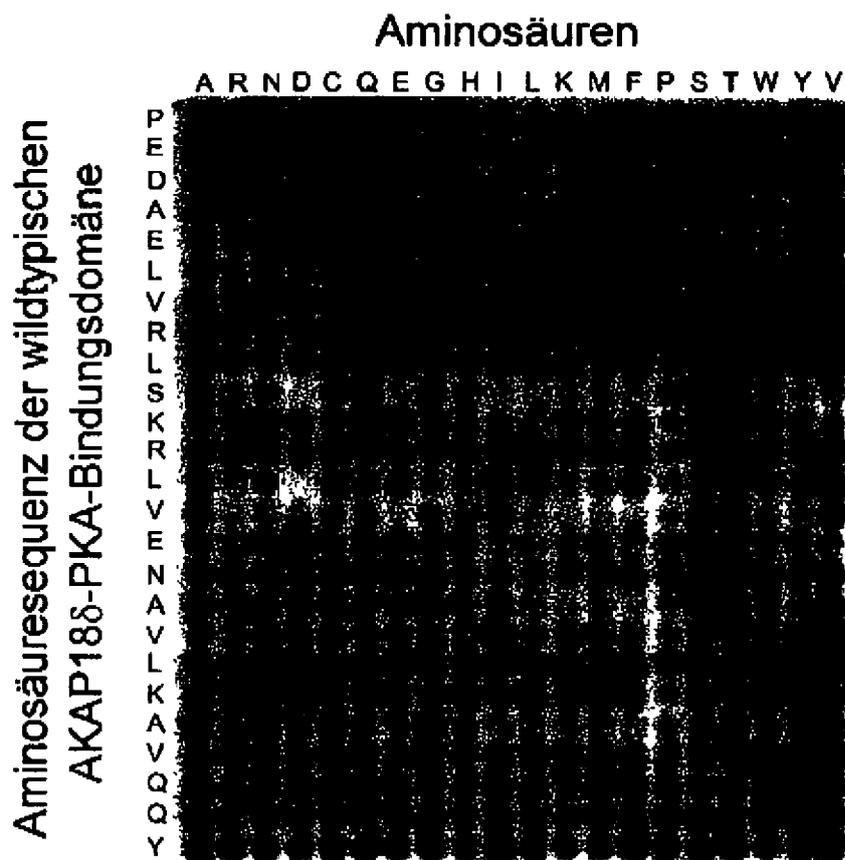


Fig. 2A

**Identifizierung von Peptiden,
abgeleitet von AKAP18 δ , die die
Interaktion von AKAP-Proteinen mit
den regulatorischen RII α - und RII β -
Untereinheiten der PKA hemmen**

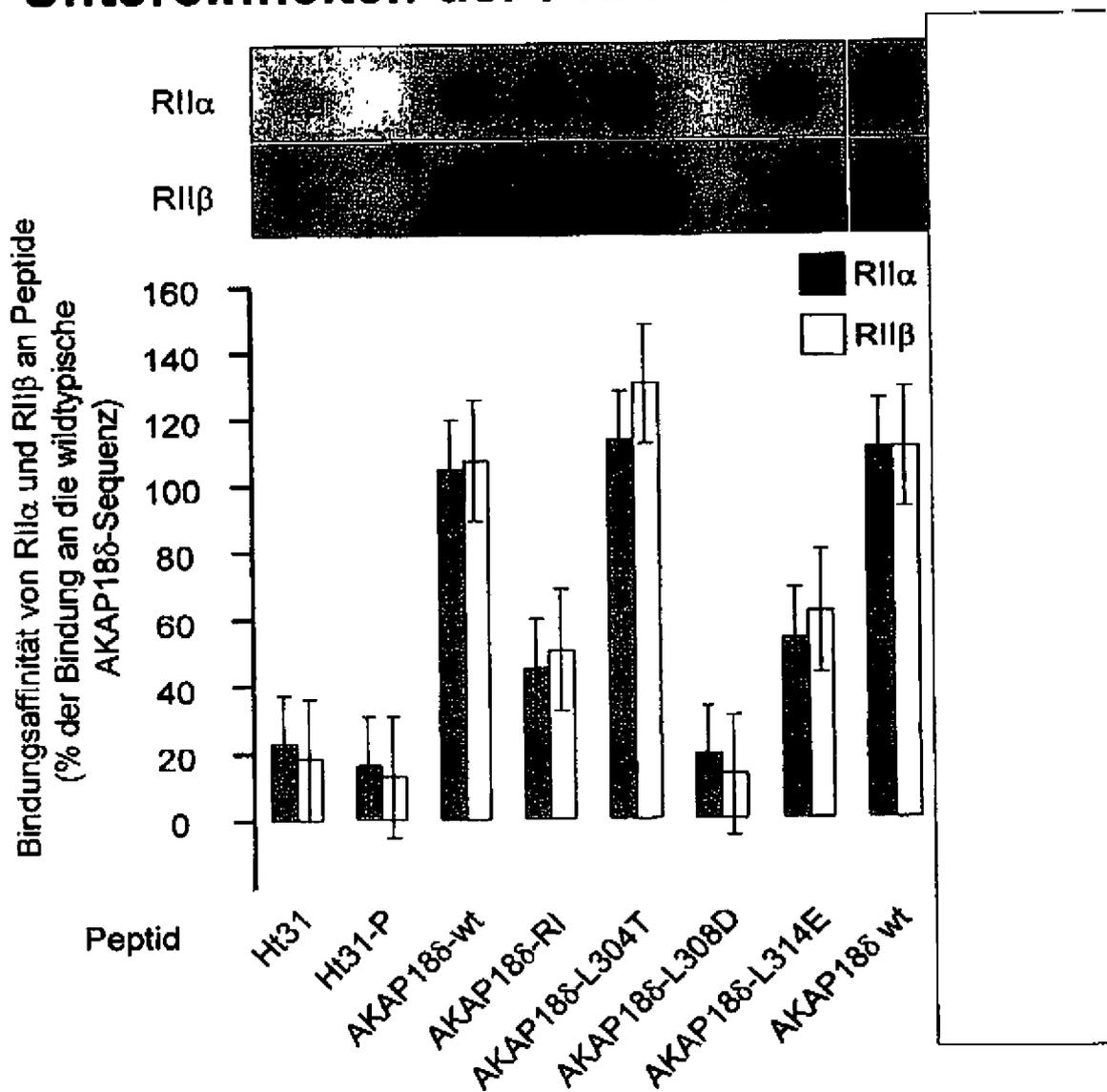


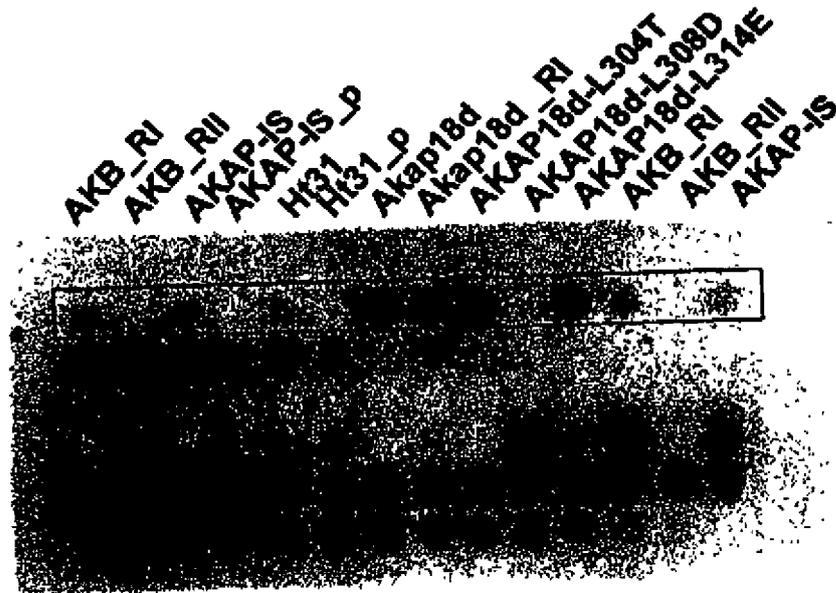
Fig. 2B

Die Aminosäuresequenzen der Peptide (Einbuchstabenkodierung), die in Fig. 2A angegeben sind

Name	Sequenz
Ht31	KGADLIEEAASRIVDAVIEQVKAAG
Ht31-P	KGADLIEEAASRI P DAVIEQVKAAG
AKAP185-wt	PEDAELVRLSKRLVENAVLKAVQQY
AKAP185-RI	EPEDAELVRLSKRLVENAVLKAVQQY-LEE-TQ
AKAP185-L304T	PEDAELTVRLSKRLVENAVLKAVQQY
AKAP185-L308D	PEDAELVRLSKRDVENAVLKAVQQY
AKAP185-L314E	PEDAELVRLSKRLVENAVEKAVQQY

Fig. 2C

Sonde: RII α



Sonde: RII β

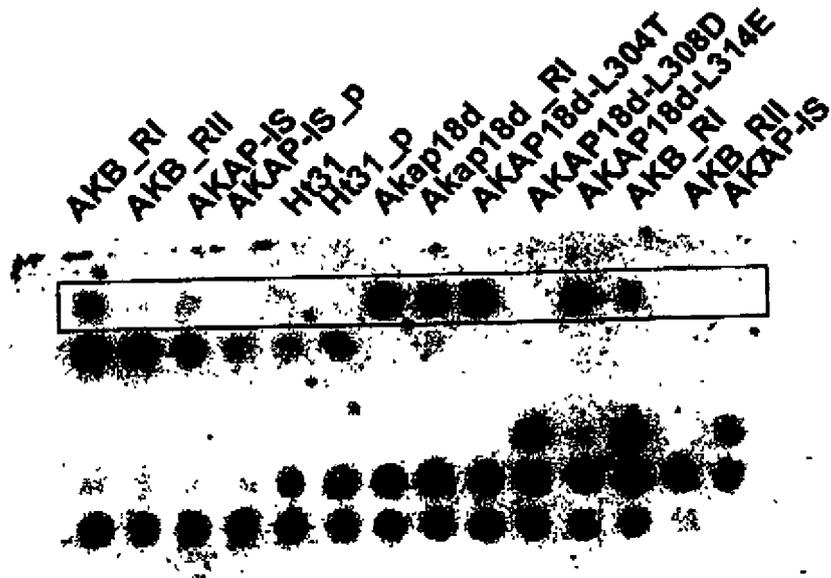


Fig. 3A

**Peptide, abgeleitet von AKAP18 δ ,
die RII α - und RII β -Untereinheiten der
PKA unterschiedlich stark binden**

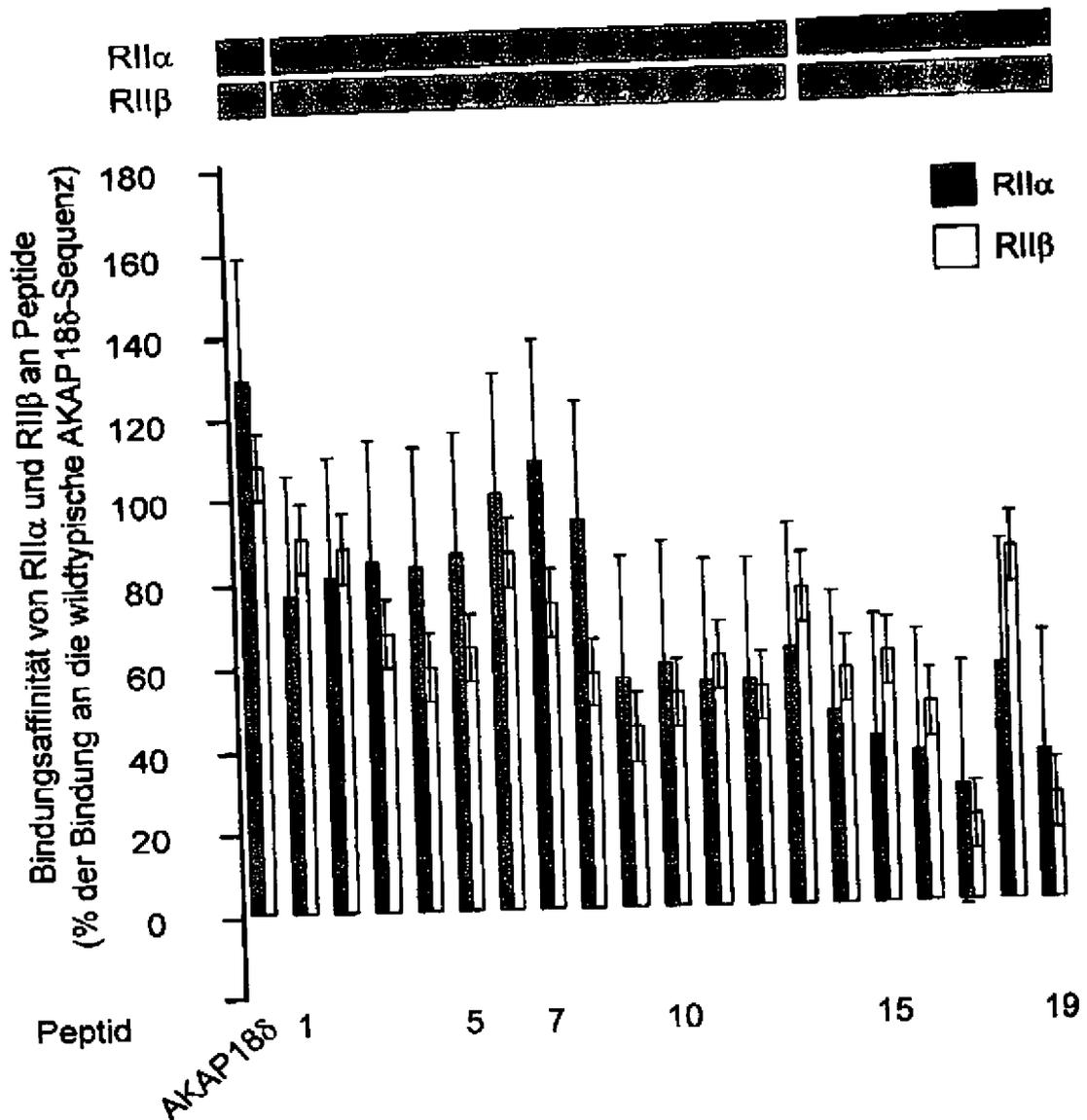


Fig. 3B

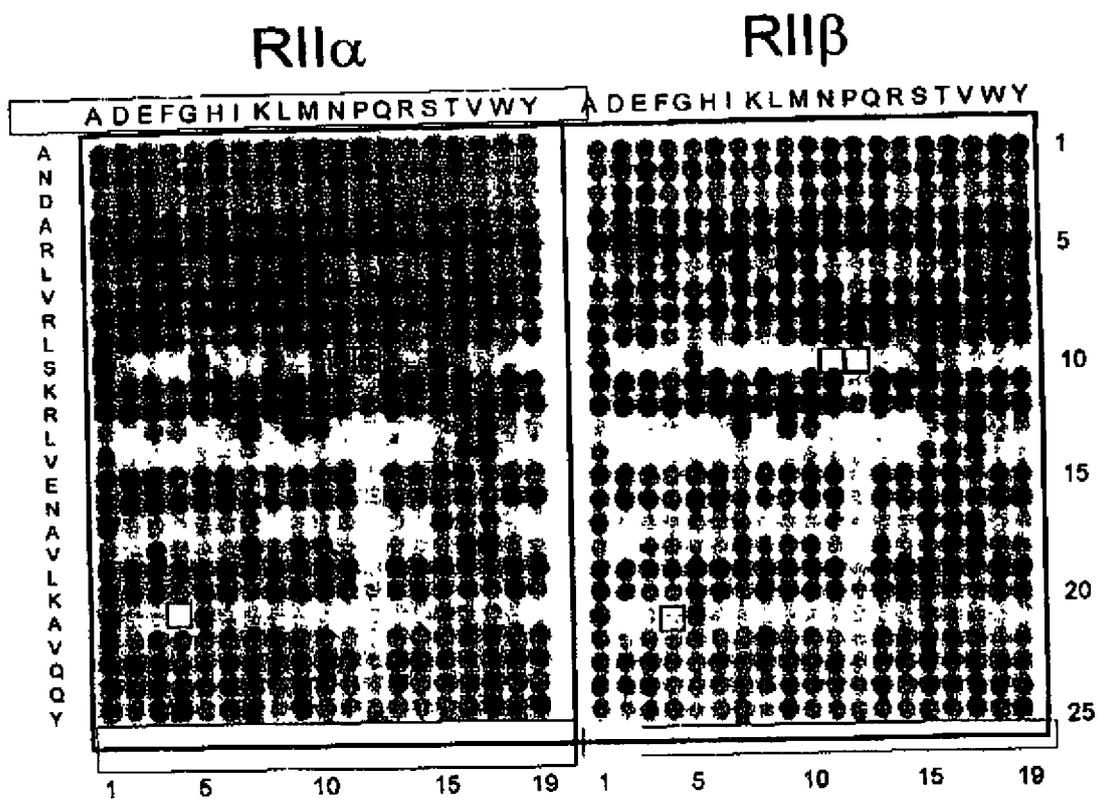
Sequenzen der Peptide 1 - 19

Peptid	Sequenz
AKAP188 wt	PEDAELVRLSKRLVENAVLKAVQQY
1	ANDAQLVRLSKRLVENAVLKAVQQY
2	ANDAQLVRLSKRLVENAVLKAVQQY
3	ASDAQLVRLSKRLVENAVLKAVQQY
4	ASDAKLVRLSKRLVENAVLKAVQQY
5	ARDAKLVRLSKRLVENAVLKAVQQY
6	ARDAQLVRLSKRLVENAVLKAVQQY
7	ANDARLVRLSKRLVENAVLKAVQQY
8	ASDARLVRLSKRLVENAVLKAVQQY
9	ASDAKTVRLSKRLVENAVLKAVQQY
10	ANDAKTERLSKRLVENAVLKAVQQY
11	ANDAKTERLSQRLVENAVLKAVQQY
12	ANDAKTQRLSQRLVENAVLKAVQQY
13	PEDAELVRLSKRLVENAVLKAVQQY

14	PEDAELVRLSKRLVENAVLQAVQQY
15	PEDAELVRLSKRLVENAVLNGVQQY
16	PEDAELVRLSKRLVENAVLNGQQQY
17	PEDAELVRLSKRLVENAVLNGNQQY
18	PEDAELVRLSKRLVENAVKNGNQQY
19	PEDAELVRLSKRLVENAVKNGAQDY

Fig. 4

**Unterschiedliche Peptide,
abgeleitet von AKAP18 δ , binden
RII α - und RII β -Untereinheiten der
PKA mit unterschiedlich stark**



■ RII α > RII β

A185RII α Hs1 (10/11) ANDARLVRLNKRLVENAVLKAVQQY

A185RII α Hs2 (10/12) ANDARLVRLPKRLVENAVLKAVQQY

□ RII β > RII α

A185RII β Rn 1 (21/4) ANDARLVRLSKRLVENAVLKAVQQY