



**NORGE**

(19) NO  
(51) Int Cl.

**A61K 38/17 (2006.01)**  
**A61P 3/00 (2006.01)**

**Patentstyret**

---

- (21) Øversettelse publisert 2015.05.18
- (80) Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet 2014.12.17
- (86) Europeisk søknadsnr 12161641.1
- (86) Europeisk innleveringsdag 2009.06.26
- (87) Den europeiske søknadens Publiseringsdato 2012.08.08
- (30) Prioritet 2008.06.26, DK, 200800885
- (84) Utpekte stater AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
- Utpekte samarbeidende stater AL BA RS
- (62) Avdelt fra EP2318032, med inndato 2009.06.26
- (73) Innehaver Orphazyme APS, c/o COBIS A/S Ole Maaløes Vej 3, 2200 Copenhagen N, DK-Danmark
- (72) Oppfinner Jensen, Thomas Kirkegaard, Ingemannsvej 30, 4. th, 1964 Frederiksberg C, DK-Danmark  
Jaattela, Marja Helena, Østerbrogade 52, 3. th, 2100 Copenhagen Ø, DK-Danmark
- (74) Fullmektig Onsagers AS, Postboks 1813 Vika, 0123 OSLO, Norge

- 
- (54) Benevnelse **Anvendelse av Hsp70 som regulator av enzymatisk aktivitet.**
- (56) Anførte publikasjoner  
WO-A-03/061684  
WO-A-2007/150064  
WO-A1-2009/141627  
US-A1- 2005 153 906  
US-A1- 2008 039 400  
ZHU YUNXIANG ET AL: "Dexamethasone-mediated up-regulation of the mannose receptor improves the delivery of recombinant glucocerebrosidase to Gaucher macrophages.", THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS FEB 2004, vol. 308, no. 2, February 2004 (2004-02), pages 705-711, XP002548929, ISSN: 0022-3565  
DAUGAARD ET AL: "The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions", FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 581, no. 19, 31 July 2007 (2007-07-31), pages 3702-3710, XP022165523, ISSN: 0014-5793  
ROTH A. ET AL: "Interaction between Hsp70 and bis(monoacylglycero)phosphate stabilizes lysosomes and promotes cell survival", APMIS, vol. 116, no. 5, May 2008 (2008-05), pages 436-437, XP009123743,  
KIERAN D ET AL: "Treatment with arimoclomol, a coinducer of heat shock proteins, delays disease progression in ALS mice", NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 10, no. 4, 1 April 2004 (2004-04-01), pages 402-405, XP002317058, ISSN: 1078-8956, DOI: 10.1038/NM1021

Denne søknaden er en non-provisional søknad av DK-patentsøknad PA 2008 00885 innsendt 26. juni 2008, som herved er inntatt ved referanse i sin helhet. Alle patent- og ikke-patentreferanser sitert i provisional-søknaden, eller i foreliggende søknad, er også herved inntatt ved referanse i sin helhet.

5

### **Oppfinnelsens område**

Den foreliggende oppfinnelsen vedrører fagområdet for modulering av enzymaktivitet ved å utnytte interaksjonen mellom det molekylære chaperonet Hsp70 og det lysosomale fosfolipidet Bis(monoacylglycero)fosfat (BMP, også kjent under navnet LBPA). Hsp70-BMP-interaksjonen modulerer aktiviteten til BMP-interagerende enzymer i det lysosomale rommet, og den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer slik et middel for å reversere patologien for lysosomale lagringssykdommer.

### **15 Bakgrunn for oppfinnelsen**

De molekylære chaperonene blir funnet i alle deler av en celle der konformasjonsmessige omarrangeringer av proteiner foregår, og selv om proteinsyntese er hovedkilden for ikke-foldede peptider i cellen så blir en utfordring for cellen ved høy temperatur eller andre stimuli som kan gjøre proteiner strukturelt ustabile og dermed utsatt for utfolding og aggregering møtt med en spesifikk cellulær respons som involverer produksjonen av beskyttende proteiner. Denne responsen er et fenomen som observeres i hver celletype som strekker seg fra prokaryoter til eukaryoter og blir referert til som varmesjokk- eller stressresponsen. Proteinene som induseres ved denne responsen er kjent som varmesjokkproteinene (HSP'er), av hvilke det finnes flere familier.

Et primært eksempel på en familie med chaperoner er Hsp70-proteiene. Denne familien har nylig blitt implisert i andre aspekter ved cellulær homeostase ved siden av å virke som et chaperon – mest markert ved sine anti-apoptotiske egenskaper, dens funksjoner i immunitet, og den synlige avhengigheten av kreftceller på oppreguleringen av Hsp70. Videre kan Hsp70 spille en rolle i å passe på lysosomal integritet. Likevel er den molekylære mekanismen for dette fremdeles uklar.

De lysosomale lagringssykdommene er en sjelden gruppe sykdommer, som er kjennetegnet ved akkumuleringen av stoff i det lysosomale rommet og som fører til destabilisering derav, med en resulterende ødeleggende effekt for rammede individer. Stoffer akkumulerer i det lysosomale rommet på grunn av mangler i enzymene som er involvert i deres katabolisme.

Per i dag er ingen behandling tilgjengelig for de fleste lysosomale lagringssykdommer. Den underliggende årsaken til denne gruppen sykdommer er

den manglende evnen for spesifikke lysosomale enzymer til å effektivt katabolisere spesifikke lysosomale stoffer slik som lipider. Derfor har anvendelsen av enzymerstatningsterapi (ERT), ved å tilveiebringe det rekombinante enzymet til pasienten, blitt benyttet for en undergruppe av disse sykdommene, inkludert Gaucher- og Fabry-sykdom. Likevel er ERT en svært dyr form for terapi som kan begrense dens anvendelse i noen områder, og den er også kun effektiv mot den spesifikke typen av sykdom som det rekombinante enzymet har blitt produsert mot. Foreliggende oppfinnelse er rettet på å tilveiebringe nye midler for behandling av de lysosomale lagringssykdommene.

10

### **Oppsummering av oppfinnelsen**

I den foreliggende oppfinnelsen er den molekylære basisen for bidraget av Hsp70 til lysosomal membranstabilitet tilkjennegitt ved å tilveiebringe en forståelse av det molekylære grunnlaget for assosieringen mellom Hsp70 og cellulære membraner – spesielt plasma – og lysosomale membraner.

15

Det er kjent fra litteraturen at Hsp70 kan ha en rolle i å trygge lysosomal integritet. Likevel har den molekylære mekanismen forblitt uklar. I tillegg har heller ikke spørsmålet om hvorvidt denne egenskapen er spesifikk for den stressinduserbare Hsp70 (HspA1A/A1B – betegnet Hsp70 gjennom hele denne undersøkelsen) eller hvorvidt andre Hsp70-familiemedlemmer kan ha den samme egenskapen blitt adressert.

20

Disse ubesvarte spørsmålene foranlediget ett av hovedmålene for denne oppfinnelsen, som var å undersøke den molekylære basisen for den lysosombeskyttende effekten til Hsp70. I så måte ble en fremgangsmåte for produksjonen av rekombinant Hsp70 og mutanter derav satt opp, og det ble også en subcellulær fraksjoneringsprotokoll basert på iodixanol-gradientsentrifugering. En analyse for den direkte undersøkelsen av lysosomal membranintegritet ble etablert basert på fotooksidasjonsindusert permeabilisering av lysosomer, noe som tillot en sanntids-mikroskopisk tilnærming for å evaluere effekten av Hsp70 og andre komponenter med hensyn på deres evne til å enten sensitivisere eller beskytte de lysosomale membranene. Interaksjonen av rekombinant Hsp70 og mutanter med ulike lipider ble undersøkt i ulike in vitro-systemer inkludert målinger av liposom 90°-lysspredning, tryptofanfluorescenceskift og overflate-plasmonresonans (BIAcore). Dannelsen av en konseptuell modell for Hsp70-BMP-interaksjonen ble hjulpet med in silico-elektrostatisk overflatemodellering av Hsp70. For å kunne verifisere in vivo-relevansen av lipidinteraksjonen bevitnet i in vitro-systemene ble BMP-Hsp70-interaksjonen målsøkt med hensyn på begge komponenter. For ytterligere å vise gjennomførligheten av å utnytte denne mekanismen ble modus for celledød indusert ved administrering av cisplatin karakterisert, og lysosomalt Hsp70

25

30

35

ble målsøkt i dette celledødsystemet både i kreftcellelinjer i tillegg til i ikke-transformerte cellelinjer.

For å kunne adressere den molekylære basisen for Hsp70 sitt bidrag til lysosomal membranstabilitet søkte oppfinnerne å etablere et system som kunne eliminere  
5 påvirkningen fra cytosol-Hsp70, d.v.s. målsøking Hsp70 direkte til lysosomene var nødvendig. Elektronmikroskopbilder fra Nylandsted et al., viste at Hsp70 kunne foreligge på innsiden av lysosomene, og det ble slik bestemt å etablere en fremgangsmåte for produksjonen av rekombinant humant Hsp70 (rHsp70) og  
10 forhåpentligvis utnytte det endocytiske maskineriet som en tilførselsvei for rHsp70 direkte til lysosomene. Foreliggende oppfinnere ville dermed omgå behovet for å tilsette lysosomale sorteringssignaler til Hsp70, som potensielt ville forstyrre funksjon og unngå komplikasjoner som kunne fremkomme på grunn av overuttrykking. En endocytisk tilnærming ville videre tillate en titrering av  
15 mengdene av rHsp70 og i et lengre perspektiv åpne muligheter for å undersøke mekanismen for opptak av ekstracellulært Hsp70.

Etter å ha etablert fremgangsmåten for produksjon av Hsp70 ble den merket med fluoroforen Alexa Fluor 488 (Hsp70-AF488) for å validere dens endocytose. Konfokal synliggjøring avslørte at rHsp70 faktisk kunne bli målrettet til lysosomer på denne måten. For å kunne undersøke påvirkningen på lysosomal  
20 membranstabilitet satte oppfinnerne deretter opp en fremgangsmåte for kvantifisering av permeabilisering av lysosomal membran ved nivået for enkle lysosomer og benyttet denne fremgangsmåten til å evaluere effekten av endocytosert Hsp70. Disse fremgangsmåtene dannet basisen for eksempel 1 og 2, der oppfinnerne viste at Hsp70 forsterker celleoverlevelse ved å stabilisere  
25 lysosomer via en pH-avhengig høyaffinitetsbinding til det endo-lysosomale anioniske fosfolipidet bis(monoacylglysero)fosfat (BMP). Det positivt ladde ATPase-domenet til Hsp70 er ansvarlig for bindingen men det substratbindende domenet er også nødvendig for effektiv stabilisering av lysosomer. Interessant nok er denne interaksjonen, og beskyttelsen den gir, avhengig av tryptofan 90, som er  
30 lokalisert i den positivt ladde kilen i ATPase-domenet. Viktig er det at den cytobeskyttende effekten kunne bli oppnådd ved endocytisk levering av rHsp70 og spesifikt reversert ved ekstracellulær administrering av BMP-antistoffer eller Hsp70-inhibitorer.

I tillegg til dette søkte oppfinnerne også å koble mekanismen for Hsp70 sin  
35 beskyttelse av lysosomale membraner til hendelser med tumorigenese og programmert celledød. Oppfinnerne karakteriserte slik celldødsprogrammet som ble igangsatt ved administreringen av et vanlig kjemoterapeutisk middel, cisplatin, og fant at det var uavhengig av kaspaser, med karakterisert ved lysosomal frigjøring av proteaser. Transgent i tillegg til endocytosert Hsp70 er i stand til å forsterke  
40 celleoverlevelse i møte med cisplatin-utfordring ved å stabilisere de lysosomale membranene. Interessant nok viser oppfinnerne at verken målstyring av lysosomalt

Hsp70 selv eller dens lysosomale interaksjonspartner bis(monoacyl(glycero)fosfat (BMP) sensitiviserer transformerte, men ikke ikke-transformerte cellelinjer, prostatacellelinjer for cisplatin noe som tilveiebringer eksperimentelt bevis for utnyttelse av BMP-Hsp70-interaksjonen som et farmakologisk mål for kreftterapi.

- 5 Interessant nok var ikke Hsp70-2, selv om den deler 86 % aminosyrehomologi med Hsp70, i stand til å beskytte de lysosomale membranene direkte. Likevel fører fjerningen av Hsp70-2 også til lysosomal membranpermeabilisering og fortsatt programmert celledød. Denne effekten er ikke avhengig av en direkte interaksjon mellom Hsp70-2 og det lysosomale rommet, mer er heller orkestrert via  
10 nedreguleringen av Linseepitelavledet vekstfaktor (LEDGF) som respons på Hsp70-2-fjerning.

Fremgangsmåtene og resultatene av denne undersøkelsen er adressert i mer detalj i eksempeldelen.

- 15 Etter her å ha utledet det molekylære grunnlaget for den cytobeskyttende effekten av Hsp70 via en interaksjon med lysosomalt BMP for å fremme lysosomal stabilisering, så tilveiebringer disse funnene basisen for den terapeutiske målsøkingen av lysosomale lagringssykdommer.

- 20 Det har nå blitt vist at ved å tilveiebringe rekombinant Hsp70 til celler overraskende snur patologien for lysosomale lagringssykdommer, som vist her for Niemann-Pick-sykdom og Farber-sykdom. Ved å tilveiebringe Hsp70-indusereren benzylalkohol til celler så reverseres videre effektivt patologien til lysosomale lagringssykdommer, som vist her for Niemann-Pick-sykdom.

- 25 Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer slik en fremgangsmåte for behandling av lysosomale lagringssykdommer ved direkte eller indirekte å øke den intracellulære konsentrasjonen av Hsp70 hos individer med behov derav, ved å tilveiebringe en Hsp70-induserer, eller ko-induserer.

- 30 Foreliggende oppfinnelse vedrører i ett aspekt til et bioaktivt middel som er i stand til å øke den intracellulære konsentrasjonen og/eller aktiviteten til Hsp70 for anvendelse som et medikament eller for anvendelse i behandlingen av en lysosomal lagringsforstyrrelse.

I én utførelsesform er nevnte bioaktive middel en Hsp70-induserer eller ko-induserer.

- 35 Det er også et aspekt av foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe en fremgangsmåte for behandling av en lysosomal lagringssykdom som omfatter administrering av det bioaktive middelet ifølge foreliggende oppfinnelse til et individ med behov derav.

I én utførelsesform er nevnte behandling profylaktisk, kurerende eller lindrende.

I én utførelsesform er nevnte lysosomale lagringssykdom valgt fra gruppen som består av Niemann-Pick-sykdom, Farber-sykdom, Krabbe-sykdom, Fabry-sykdom, Gaucher-sykdom, sialidose, metakromatisk leukodystrofi og saposinmangel.

5 I en annen utførelsesform er nevnte lysosomale lagringssykdom karakterisert ved å ha enzymatisk restaktivitet for det defekte enzymet som er involvert i sykdomspatologien.

Foreliggende oppfinnelse vedrører også en fremgangsmåte for behandling av en lysosomal lagringssykdom som omfatter administrering av det bioaktive middelet ifølge foreliggende oppfinnelse i kombinasjon med minst én annen  
10 behandlingsmodalitet.

Også tilkjennegitt er en fremgangsmåte for modulering av den enzymatiske aktiviteten til et enzym, der nevnte enzym interagerer med BMP, der nevnte fremgangsmåte omfatter trinnet med å administrere Hsp70, eller et funksjonelt fragment eller variant derav, i en form som er passende for å tillate interaksjon  
15 mellom BMP og Hsp70, eller nevnte funksjonelle fragment eller variant derav, og den enzymatiske aktiviteten til et enzym som interagerer med BMP.

Også tilkjennegitt er en fremgangsmåte for økning av opptaket av en forbindelse, der nevnte fremgangsmåte omfatter trinnet med å administrere nevnte forbindelse sammen med Hsp70, eller et funksjonelt fragment eller variant derav. I én  
20 utførelsesform er nevnte Hsp70, eller et funksjonelt fragment eller en variant derav, kovalent bundet til nevnte forbindelse. I en annen utførelsesform er nevnte Hsp70 eller et funksjonelt fragment eller variant derav ikke-kovalent bundet til nevnte forbindelse.

En utførelsesform av oppfinnelsen vedrører en fremgangsmåte for oppregulering av  
25 en enzymatisk aktivitet for et enzym assosiert med en lysosomal lagringsforstyrrelse, slik som Niemann-Pick, Gaucher, Farber, Krabbe, Fabry, og sialidose. Fortrinnsvis er nevnte lysosomale lagringsforstyrrelse Niemann-Pick.

Fordi de lysosomale lagringsforstyrrelsene er forårsaket av utilstrekkelig enzymatisk aktivitet er det målet for oppfinnelsen å øke den enzymatiske aktiviteten  
30 for å lindre eller kurere forstyrrelsen.

Hsp70 har blitt vist å interagere med BMP. Fordi BMP virker som en kofaktor for ulike andre proteiner kan interaksjonen mellom Hsp70 og BMP modulere funksjonen til disse ulike andre proteinene. For eksempel virker BMP som en kofaktor for SMase. Slik kan interaksjonen mellom Hsp70 og BMP øke aktiviteten  
35 til SMase. Fordi Niemann-Pick-forstyrrelse er assosiert med en minsket SMase-aktivitet kan Hsp70 lindre eller kurere Niemann-Pick-forstyrrelse ved å øke aktiviteten for aSMase. Likeledes virker BMP som en kofaktor for saposin A, saposin B, saposin C og saposin D. Disse saposinproteinene er impliserte i andre lysosomale lagringsforstyrrelser, og derfor kan Hsp70 lindre eller kurere andre

lysosomale lagringsforstyrrelser ved å øke aktiviteten for et saposin eller for et enzym som er assosiert med nevnte saposin.

I en utførelsesform av oppfinnelsen blir det biologisk aktive middelet administrert sammen med enzymerstatningsterapi i behandlingen av en lysosomal lagringsforstyrrelse. På denne måten kan mengden enzym som er nødvendig bli vesentlig redusert på grunn av den enzymaktiverende effekten av Hsp70.

Også tilkjennegitt er Hsp70 benyttet for å fremme opptaket av enzymer i enzymerstatningsterapi, for derved å øke mengden av enzym som har blitt tatt opp av de relevante cellene.

10

### Definisjoner og forkortelser

	aSMase/ASM	Sur sfingomyelinase
	ADD70	AIF-avledet lokkemiddel for Hsp70
	AIF	Apoptoseinduserende faktor
15	AO	Akridin Orange
	Apaf-1	Apoptotisk proteaseaktiverende faktor-1
	Bag-1	Bcl-2-assosiert ataganogen-1
	Bcl-2	B-cellelymfom/-leukemi 2
	Bid	BH3-interagerende domenedødsagonist
20	BMP	Bis(monoacylglysero)fosfat
	CARD	Kaspaserekrutteringsdomene
	Kaspase	Cystein-aspartatspesifikk protease
	CHIP	Karboksyterminal for Hsp70-bindende protein
	CytC	Cytokrom C
25	DD	Dødsdomene
	DED	Dødseffektordomene
	dsRNA	Dobbeltrådet RNA
	eHsp70	Ekstracellulær Hsp70
	ER	Endoplasmatiske retikulum
30	ERT	Enzymerstatningsterapi
	FADD	Fas-assosiert dødsdomeneinnholdende protein
	HIP	Hsp70-interagerende protein

	HRP	Pepperotperoksidase
	HS	Varmesjokk/stress
	HSE	Varmesjokkelement
	HSF	Varmesjokkfaktor
5	Hsp	Varmesjokkprotein
	HspBP1	Varmesjokkproteinbindende protein 1
	IAP	Inhibitor av apoptoseprotein
	iMEF	Udødeliggjorte murine embryonale fibroblaster
	JNK	c-jun NH2-terminal kinase
10	LAMP-1/-2	Lysosomassosiert membranprotein-1/-2
	LBPA	Lysobisfosfatidsyre
	LEDGF	Linseepitelavledet vekstfaktor
	LMP	Lysosomal membranpermeabilisering
	MIC-1	Makrofaginhitorisk cytokin 1
15	MOMP	Mitokondriell ytre membran permeabilisering
	MPR	Mannose-6-forfatreseptor
	MTT	3-(4,5-dimetyl-2-tiazolyl)-2,5-difenyl-2H-tetrazoliumbromid
	NPD	Niemann-Pick-sykdom
	NPDA	Niemann-Pick-sykdom, type A
20	NPDB	Niemann-Pick-sykdom, type B
	NPDC	Niemann-Pick-sykdom, type C
	NPDD	Niemann-Pick-sykdom, type D
	PCD	Programmert celledød
	PKC	Proteinkinase C
25	POPC	Palmitoyl-oleyl-fosfatidylkolin
	POPS	Palmitoyl-oleyl-fosfatidylserin
	RNAi	RNA-interferens
	ROS	Reaktive oksygenheter
	SD	Standardavvik
30	siRNA	Kort interfererende RNA
	Smac/Diablo	Andre mitokondrieavlede aktivator av kaspaser



tBid	Trunkert Bid
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	TNF-reseptor
TRADD	TNFR-asosiert dødsdomeneprotein
5 TRAF	TNFR-asosiert faktor

Lysosomal lagringsforstyrrelse (LSD): Uttrykket ”lysosomal lagringsforstyrrelse” og ”lysosomal lagringssykdom” blir benyttet som synonymer.

10 Funksjonelt fragment av Hsp70: Uttrykket ”funksjonelt fragment av Hsp70” skal bli ansett å bety ethvert fragment av Hsp70 som har den ønskede funksjonen. Relatert til modulering av enzymatisk aktivitet er et funksjonelt fragment et fragment som er i stand til å modulere den enzymatiske aktiviteten. Relatert til økning av opptaket av et stoff er et funksjonelt fragment av Hsp70 et fragment som er i stand til å øke opptaket av nevnte stoff. Det er på det rene at den eksakte kvantitative effekten av  
15 det funksjonelle fragmentet kan være forskjellig fra effekten av fullengdemolekylet. I noen tilfeller kan det funksjonelle fragmentet faktisk være mer effektivt enn fullengdemolekylet. Videre kan anvendelsen av fragmenter istedenfor fullengdemolekyler være fordelaktig i lys av den mindre størrelsen på fragmentene.

20 Funksjonell variant av Hsp70: Uttrykket ”funksjonell variant av Hsp70” skal bli ansett å bety enhver variant av Hsp70 som har den ønskede funksjonen. Relatert til modulering av enzymatisk aktivitet er en funksjonell variant en variant som er i stand til å modulere den enzymatiske aktiviteten. Relatert til økning av opptaket av et stoff er en funksjonell variant av Hsp70 et fragment som er i stand til å øke opptaket av nevnte stoff. Det er på det rene at den eksakte kvantitative effekten av  
25 den funksjonelle varianten kan være forskjellig fra effekten av fullengdemolekylet. I noen tilfeller kan den funksjonelle varianten faktisk være mer effektiv enn fullengdemolekylet.

Et ”bioaktivt middel” (d.v.s. biologisk aktivt stoff/middel) er ethvert middel, legemiddel, forbindelse, sammensetning av stoffer eller blanding som tilveiebringer  
30 noen farmakologis, ofte fordelaktig, effekt som kan bli vist in vivo eller in vitro. Som benyttet her inkluderer dette uttrykket ytterligere ethvert fysiologisk eller farmakologisk aktivt stoff som produserer en lokalisert eller systemisk effekt hos et individ. Ytterligere eksempler på bioaktive midler inkluderer, men er ikke begrenset til, midler som omfatter eller består av et oligosakkarid, midler som omfatter eller  
35 består av et polysakkarid, midler som omfatter eller består av et eventuelt glykosylert peptid, midler som omfatter eller består av et eventuelt glykosylert polypeptid, midler som omfatter eller består av en nukleinsyre, midler som omfatter eller består av et oligonukleotid, midler som omfatter eller består av et

polynukleotid, midler som omfatter eller består av et lipid, midler som omfatter eller består av en fettsyre, midler som omfatter eller består av en fettsyreester og midler som omfatter eller består av sekundære metabolitter. Det kan bli benyttet enten profylaktisk, terapeutisk, i sammenheng med behandling av et individ, slik som et menneske eller annet dyr. Som benyttet her er et bioaktivt middel et stoff som er i stand til å øke den intracellulære konsentrasjonen og/eller aktiviteten av Hsp70.

Uttrykkene ”legemiddel” eller ”medikament” som benyttet her, inkluderer biologisk, fysiologisk eller farmakologisk aktive stoffer som virker lokalt eller systemisk i menneskekroppen eller i dyrekroppen.

Uttrykkene ”behandle”, ”behandling” og ”terapi” refererer slik de benyttes her i lik grad til kurerende terapi, profylaktisk eller forebyggende terapi og lindrende terapi. Uttrykket inkluderer en tilnærming for å oppnå fordelaktige eller ønskede fysiologiske resultater, som kan bli etablert klinisk. For formål med denne oppfinnelsen inkluderer fordelaktige eller ønskede kliniske resultater, men er ikke begrenset til, lindring av symptomer, minskning av omfang av sykdom, stabilisert (d.v.s. ikke forverring) tilstand, forsinkelse eller bremsing av progresjon eller forverring av tilstand/symptomer, lindring av tilstanden eller symptomene, og remisjon (delvis eller total), uansett om dette er påvisbart eller ikke. Uttrykket ”lindring”, og variasjoner derav, slik det benyttes her, betyr at omfanget og/eller uønskede manifesteringer av en fysiologisk tilstand eller symptom blir minsket og/eller at tidsforløpet av progresjonen blir bremsset eller forlenget, sammenlignet med når preparater ifølge foreliggende oppfinnelse ikke administreres.

En ”behandlingseffekt” eller ”terapeutisk effekt” er manifestert dersom det er en endring i tilstanden som blir behandlet, som målt ved kriteriene som utgjør definisjonen på uttrykkene ”behandle” og ”behandling”. Det foreligger en ”endring” i tilstanden som blir behandlet dersom det foreligger en forbedring på minst 5 %, fortrinnsvis 10 % forbedring, mer foretrukket minst 25 %, enda mer foretrukket minst 50 %, slik som minst 75 %, og mest foretrukket minst 100 % forbedring. Endringen kan være basert på forbedringer i alvorligheten for den behandlede tilstanden hos et individ, eller på en forskjell i hyppigheten av forbedrede tilstander i populasjoner av individer med og uten behandling med det bioaktive middelet, eller med det bioaktive middelet i kombinasjon med et farmasøytisk preparat ifølge foreliggende oppfinnelse.

”Farmakologisk effektiv mengde”, ”farmasøytisk effektiv mengde” eller ”fysiologisk effektiv mengde” av et ”bioaktivt middel” er mengden av et aktivt middel som er til stede i et farmasøytisk preparat som beskrevet her som er nødvendig for å tilveiebringe et ønsket nivå med aktivt middel i blodstrømmen eller på virkningsstedet i et individ (for eksempel lungene, fordøyelsessystemet, kolorektalsystemet, prostata osv.) som skal behandles for å gi en forventet

fysiologisk respons når et slikt preparat administreres. Den nøyaktige mengden vil være avhengig av utallige faktorer, for eksempel det aktive middelet, aktiviteten til preparatet, leveringsinnretningen som benyttes, de fysiske karakteristika for preparatet, påtenkt pasientanvendelse (dvs. antallet doser administrert per dag), pasientoverveielser, og liknende, og kan enkelt bli bestemt av fagfolk på området basert på informasjonen som blir tilveiebrakt her. En ”effektiv mengde” av et bioaktivt middel kan bli administrert i én administrering, eller ved flere administreringer av en mengde som totalt sett gir en effektiv mengde, fortrinnsvis innenfor en periode på 24 timer. Den kan bli bestemt ved å benytte kliniske standardprosedyrer for å bestemme passende mengder og timing av administrering. Det er slik at den ”effektive mengden” kan være resultatet av empirisk og/eller individualisert (tilfelle-etter-tilfelle) bestemmelse gjort av den behandlende helsefagpersonen og/eller individ.

Uttrykkene ”forsterke” og ”forbedre” en fordelaktig effekt, og variasjoner derav, som benyttet her, refererer til den terapeutiske effekten av det bioaktive middelet mot placebo, eller en økning i den terapeutiske effekten i en medisinsk state-of-the-art behandling over det som vanligvis oppnås når et farmasøytisk preparat blir administrert uten det bioaktive middelet ifølge denne oppfinnelsen. ”En økning av de terapeutiske effektene” er manifestert når det foreligger en akselerasjon og/eller økning i intensitet og/eller omfang av de terapeutiske effektene som er oppnådd som et resultat av administrering av det/de bioaktive middelet/midlene. Det inkluderer også forlengning av varigheten av terapeutiske fortrinn. Det kan også manifesteres der en lavere mengde av det farmasøytiske preparatet er nødvendig for å oppnå de samme fortrinn og/eller effekter når det blir koadministrert med bioaktivt middel/midler tilveiebrakt av foreliggende oppfinnelse sammenlignet med administreringen i en større mengde av det farmasøytiske preparatet i fraværet av bioaktivt middel. Den forsterkende effekten fører fortrinnsvis til, men ikke nødvendigvis, behandling av akutte symptomer for hvilke det farmasøytiske preparatet alene ikke er effektivt eller er mindre effektivt terapeutisk. Forsterkning blir oppnådd når det foreligger minst en 5 % økning i de terapeutiske effektene, slik som minst 10 % økning i de terapeutiske effektene når et bioaktivt middel ifølge foreliggende oppfinnelse blir koadministrert med et farmasøytisk preparat sammenlignet med administrering av det farmasøytiske preparatet alene. Fortrinnsvis er økningen på minst 25 %, mer foretrukket minst 50 %, enda mer foretrukket minst 75 %, mest foretrukket minst 100 %.

”Koadministrere” eller ”koadministrering” av bioaktivt middel/midler eller bioaktive midler og state-of-the-art medikamenter, slik de benyttes her, refererer til administreringen av ett eller flere bioaktive midler ifølge foreliggende oppfinnelse, eller administrering av ett eller flere bioaktive midler ifølge foreliggende oppfinnelse og et state-of-the-art farmasøytisk preparat innenfor en viss tidsperiode. Tidsperioden er på fortrinnsvis mindre enn 12 timer, for eksempel mindre enn 6

timer, slik som mindre enn 3 timer. Likevel betyr disse uttrykkene også at det bioaktive middelet og et terapeutisk preparat kan bli administrert sammen.

Uttrykket ”individ” refererer til virveldyr, spesielt til et medlem av en pattedyrart, fortrinnsvis primater inkludert mennesker. I en foretrukket utførelsesform er et  
5 individ slik det blir benyttet her et menneske, mann eller kvinne, i enhver alder.

Et ”individ med behov derav” refererer til et individ som kan dra fordel av foreliggende oppfinnelse. I én utførelsesform er nevnte individ med behov derav et sykdomsrammet individ, der nevnte sykdom er en lysosomal lagrings sykdom.

Uttrykket ”naturlig nukleotid” eller ”nukleotid” refererer til ethvert av de fire  
10 deoksyribonukleotidene, dA, dG, dT og dC (byggsteinene for DNA), og de fire ribonukleotidene, A, G, U og C (byggsteinene for RNA), slik de finnes i naturen. Hvert naturlig nukleotid omfatter eller består essensielt av en sukkerenhet (ribose eller deoksyribose), en fosfatenhet og en naturlig/standard baseenhet. Naturlige  
15 nukleotider binder til komplementære nukleotider i overensstemmelse med velkjente regler for baseparing (Watson og Crick), der adenin (A) pares med tymin (T) eller uracil (U), og der guanin (G) pares med cytosin (C), der tilsvarende basepar er del av komplementære, antiparallele nukleotidtråder. Baseparingen fører  
20 til en spesifikk hybridisering mellom forhåndsbestemte og komplementære nukleotider. Baseparingen er grunnlaget som gjør at enzymer er i stand til å katalysere syntesen av et oligonukleotid som er komplementært med templatoligonukleotidet. I denne syntesen blir byggsteinene (normalt trifosfatene av ribo- eller deoksyderivater av A, T, U, C eller G) styrt av et templatoligonukleotid for å danne et komplementært oligonukleotid med den korrekte, komplementære  
25 sekvensen. Gjenkjenningen av en oligonukleotidsekvens ved dens komplementære sekvens blir mediert ved tilsvarende og interagerende baser som danner basepar. I naturen blir de spesifikke interaksjonene som fører til baseparing styrt av størrelsen på basene og mønstret for hydrogenbindingsdonorer og –akseptorer på basene. En stor purinbase (A eller G) pares med en liten pyrimidinbase (T, U eller C). I tillegg er basepargjenkjenning mellom baser påvirket av hydrogenbindinger som dannes  
30 mellom baser. I geometrien til Watson-Crick-baseparet er en seksleddet ring (et pyrimidin i naturlige oligonukleotider) sidestilt med et ringsystem sammensatt av en fusjonert, seksleddet ring og en femleddet ring (et purin i naturlige oligonukleotider), med en midtre hydrogenbinding som kobler sammen to ringatomer, og hydrogenbindinger på hver side sammenbinder funksjonelle grupper  
35 påhengt hver av ringene, med donorgrupper parete med akseptorgrupper.

Som benyttet her refererer ”nukleinsyre” eller ”nukleinsyremolekyl” til polynukleotider, slik som deoksyribonukleinsyre (DNA) eller ribonukleinsyre (RNA), oligonukleotider, fragmenter generert ved polymerasekjedereaksjonen (PCR), og fragmenter generert ved enhver av ligering, spalting,  
40 endonukleasevirkning og eksonukleasevirkning. Nukleinsyremolekyler kan være

- sammensatt av monomerer som er naturlig forekommende nukleotider (slik som DNA eller RNA), eller analoger av naturlig forekommende nukleotider (for eksempel alfa-enantiomere former av naturlig forekommende nukleotider), eller en kombinasjon av begge. Modifiserte nukleotider kan ha endringer i sukkerenheter og/eller i pyrimidin- eller purinbaseenheter. Sukkermodifiseringer inkluderer for eksempel erstatning av én eller flere hydroksylgrupper med halogener, alkylgrupper, aminer og azidogrupper, eller sukkertyper kan bli funksjonaliserte som estere eller etere. Videre kan hele sukkerenheten bli erstattet med sterisk eller elektronisk tilsvarende strukturer, slik som aza-sukkertyper og karbocykliske sukkeranaloger. Eksempler på modifiseringer i en baseenhet inkluderer alkylerte puriner og pyrimidiner, acylerte puriner eller pyrimidiner, eller andre velkjente heterosykliske substituenten. Nukleinsyremonomerer kan bli koblet sammen med fosfodiesterbindinger eller analoger av slike bindinger. Analogene av fosfodiesterbindinger inkluderer fosforotioat, fosforoditioat, fosforoselenoat, fosforodiselenoat, fosforoanilotioat, fosforoanilidat, fosforoamidat og liknende. Uttrykket "nukleinsyremolekyl" inkluderer også for eksempel såkalte "peptidnukleinsyrer" som omfatter naturlig forekommende eller modifiserte nukleinsyrebaser koblet til en polyamidryggradstruktur. Nukleinsyrer kan være enten enkeltrådede eller dobbeltrådede.
- Uttrykket "komplement av et nukleinsyremolekyl" refererer til et nukleinsyremolekyl som har en komplementær nukleotidsekvens og revers orientering sammenlignet med en referansenukleotidsekvens. Sekvensen 5' ATGCACGGG 3' er for eksempel komplementær med 5' CCGTGCAT 3'.
- Et "isolert nukleinsyremolekyl" er et nukleinsyremolekyl som ikke er integrert i det genomiske DNA for en organisme. For eksempel er et DNA-molekyl som koder for en vekstfaktor som har blitt separert fra det genomiske DNA i en celle et isolert DNA-molekyl. Et annet eksempel på et isolert nukleinsyremolekyl er et kjemisk syntetisert nukleinsyremolekyl som ikke er integrert i genomet til en organisme. Et nukleinsyremolekyl som har blitt isolert fra en spesiell art er mindre enn det komplette DNA-molekylet i et kromosom fra denne arten.
- En "nukleinsyremolekylkonstruksjon" er et nukleinsyremolekyl, enten enkelt- eller dobbeltrådet, som har blitt modifisert ved menneskelig innblanding for å inneholde segmenter av nukleinsyre kombinert og sidestilt i et oppsett som ikke eksisterer i naturen.
- "Lineært DNA" betegner ikke-sirkulære DNA-molekyler som har frie 5'-ender og 3'-ender. Lineært DNA kan bli fremstilt fra lukkede, sirkulære DNA-molekyler, slik som plasmider, ved enzymatisk fordøyning eller fysisk oppbrytning.
- "Komplementært DNA (cDNA)" er et enkeltrådet DNA-molekyl som er dannet fra et mRNA-templat ved enzymet reverstranskriptase. Typisk blir en primer som er komplementær med deler av mRNA benyttet til igangsettelse av reverstranskripsjon.

Fagfolk på området benytter også uttrykket "cDNA" for å refererer til et dobbeltrådet DNA-molekyl som består av et slikt enkeltrådet DNA-molekyl og dets komplementære DNA-tråd. Uttrykket "cDNA" refererer også til en klon av et cDNA-molekyl syntetisert fra et RNA-templat.

- 5 "Heterologt DNA" refererer til et DNA-molekyl, eller en populasjon av DNA-molekyler, som ikke eksisterer naturlig i en gitt vertscelle. DNA-molekyler som er heterologe for en gitt vertscelle kan inneholde DNA som er avledet fra vertscellearten (dvs. endogent DNA) så lenge dette verts-DNA'et er kombinert med ikke-verts-DNA (d.v.s. eksogent DNA). For eksempel er et DNA-molekyl som
- 10 inneholder et ikke-verts-DNA-segment som koder for et polypeptid opererbart koblet til et vert-DNA-segment som omfatter en transkripsjonspromoter ansett for å være et heterologt DNA-molekyl. I motsatt fall kan et heterologt DNA-molekyl omfatte et endogent gen opererbart koblet til en eksogen promoter. Som en annen
- 15 illustrasjon er et DNA-molekyl som omfatter et gen som er avledet fra en villtypecelle ansett å være heterologt DNA dersom dette DNA-molekylet blir introdusert inn i en mutantcelle som mangler villtypegenet.

Et "polypeptid" er en polymer av aminosyrerester som fortrinnsvis kun er bundet sammen ved peptidbindinger, uansett om det er produsert naturlig eller syntetisk. Et polypeptid som er produsert ved uttrykking av et ikke-vert-DNA-molekyl er et

20 "heterologt" peptid eller polypeptid. Uttrykket "polypeptid" dekker slik det benyttes her proteiner, peptider og polypeptider, der nevnte proteiner, peptider eller polypeptider har blitt, eller har ikke blitt, post-translasjonelt modifisert. Post-translasjonell modifisering kan for eksempel være fosforylering, metylering og glykosylering.

- 25 Uttrykket "uttrykking" refererer til biosyntesen av et gen eller et genprodukt.

Å "hybridisere" betyr å anneale nukleinsyretråder fra ulike kilder, det vil si å danne basepar mellom komplementære regioner i to tråder med DNA som ikke opprinnelig var parete. Uttrykket "hybridisering ved stringente betingelser" er definert i

30 overensstemmelse med Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press (1989), 1.101-1.104. Fortrinnsvis betyr hybridisering ved stringente betingelser at etter vasking i 1 time med 1 ganger SSC og 0,1 % SDS ved 50 grader C, fortrinnsvis ved 55 grader C, ner foretrukket ved 62 grader C og mest foretrukket fortrinnsvis ved 68 grader C, spesielt i 1 time i 0,2

35 ganger SSC og 0,1 % SDS ved 50 grader C, fortrinnsvis 55 grader C, mer foretrukket 62 grader C og mest foretrukket ved 68 grader C, så blir et positivt hybridiseringssignal observert.

En strekning med "fullstendig homologi" er definert som en match med paring av nukleotider langs sekvensen med de interagerende nukleotidene; i naturlig forekommende RNA er det paringen av A med U og G med C.

En "promoter" er en nukleotidsekvens som styrer transkripsjonen av et strukturelt gen. Typisk er en promoter lokalisert i den 5' ikke-kodende regionen for et gen, proksimalt i forhold til transkripsjonsstartsetet til et strukturelt gen.

5 Sekvenselementer i promoterer som virker i igangsettelsen av transkripsjon er ofte karakteriserte ved konsensus-nukleotidsekvenser. Dersom en promoter er en induserbar promoter så øker hastigheten på transkripsjon som respons på et induserende middel. I motsatt fall er ikke hastigheten for transkripsjon regulert av et induserende middel dersom promoteren er en konstitutiv promoter. Undertrykkbare promoterer er også kjent.

10 Et "regulatorisk element" er en nukleotidsekvens som modulerer aktiviteten til en promoter. For eksempel kan et regulatorisk element inneholde en nukleotidsekvens som binder til cellulære faktorer som muliggjør transkripsjon eksklusivt eller fortrinnsvis i spesifikke celler, vev eller organeller. Disse typene av regulatoriske elementer er normalt assosiert med gener som blir uttrykt på en "cellespesifikk",  
15 "vevsspesifikk" eller "organellespesifikk" måte.

En "enhancer" er en type regulatorisk element som kan øke effektiviteten av transkripsjon, uavhengig av avstanden eller orienteringen av enhanceren relativt i forhold til startstedet for transkripsjon.

20 En "kloningsvektor" er et nukleinsyremolekyl, slik som et plasmid, cosmid, eller bakteriofag som har evnen til å replikere autonomt i en vertscelle. Kloningsvektorer inneholder typisk ett eller et lite antall restriksjonsendonukleasegjenkjenningsseter som tillater innsetting av et nukleinsyremolekyl på en bestemt måte uten tap av en essensiell biologisk funksjon for vektoren, i tillegg til nukleotidsekvenser som koder for et markørgen som er hensiktsmessig til anvendelse i identifiseringen av  
25 seleksjonen av celler som er transformert med kloningsvektoren. Markørgener inkluderer typisk gener som tilveiebringer tetrazyklin- eller ampicillinresistens.

En "ekspresjonsvektor" er et nukleinsyremolekyl som koder for et gen som blir uttrykt i en vertscelle. Typisk omfatter en ekspresjonsvektor et  
30 transkripsjonspromoter, et gen, og en transkripsjonsterminator. Genuttrykking er vanligvis plassert under kontrollen av en promoter, og et slikt gen er sagt å være "opererbart koblet til" promoteren. Likeledes er et regulatorisk element og en kjernepromoter opererbart koblet dersom det regulatoriske elementet modulerer aktiviteten til kjernepromoterer. Enkle vektorer kalt "transkripsjonsvektorer" er kun  
35 i stand til å bli transkribert men ikke translatert: de kan bli replikert i en målcelle men ikke uttrykt, ulikt ekspresjonsvektorer. Transkripsjonsvektorer blir benyttet for å amplifisere deres innskudd.

En "rekombinant vert" er en celle som inneholder et heterologt nukleinsyremolekyl, slik som en kloningsvektor eller ekspresjonsvektor.

Transfeksjon beskriver introduksjonen av fremmed materiale inn i eukaryote celler. Uttrykket ”transfeksjon” i ikke-virale fremgangsmåter blir oftest benyttet med referanse til pattedyrceller, mens uttrykket ”transformasjon” er foretrukket for å beskrive ikke-viral DNA-overføring i bakterier og eukaryote celler som ikke er fra dyr slik som sopper, alger og planter. Både kjemiske og fysiske fremgangsmåter kan bli benyttet for å transfektere celler.

Et ”polypeptid” er en polymer av aminosyrerester som fortrinnsvis er bundet sammen utelukkende med peptidbindinger, uansett om det er produsert naturlig eller syntetisk. Et polypeptid produsert ved uttrykking i et ikke-vert-DNA-molekyl er et ”heterologt” peptid eller polypeptid. Uttrykket ”polypeptid” dekker slik det blir benyttet her proteiner, peptider og polypeptider, der nevnte proteiner, peptider og polypeptider kan være, men behøver ikke være, post-translasjonelt modifiserte. Post-translasjonell modifisering kan for eksempel være fosforylering, metylering og glykosylering.

En ”aminosyrerest” kan være en naturlig eller ikke-naturlig aminosyrerest koblet ved peptidbindinger eller bindinger som er forskjellig fra peptidbindinger. Aminosyrerestene kan foreligge i D-konfigurasjon eller L-konfigurasjon. En aminosyrerest omfatter en aminoterminal del ( $\text{NH}_2$ ) og en karboksyterminal del ( $\text{COOH}$ ) separert med en sentral del som omfatter et karbonatom, eller en kjede med karbonatomer, der minst ett av disse omfatter minst én sidekjede eller funksjonell gruppe.  $\text{NH}_2$  refererer til aminogruppen som foreligger på den aminoterminalen enden av en aminosyre eller peptid, og  $\text{COOH}$  refererer til karboksygruppen som foreligger på den karboksyterminalen enden av en aminosyre eller peptid. Det generelle uttrykket aminosyre omfatter både naturlige og ikke-naturlige aminosyrer. Naturlige aminosyrer med standardnomenklatur som gitt i J.Biol.Chem., 243:3552-59 (1969) og antatt i 37 C.F.R., avsnitt 1.822(b)(2) tilhører gruppen av aminosyrer som er gitt i tabell 1 nedenfor. Ikke-naturlige aminosyrer er de som ikke er gitt i tabell 1. Eksempler på ikke-naturlige aminosyrer er de som er vist i 37 F.C.R., avsnitt 1.822(b)(4), der alle disse er inkorporert her ved referanse. Ikke-naturlige aminosyrer inkluderer også, men er ikke begrenset til, modifiserte aminosyrerester, L-aminosyrerester og stereoisomerer av D-aminosyrerester.



Symbol		Aminosyre
1-bostav	3-bokstav	
Y	Tyr	Tyrosin
G	Gly	Glysin
F	Phe	Fenylalanin
M	Met	Metionin
A	Ala	Alanin
S	Ser	Serin
I	Ile	Isoleucin
L	Leu	Leucin
T	Thr	Treonin
V	Val	Valin
P	Pro	Prolin
K	Lys	Lysin
H	His	Histidin
Q	Gln	Glutamin
E	Glu	Glutaminsyre
W	Trp	Tryptofan
R	Arg	arginin
D	Asp	Asparaginsyre
N	Asn	Asparagin
C	Cys	Cystein

Tabell 1. Naturlige aminosyrer og deres respektive koder.

- 5 En ”ekvivalent aminosyrerest” refererer til en aminosyrerest som er i stand til å erstatte en annen aminosyrerest i et polypeptid uten vesentlig å endre strukturen og/eller funksjonaliteten til polypeptidet. Ekvivalente aminosyrer har slik lignende egenskaper slik som omfang av sidekjeden, sidekjedepolaritet (polar eller ikke-polar), hydrofobisitet (hydrofob eller hydrofil), pH (sur, nøytral eller basisk) og sidekjedeorganisering av karbonmolekyler (aromatisk/alifatisk). Som slike kan

”ekvivalente aminosyrerester” bli ansett som ”konservative aminosyresubstitusjoner”.

Klassifiseringen av ekvivalente aminosyrer refererer i én utførelsesform til de følgende klassene: 1) HRK, 2) DENQ, 3) C, 4) STPAG, 5) MILV og 6) FYW

- 5 Innenfor betydningen av uttrykket ”ekvivalent aminosyresubstitusjon”, slik det benyttes her, så kan én aminosyre bli substituert med en annen, i én utførelsesform, innefor gruppene av aminosyrer som er indikert her nedenfor:
- i) Aminosyrer som har polare sidekjeder (Asp, Glu, Lys, Arg, His, Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr og Cys)
  - 10 ii) Aminosyrer som har ikke-polare sidekjeder (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Pro og Met),
  - iii) Aminosyrer som har alifatiske sidekjeder (Gly, Ala, Val, Leu, Ile)
  - iv) Aminosyrer som har sykliske sidekjeder (Phe, Tyr, Trp, His, Pro),
  - v) Aminosyrer som har aromatiske sidekjeder (Phe, Tyr, Trp),
  - 15 vi) Aminosyrer som har sure sidekjeder (Asp, Glu),
  - vii) Aminosyrer som har basiske sidekjeder (Lys, Arg, His),
  - viii) Aminosyrer som har amidsidekjeder (Asn, Gln),
  - ix) Aminosyrer som har hydroksysidekjeder (Ser, Thr),
  - x) Aminosyrer som har svovelinnholdende sidekjeder (Cys, Met),
  - 20 xi) Nøytrale, svakt hydrofobe sidekjeder (Pro, Ala, Gly, Ser, Thr),
  - xii) Hydrofile, sure aminosyrer (Gln, Asn, Glu, Asp), og
  - xiii) Hydrofobe aminosyrer (Leu, Ile, Val).

25 Foreliggende oppfinnelse vedrører også varianter av Hsp70, eller fragmenter derav, der substitusjonene har blitt designet ved beregningsanalyse som benytter sekvenshomologi til å forutsi hvorvidt en substitusjon påvirker proteinfunksjon (for eksempel Pauline C. Ng and Steven Henikoff, Genome Research, vol. 11, Utgave 5, 863-874, mai 2001).

30 På grunn av unøyaktigheten i analytiske standardfremgangsmåter er det underforstått at molekylvekter og lengder på polymerer er omtrentlige verdier. Når en slik verdi er uttrykt som ”omtrent X” eller ”omtrentlig X” skal den gitte verdien for X bli forstått å være nøyaktig til +/- 20 %, slik som +/- 10 %, for eksempel +/- 5 %.

## Beskrivelse av tegninger

### Figur 1

5 *Effektene av Hsp70 på aSMase-binding til BMP og ceramidnivåer.* (A) Binding av 0,2  $\mu$ M aSMase til BMP-inneholdende liposomer ved pH 4,5 som en funksjon av forhåndsbundet Hsp70 (eksperiment analogt med eksempel 1, se materialer og fremgangsmåter her for ytterligere detaljer). Hsp70 ble tillatt å dissosiere i 10 min, for herved å nå en lavere asymptote for dissosiasjon før tilsetning av aSMase). (B) Konfokal mikroskopi og kvantifisering av ceramidnivåer i villtype (WT) og Hsp70-transgene (Hsp70-TG) iMEF'er. Immunpåvisning ble utført med et monoklonalt museantistoff mot ceramid (klon 15b4). Kvantifisering ble utført basert på laserskanningmikrografer fra 6 forhåndsdefinerte områder, og etter dette ble kvantifisering utført i LSM Duo programvare.

### Figur 2

15 *Effekten av rHsp70 på sur sfingomyelinaseaktivitet i iMEF-WT (udødeliggjorte murine embryonale fibroblaster, villtype).* rHsp70 ble administrert til celler ved 3 nM, 30 nM og 300 nM, og aktiviteten av aSMase målt (A500 er et mål på produsert ceramid som øker turbiditeten). Kontrollceller ble behandlet med BSA (bovint serumalbumin).

### Figur 3

20 Sur aSMase-aktivitet i ulike fibroblaster: Niemann-Pick-sykdom type A.

### Figur 4

25 *Skjema for hoved-sfingolipidhydrolyse.* Eksohydrolytisk nedbrytning av sfingolipider med korte hydrofile hodegrupper fordrer ikke-enzymatiske kofaktorer, sfingolipidaktivatorproteiner (SAP'er eller saposiner). Både arvelige mangler ved det respektive enzymet i tillegg til for det tilsvarende aktivatorproteinet forårsaker lysosomal lipidlagring og fører til uttrykkningen av ulike sfingolipidoser. Fra Ferlantz et al., Chem.Phys.Lipids, (102) 35-43, 1999.

### Figur 5

30 *Lysosomalt Hsp70 stabiliserer membraner.* (a) Representative konfokale bilder av U-2-OS-celler inkubert med 300 nM rHsp70-AF488 (grønn) i 24 timer, fiksert og farget for lysosomalt integralmembranprotein-1 (LIMP-1, rød). For kolokalisering med andre organellemarkører se figur 9. (b) U-2-OS-celler ble inkubert med 300 nM rHsp70-AF488 i 24 timer før kvantifisering av rHsp70-AF488 i membraner (memb.) og supernatant (sup.) oppnådd ved gjentatte fryse/tine-sykluser og sentrifugering av den lette membranfraksjonen (LMF), Immunblottanalysene av lysosomassosiert membranprotein-2 (LAMP-2) og katepsin B (Cat B) viser validiteten av fraksjoneringsprosedyren. (c) Representative bilder av U-2-OS-celler

eksponert overfor foto-oksidasjon (akridinorange og blått lys). Tapet av lysosomal integritet er visualisert ved tapet av rødt og økning i grønn farging. (d og e) U-2-OS-celler ble inkubert med indikerte rekombinante proteiner (300 nM) i 24 timer og analysert for lysosomal integritet etter foto-oksidasjon. Der det er indikert ble celler behandlet med indikerte siRNA'er i 48 timer før tilsetningen av rekombinante proteiner €. Verdiene representerer gjennomsnitt  $\pm$  SD for tre (d) eller fem € uavhengige eksperimenter. Representative immunblott av indikerte proteiner fra U-2-OS-celler hensatt ubehandlet eller behandlet med kontroll eller Hsp70 siRNA er vist på høyre side. Skalastolper: 20  $\mu$ m (a og c).

### Figur 6

*En pH-avhengig interaksjon mellom Hsp70 og BMP stabiliserer lysosomale membraner.*

(a) Relative endringer i liposom 90° lysspredning ved tilsetning av rHsp70 (i volumer med 0,012 nmol) til liposomer inneholdende indikerte lipider

( $\chi=0,2$ ) ved pH 7,4 (venstre) og pH 6,0 (høyre). (b) U-2-OS-celler ble hensatt ubehandlet (-) eller inkubert med 50  $\mu$ g/ml anti-BMP- eller kontroll-IgG i 7 timer før tilsetning av vehikkel (-) eller 300 nM rHsp70 i 24 timer, og analysert for lysosomal integritet ved foto-oksidasjon.

(c) U-2-OS-celler ble hensatt ubehandlet eller inkubert med 50  $\mu$ g/ml anti-BMP- eller kontroll-IgG i 7 timer før tilsetning av vehikkel (-) eller 25  $\mu$ M cisplatin i 24 timer og analysert for apoptotisk cellemorfologi etter Hoechst 33342-farging.

(d) Interaksjon av rHsp70 og dens mutanter med POPC/BMP ( $\chi_{\text{BMP}}=0,2$ ) liposomer ved pH 6,0 som målt ved endringer i relativ toppfluorescensintensitet. Proteinkonsentrasjoner var 0,36  $\mu$ M (rHsp70), 0,5  $\mu$ M ( $\Delta$ ATP) og 0,35  $\mu$ M ( $\Delta$ PBD) (venstre) eller 0,43  $\mu$ M (høyre), og liposomer ble tilsatt i volumer med 10  $\mu$ M.

(e) Biacore-analyse av interaksjoner mellom villtype-rHsp70 (WT) og dens delesjons- ( $\Delta$ ATP og  $\Delta$ PBD) og punkt- (W90F og W58F) mutanter med immobiliserte LUV'er ved pH 4,5 (gjennomsnittlig diameter: 100 nm, total lipidkonsentrasjon: 0,1 mM, sammensetning: sfingomyelin ( $\chi=0,1$ ), fosfatidylkolin ( $\chi=0,5$ ), kolesterol ( $\chi=0,2$ ) og BMP ( $\chi=0,2$ )). Liposomer ble injisert inntil likevekt (100 s) og indikerte konsentrasjoner (venstre) eller 300 nM (høyre) av rekombinante proteiner i natriumacetatbuffer (50 mM, pH 4,5) ble injisert i 200 s ved en strømningshastighet på 20  $\mu$ l/min etterfulgt av en dissosiasjonsfase i 10 min.  $\Delta$ RU er definert som forskjellen mellom responssignalet målt etter liposomlikevekt og protein-liposom-likevekt.

(f og g) U-2-OS-celler ble hensatt ubehandlet (kontroll) eller inkubert med indikerte rekombinante Hsp70-proteiner (300 nM) i 24 timer, og analysert for lysosomal integritet ved foto-oksidasjon (f), eller behandlet med vehikkel (hvite stolper) eller 25  $\mu$ M cisplatin (svarte stolper) i 24 timer og analysert for den apoptoselignende morfologien (g).

(h) Bånd- og molekylæroverflatemodeller av ATPase-domenet til Hsp70. ATP (van der Waal-overflaterrepresentasjon) kan bli visualisert bundet i den ATP-bindende lommen. Grønne og lilla sfærer betegner van der Waal-overflaten for henholdsvis de koordinerte kalsium- og natriumionene. Legg merke til den positivt ladde delen

av domenet i bunnen og posisjonen til W90. Verdiene representerer gjennomsnitt  $\pm$  SD for et minimum av fem uavhengige eksperimenter (b, c, f og g).

### Figur 7

5 *Hsp70 stimulerer ASM-aktivitet som igjen stabiliserer lysosomer.* (a) Biacore-målinger for binding av 200 nM rASM til BMP-inneholdende liposomer ved pH 4,5 som en funksjon av forhåndsbundet Hsp70. Eksperimentene ble utført som beskrevet i forklaringen på figur 6e med rASM tilsatt i 180 sekunder etter de 10 minuttene med rHsp70-dissosieringsfase etterfulgt av nok en 10 minutters  
10 dissosieringsfase. (b) ASM-aktivitet i lysatene av villtype (WT) og Hsp70 (Hsp70) MEF'er (venstre panel) og i WT MEF'er inkubert med 300 nM rHsp70 i 24 timer eller 48 timer som indikert. (c og d) Viabilitet (MTT-reduksjon), c) og cytosolisk katepsinaktivitet (zFRase, d) i WT og Hsp70 iMEF'er behandlet med indikerte konsentrasjoner av desipramin i 3 timer. € Levende enkeltcellesynliggjøring av tap  
15 av lysosomal integritet (foto-oksidasjon i WT og Hsp70 MEF'er i tillegg til Hsp70 MEF'er inkubert i 3 timer med 12,5 og 25  $\mu$ M Desipiramin (henholdsvis venstre og høyre paneler). Tap av rød (venstre panel) og økning av grønn fluorescens (høyre panel) ble kontinuerlig målt for å gi fulle kinetiske kurver for tapet av lysosomal integritet. 25-60 celler ble undersøkt per eksperiment fra forhåndsdefinerte områder,  
20  $p < 0,001$  for Hsp70 versus WT og Hsp70 + desipiramin versus Hsp70. Alle verdier representerer gjennomsnitt  $\pm$  SD for et minimum av 3 uavhengige eksperimenter.

### Figur 8

25 *rHsp70 stimulerer ASM-aktivitet, stabiliserer lysosomer og minsker det lysosomale volumet i NPDA-fibroblaster.* (a) Levende enkeltcellesynliggjøring av lysosomal stabilitet for primære fibroblaster fra en pasient med NPDA analysert som i figur 3e,  $p < 0,001$ . (b) ASM-aktivitet for NPDA-fibroblaster hensatt ubehandlet eller behandlet med 300 nM rHsp70 i 48 timer (venstre panel) eller med 150 nM rASM alene eller i kombinasjon med 300 nM rHsp70 i 24 timer (høyre panel). P-verdiene ble beregnet fra den oppnådde enzymatiske farten (DA500/mg protein/min). Bildet på høyre side viser det endocytiske opptaket av rASM (grønt) og dets lokalisering til det lysosomale rommet som synliggjort ved samtidig farging med LysoTracker Red. (c) Lysosomal stabilitet for NPDA-fibroblaster hensatt ubehandlet eller  
30 behandlet i 24 timer med 300 nM rHsp70, 150 nM aSMase eller en kombinasjon av rHsp70 og aSMase ble analysert som i figur 3e.  $p < 0,001$  for alle behandlinger sammenlignet med ubehandlede celler. (d) Kvantifisering av lysosomalt område på konfokale tverrsnitt av celler i NPDA-fibroblaster hensatt ubehandlet eller  
35 behandlet i 24 timer med 300 nM BSA, 300 nM rHsp70, 150 nM rASM (150 nM) eller i en kombinasjon av rHsp70 og rASM. Bildet på høyre side viser effektene av rHsp70 (grønt) på volumet av det lysosomale rommet (rødt) i NPDA-fibroblaster.  
40 Hvite piler indikerer celler med endocytosert rHsp70 og minsket lysosomalt rom.

Verdiene representerer gjennomsnitt  $\pm$  SD for et minimum av 3 uavhengige eksperimentene. Skalastolper = 20  $\mu$ M. UT = ubehandlet.

### Figur 9

5 *Kolokalisering av endocytosert rHsp70-AF488 med lysosomer.* Representative konfokale bilder av U-2-OS-celler inkubert med 300 nM rHsp70-AF488 (grønt) i 24 timer, fiksert og farget for de følgende organellemarkørene (rødt): lysosomassosiert membranprotein-1 (LAMP-1, lysosomer), LAMP-2 (lysosomer), LBPA/BMP (6C4, endo-lysosomalt rom), cut c (mitokondrier), SERCA /ER) og golgin-97 (Golgi).  
10 Skalastolper: 20  $\mu$ m (LAMP-1, LAMP-2 og BMP) eller 10  $\mu$ m (Cyt c, SERCA og Golgin-97).

### Figur 10

15 *Interaksjon for rASM (rekombinant aSMase) og BMP i nærvær av rHsp70.* (a) interaksjon av rASM med immobiliserte anioniske liposomer (gjennomsnittlig diameter er 100 nm, total lipidkonsentrasjon er 0,1 mM, og sammensetning: 10 mol% sfingomyelin, 50 mol% fosfatidylkolin, 20 mol% kolesterol og 20 mol% BMP) ved pH 4,5. Responssignaler målt etter bindingen av liposomene ble definert som null. (b) Effekten av forhåndsbundet rHsp70 på etterfølgende binding av  
20 rASM. Indikerte mengder av rHsp70 ble inkubert med immobiliserte anioniske liposomer identisk med (a). Etter en 10 minutters dissosiasjonsfase for rHsp70 ble 200 nM rASM tilsatt i 180 sekunder etterfulgt av 10 minutter dissosiasjon.

### Figur 11

25 *Effekt av det lille molekylet Hsp70-induserer; benzylalkohol på Niemann-Pick type A (NPDA)-pasientfibroblaster.* (A) Induksjon av Hsp70 i NPDA Götz ved benzylalkohol på en doseavhengig måte (proteinuttrykking). (B) Økt stabilitet i NPDA Götz lysosomer etter behandling av NPDA Götz-celler med 40 mM benzylalkohol. (C) Minsket patologi i NPDA Götz-celler etter behandling med 40  
30 mM benzylalkohol, som målt ved lysosomalt tverrsnittsområde (fremgangsmåte forklart i detalj i eksempel 2).

### Figur 12

35 *Effekt av aSMase-fjerning på lysosomal stabilitet.* Så interfererende RNA'er (siRNA) som er målrettet på sur sfingomyelinase (si938, si1257, si1340) og kontroll-siRNA (mm) ble transfektert inn i U2OS-celler ved å benytte oligofektamin (Invitrogen) i overensstemmelse med produsentens retningslinjer. Konsentrasjon av siRNA'er: 50 nM. Etter 72 timer ble knockdown bekreftet via RT-PCR (ikke vist) og celler ble analysert for lysosomal stabilitet via levende enkeltcellesynliggjøring  
40 av akridinorange-mediert foto-oksidasjon. Økning i grønn fluorescens ble kontinuerlig målt for å gi fulle kinetiske kurver for tapet av lysosomal integritet. Slik det fremgår av grafene viser celler behandlet med siRNA'er som er rettet på

aSMase en markert minskning i lysosomal stabilitet. Fremgangsmåten er ytterligere forklart i eksempel 2.

### Figur 13

5 *Behandling av alle NPDA/B-cellelinjer med rHsp70 reverserte dramatisk den lysosomale patologien, d.v.s. reduserer tverrsnittsområdet av lysosomer.*

Kvantifisering av lysosomalt område for konfokale tverrsnitt av celler fra Niemann-Pick-sykdom type A- og B-fibroblaster (NPDA/NPDB) og normale fibroblaster (BJ) hensatt ubehandlet eller behandlet i 24 timer med 300 nM BSA eller dekstran som  
10 kontroll, eller behandlet i 24 timer med 300 nM rHsp70. 150 nM rhaSMase eller en kombinasjon derav. NPDA-celler behandlet i 24 timer med 300 nM rHsp70-W90F (W90F) – Hsp70-mutanten som ikke interagerer med BMP, har en effekt sammenlignbar med kontrollceller. Se eksempel 2 for fremgangsmåter.

### 15 Figur 14

*Økt aktivitet for aSMase i Hsp70-transgene fibroblaster og rHsp70-behandlede NPDA-fibroblaster.* Massespektroskopisk analyse av lipidenheter (sfingomyelin og ceramid som indikert) i udødeliggjorte embryonale muse-fibroblaster (iMEF'er), enten villtype (WT) eller Hsp70-transgene (TG) (A og B), i tillegg til Niemann-Pick-sykdom type A-pasientfibroblaster (NPDA 83/24) enten hensatt ubehandlet  
20 eller behandlet med rHsp70 (C). De lavere nivåene med sfingomyelin og de høyere nivåene med ceramid indikerer en økt aktivitet for sur sfingomyelinase.

### Figur 15

25 *Reversering av patologi i Farber-sykdomspasientfibroblaster.* Kvantifisering lysosomalt område på konfokale tverrsnitt av celler fra Farber-sykdomspasienter. Farber-sykdomspasientfibroblaster (Farber 89/73 og Farber 89/78) ble hensatt ubehandlet eller behandlet i 24 timer med 300 nM BSA eller 300 nM rHsp70 som indikert. Slik det fremgår av figurene reverserer behandlingen av Farber-  
30 sykdomspasientfibroblaster med rHsp70 dramatisk den lysosomale patologien, dvs. reduserer tverrsnittsområdet for lysosomer. Se eksempel 2 for en beskrivelse av fremgangsmåter.

### Figur 16

35 *Hsp70 øker endocytisk opptak av andre molekyler.* Panel A: udødeliggjorte embryonale musefibroblaster (iMEF), enten villtype (WT) eller transgene for Hsp70 (TG) ble inkubert med 20 µg/ml Alexa Fluor-488-merket BSA (BSA\*) i 24 timer. Endocytisk opptak ble verifisert ved fluorescensmikroskopi (ikke vist) (se eksempel 2). Celler ble deretter høstet og analysert for opptak av BSA\*. Slik det fremgår av  
40 figuren hadde de Hsp70-transgene iMEF'ene et signifikant høyere opptak av BSA\* enn villtype-iMEF'er. Panel B: U2OS-osteosarkomceller ble inkubert med 20 µg/ml BSA\* i 24 timer enten med 3000 nM rHsp70 eller uten som indikert. Endocytisk

opptak ble verifisert ved fluorescensmikroskopi (ikke vist) (se eksempel 2). Celler ble deretter høstet og analysert for opptak av BSA\*. Slik det fremgår fra figuren hadde U2OS-cellene i hvilke BSA\* og rHsp70 var tilsatt sammen et signifikant høyere opptak av BSA\* enn celler inkubert med BSA\* alene.

5

### Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

Som vist av foreliggende oppfinnere utøver Hsp70 en stor del av sin cytobeskyttende effekt via en direkte interaksjon med endo-lysosomale membraner, en interaksjon som er orkestrert av et spesifikt fosfolipid, nemlig BMP (bis(monoacylglysero)fosfat). BMP er kun til stede sent i endosomer og lysosomer. Oppfinnerne viser at Hsp70-BMP-interaksjonen er avhengig av det N-terminale ATPase-domenet på Hsp70, spesifikt tryptofan 90, og også at interaksjonen er pH-avhengig. Interaksjonen mellom Hsp70 og BMP er essensiell for den membranstabiliserende effekten til Hsp70, ved å tilveiebringe en plattform for modulering av stabiliteten til en spesifikk undergruppe av lysosomale enzymer, og forhindre destabilisering av lysosomale membraner med pågående frigjøring av lysosomale enzymer. Disse funnene danner basis for en ny og lovende behandlingsmodalitet for de lysosomale lagringsforstyrrelsene, slik det er tilkjennegjort her.

#### Lysosomer

Siden oppdagelsen av lysosomer av de Duve i 1955 har synet på denne organellen vært dominert av dogmet at den kun er enden på den endocytiske veien i dyreceller – en avdeling som huser et stort utvalg hydrolaser, som dersom de blir frigjort inn i cytosol forårsaker nekrose og vevsinflammasjon. Synet på lysosomene som i beste fall et sted for avfallshåndtering, og i verste fall en uspesifikk ”selvmordsbag” har blitt endret dramatisk på grunn av oppdagelsene som tilveiebringer bevis på utallige mer spesifikke oppgaver for lysosomer og deres innhold.

#### *Lysosomale hydrolaser*

Som hovedavdelingen for intracellulær nedbrytning og påfølgende resirkulering av cellulære bestanddeler mottar lysosomene både hetero og autofag last, som i lumen i denne organellen finner sin endelige destinasjon. Nedbrytningen blir utført av et antall sure hydrolaser (fosfataser, nukleaser, glykosidaser, proteaser, peptidaser, sulfataser, lipaser o.s.v.) som er i stand til å fordøye alle cellulære hovedmakromolekyler. Blant de best studerte lysosomale proteasene er familien av katepsinproteaser. Katepsinene kan bli oppdelt i tre undergrupper i overensstemmelse med deres aminosyre i aktivt sete, d.v.s. cystein (B, C, H, F, K, L, O, S, V, W og X/Z), aspartat (D og E) og serin (G) katepsiner. Katepsiner virker optimalt ved den sure pH-verdien i lysosomer (pH 4-5) selv om de fremdeles virker

40



ved nøytral pH på utsiden av lysosomene, selv om de får minsket stabilitet og/eller endret spesifisitet.

5 Inntil nylig ble funksjonen for katepsiner antatt å være begrenset til intralysosomal proteinomsetning, og nedbrytningen av den ekstracellulære matriksen når den blir utskilt. I løpet av de siste få årene har likevel mange katepsiner blitt akkreditert med mer spesifikke funksjoner inkludert roller i beinremodellering, antigenpresentering, epidermal homeostase, prohormonprosessering, beskyttelse av cytotoksiske lymfocytter fra selvdestruksjon etter degranulering, vedlikehold av  
10 sentralnervesystemet hos mus, angiogenese, kreftcelleinvasjon i tillegg til programmert celledød (PCD).

Bortsett fra nedbrytningen av proteiner er lysosomene og de sene endosomene også ansvarlig for metabolismen av cellulære lipider, slik som glykosfingolipider. Via en  
15 serie endolysosomale enzymer hvis korrekte funksjon er avhengig av lipidsammensetningen i de intra-lysosomale membranene. Viktigheten av funksjonell endolysosomal lipidmetabolisme kan enkelt sees ved det faktumet at klinisk sykdom er åpenbar i tilfelle med feilfunksjon i ethvert stadium av svingolipidmetabolisme, noe som gir opphav til sykdommer slik som Tay-Sachs, Sandhoff, Farber, Fabry, Gaucher, Krabbe og Niemann-Picks.  
20

#### *Trafikking til og fra lysosomer*

Trafikkingen av endocytiske membraner har en essensiell rolle i pattedyrcellen via dens levering av membrankomponenter, ulike oppløste molekyler og  
25 reseptorassosierte ligander til et utvalg intracellulære rom. Mens de ulike endocytiske veiene inntil nylig har sett ut til å være enkle, der hovedveiene konvergerer i lysosomene, der nedbrytning og mulig resirkulering tilbake til plasmamembranen vil finne sted, så viser nyere bevis at disse veiene er mer komplekse enn først antatt.  
30

#### *Den endocytiske veien*

Endocytose kan best forstås i kraft av den reseptormedierte endocytosen av molekyler via dannelsen av klatrin-belagte groper, selv om en mengde ikke-klatrinmedierte endocytiske veier (for eksempel makropinocytose, fagocytose,  
35 opptak via caveolae-dannelse og ikke-klatrin-belagt gropdannelse) også har blitt identifisert. Nomenklaturet for det endocytiske systemet har ikke fullt ut blitt standardisert, og det vanlig benyttede uttrykket "tidlig endosom" beskriver faktisk to adskilte endosomale rom – det sorterende endosomet og det endocytiske resirkuleringsrommet (ERC). I den konvensjonelle reseptormedierte endocytiske  
40 veien konsentreres reseptorer slik som transferrinreseptoren, lavtetthetslipoproteinreseptoren og mannose-6-fosfatreseptoren (MPR) i klatrin-belagte groper på overflaten av plasmamembranen i kraft av interaksjoner mellom sekvensmotiver

i deres cytoplasmiske haler og elementer i klatrin-belegningen. Etter å ha sluppet sin klatrin-kappe fusjonerer det nylig dannede endosomet med andre endosomer og allerede eksisterende sorteringsendosomer for å danne et sorteringsendosom. Slik navnet antyder er dets primære oppgave å sortere nylig fangede elementer for deres korrekte lokaliseringer. De tre kjente destinasjonene inkluderer plasmamembranen, de sene endosomene og ERC. Ettersom det sorterende endosomet modnes opplever det et fall i pH som fremmer frigjøringen av reseptorbundne ligander inn i lumen i endosomet. Før den fulle modningen av det sorterende endosomet til det sene endosomet må likevel molekylene utpekt til resirkulering bli sortert. Det er antatt at denne prosessen foregår via avkniplingen av smale tubuler, en prosess som favoriserer sorteringen av membranproteiner fra løste molekyler fordi overflateareal/volum-forholdet til tubulene er større enn det for det vesikulære sorteringsendosomet. De avknepte tubulene kan enten sende membranproteinene direkte tilbake til plasmamembranen (den direkte returnerende veien) eller til ERC. ERC er i hovedsak en samling av tubulære organeller hvis lokalisering varierer mellom celletyper. Mens ERC er i stand til å sortere molekyler til flere ulike destinasjoner så returnerer de fleste molekylene som passerer gjennom ERC til plasmamembranen.

Ettersom det sorterende endosomet modnes faller dets pH i lumen konstant, i hovedsak på grunn av virkningen til vakuolærtype proton-ATPasen (V-ATPase), mens skiftninger i membranlipid- og proteinsammensetning også foregår. Membrantrafikken fra det sorterende endosomet til det sene endosomet og videre inn i lysosomet har vært scenen for noe kontrovers. Uenigheten vedrører hvorvidt denne transporten er best forklart via vesikulær transport eller ved modningen av det sorterende endosomet. Begge modellene tilveiebringer for et intermediat mellom det sorterende og det sene endosomet. Mens modningsmodellen argumenterer med at vesikkelen, som når det sene endosomet, er det som er igjen etter fjerningen av komponenter fra det tidligere sorterende endosomet, så argumenterer den eksisterende avdelingsmodellen med at transporten av molekyler til det sene endosomet foregår via en endocytisk bærervesikkel (ECV), som er en spesifikk transportvesikkel mellom forhåndseksisterende sorterende og sene endosomale avdelinger. Både sorterende og sene endosomal avdelinger er ansett å være strukturelt mer komplekse og ha mer spesialiserte funksjoner enn bærervesiklene.

Nyere undersøkelser av synliggjøring av levende celler har likevel forsonet mekanistiske aspekter for begge modeller, ettersom vesikler som fremkommer fra et dynamisk tidlig endosomnettverk kan gjennomgå en konvertering der de mister den lille GTPase RAB5 og rekrutterer RAB7, som er en markør for sene endosomer. Selv om organiseringen av den endocytiske veien funksjonelt sett er veldefinert så kan nomenklaturen være forvirrende. Funksjonelt er den endocytiske veien definert ved husholdningsreseptorer (for eksempel transferrinreseptoren) og andre lipider og proteiner som blir sirkulert gjennom det tidlige endosomet/sorteringsendosomet der

reseptor-ligand-brytning forekommer – men ikke gjennom sene endosomer der proteolyse kan foregå. Utover disse funksjonelle kriteriene blir likevel bildet mer uklart når det gjelder nomenklatur, ikke minst fordi genereringen av intraluminære vesikler, som starter fra de tidlige endosomene og blir mer og mer fremherskende i løpet av modningen til sene endosomer, har gitt opphav til uttrykket ”multivesikulære legemer” (MVB). Dette uttrykket har blitt benyttet som et annet navn på ECV’ene og sene endosomer i tillegg til for alle endocytiske vesikler inneholdende multivesikulære regioner eller elementer, inkludert hybridorganellen som dannes når lysosomene fusjonerer med sene endosomer (som inneholder multivesikulære strukturer). Sene endosomer inneholder likevel flere lumenale membranvesikler enn tidlige endosomer og er slik ofte avdelingen som blir beskrevet ved uttrykket ”multivesikulære legemer”.

Til slutt har en vesentlig mengde forvirring oppstått på fagområdet fra definisjonen, eller heller mangelen på denne, på sene endosomer versus lysosomer. Begge avdelinger er like sure og de fleste, hvis ikke alle, proteiner som er til stede i lysosomer blir også funnet i sene endosomer. Ifølge modningsmodellen vil de sene endosomene være forløpere for lysosomene. Men gitt den gradvise utviklingen, slik som forslått av teorien, kan en stringent klassifisering være vanskelig å oppnå. Nylig har likevel bevis blitt presentert for at lysosomer og sene endosomer er separate avdelinger, som deretter gjennomgår både ”kissing” hendelser (forbigående fusjoner) i tillegg til fullstendige fusjoneringshendelser, og etter dette kan lysosomene dannes på nytt fra hybridorganellen.

### 25 *Den biosyntetiske veien*

Bortsett fra endocytose kan de sene endosomene også motta last via MPR-veien fra trans-golgi-nettverket (TGN) (den biosyntetiske veien). Den kationavhengige MPR og den kationuavhengige MPR/insulinliknende vekstfaktor-II (IGF-II) reseptoren deler oppgaven med å levere nylig syntetiserte sure hydrolaser fra TGN til lysosomene. Gjenkjenningen av sure hydrolaser ved MPR’er krever tilsetningen av karbohydrater i det endoplasmatiske retikulum og den påfølgende modifiseringen og fosforyleringen av karbohydratrestene til mannose-6-fosfatenheter i cis-golgi. De MPR-bundne hydrolasene blir først levert til endosomer der de dissosierer fra reseptorene på grunn av fallet i lumen-pH, for herved å tillate reseptorene å resirkulere tilbake til TGN. Proteinet som i hovedsak er ansvarlig for sorteringen av MPR’ene til kltrin-belagte groper på TGN er et adapterprotein-1 (AP-1), selv om de Golgi-lokaliserte,  $\gamma$ -øreinneholdende ADP-ribosyleringsfaktorbindende proteinene (GGA’er) også spiller en rolle. Hvorvidt AP-1 og GGA’ene virker sammen eller faktisk styrer de to MPR’ene til ulike subcellulære lokaliseringer er per i dag ikke kjent. AP-1 er del av en adaptorproteinfamilie som består av fire medlemmer, der alle er heterotetramere proteiner som benyttes omfattende i den sekretoriske og endocytiske veiene. I tillegg til den ovenfor nevnte rollen for AP-1 i

klatrin-belagte groper dannet i TGN blir AP-1 og AP-2 benyttet i klatrin-belagte groper under endocytose på plasmamembranen, mens AP-3 og AP-4 virker i trafikeringen av de lysosomassosierte membranproteinene (LAMP).

#### 5 *Den autofage veien*

Autofagi er den tredje godt karakteriserte veien som gjør at makromolekyler når lysosomet. Autofagi er en evolusjonært konservert vei som er involvert i omsetningen av langlivede proteiner og organeller. Den opererer vanligvis ved lave basale nivåer, selv om den for eksempel kan bli induisert ved betingelser med begrenset tilgang på næring. Ved disse betingelsene er makroautofagi den viktigste veien ansvarlig for levering av materiale til lysosomene. Makroautofagi er karakterisert ved en flat membran-cisterneinnpakning rundt cytoplasmiske organeller og/eller en del av cytosol for derved å danne en lukket dobbelmembranbundet vakuole, kalt autofagosomet. Autofagosomet fusjonerer til slutt med lysosomer og danner autofagolysosomer/autolysosomer, der nedbrytningen og resirkuleringen av oppslukte makromolekyler foregår. Opphavet til autofagosommembranen er fremdeles ikke klart. Det endoplasmatiske retikulum, Golgi, en mindre godt karakterisert membranavdeling kalt fagoforen i tillegg til de novo-syntese har alle blitt foreslått som opphav til autofagosommembranen. Nyere fremskritt via gjærgenetikk og den påfølgende oppdagelsen av pattedyrhomologer forbedrer raskt forståelsen av prosessen for autofagi og vil forhåpentligvis også belyse opphavet til autofagosommembranen i nær fremtid.

Det finnes også andre veier ved hvilke lysosomene mottar autofaglast. En heller vilkårlig prosess betegnet mikroautofagi er karakterisert ved oppslukning av cytosol ved lysosomene via innbulninger på lysosommembranen. Ved siden av makromolekyler, som er til stede i det oppslukte cytosol, så kan denne prosessen også involvere opptaket av organeller slik som peroksisomer. Til slutt representerer chaperonmediert transport av cytosolproteiner inn i den lysosomale lumen en mer direkte og selektiv form for autofagi. Denne veien er avhengig av tilstedeværelsen av det kontinuerlig uttrykte medlemmet av varmesjokkprotein-70-familien, Hsc70, på begge sider av den lysosomale membranen. Prosessen er videre avhengig av gjenkjenningen av et KDEL-sekvensmotiv i målproteiner ved LAMP-2a.

#### 35 *Omdannelse av lysosomer og lysosomal utskilling*

Etter fusjon av lysosomer med sene endosomer eller autofagosomer blir lysosomene omdannet fra de resulterende hybridorganellene via sekvestrasjon av membranproteiner og kondensering av lumeninnhold. Av membranproteinene som må fjernes eller resirkulert fra hybridorganellen er de mest åpenbare MPR'ene, ettersom de per definisjon er fraværende fra lysosomer. Lysosomene kan likevel ikke bli ansett som det siste punktet i den endocytiske veien fordi de også er i stand til å danne sekretoriske lysosomer via fusjon med sekretoriske granuler, en prosess

som er  $\text{Ca}^{2+}$ -avhengig og ble først gjenkjent i sekretoriske celler av haematopoietisk opphav. Det eksisterer likevel også bevis for en  $\text{Ca}^{2+}$ -regulert membran-proksimal lysosomal avdeling ansvarlig for eksocytose i ikke-sekretoriske celler. Prosessen for eksocytose er uavhengig av proteinet Rab27a, som er et medlem av Rab-

5 proteinfamilien, som har mer enn 60 medlemmer. Rab'ene er små GTPaser som har regulatoriske nøkkelroller i de fleste membrantransporttrinn inkludert vesikkeldannelse, motilitet, docking og fusjon. Minst 13 Rab-proteiner blir benyttet i de endocytiske veiene for å bestemme skjebnen til de ulike endocyterte molekylene og deres vesikler.

10

#### Programmert celledød

Regulering av totalt celleantall i tillegg til mengden av celler som utgjør de ulike vevene sammen med behovet for en mekanisme for å eliminere uønskede celler er av fundamental viktighet i flercellede organismer. Programmert celledød er

15 middelet for dette, og utstyrer de flercellede organismene med muligheten for å kvitte seg med uønskede celler uten lekkasje av cellulære bestanddeler, for slik å unngå inflammasjonen assosiert med nekrose, som er det konseptuelle motstykket til programmert celledød.

20

#### *Apoptose*

Ordet apoptose blir benyttet på gresk for å beskrive at kronblader faller av blomster, eller løv fra trær, og ble først benyttet av Currie og kollegaer i 1972 for å beskrive en vanlig type programmert celledød, som forfatterne hadde observert i et antall vev og celletyper. Forfatterne hadde lagt merke til at hendelsene de observerte hadde

25 signifikante morfologiske likheter, som var adskilte fra de morfologiske trekkene som karakteriserer celler som gjennomgår patologisk, nekrotisk død og foreslo at disse felles morfologiske trekkene kunne skyldes en identisk underliggende prosess.

Når celler dør ved apoptose gjennomgår de en serie transformerende hendelser.

30

Blant disse hendelsene, og essensielt for den karakteristiske fenotypen, er aktiveringen av kaspaser – som er en familie med cystein-endopeptidaser, som kløyver substrater på spesifikke aspartatrester, og dermed navnet. Aktiveringen av kaspasene fører til proteolytisk prosessering av andre kaspaser i tillegg til en rekke andre endringer i totale proteinaktiviteter i cellene, som til slutt frembringer de

35 karakteristiske morfologiske trekkene som er assosiert med kaspaseaktiveringen og slik per definisjon apoptose. De klassiske apoptosetrekene inkluderer celleinnskrumpning og utbobling av cytoplasmamembranen, kondensering av kromatin i kjernen i klare, geometriske former, fragmentering av DNA til biter på ca 200 bp, den såkalte nukleosomale stigen, cellulær frakobling fra sine naboceller og oppløsning av cellen til små, avlukkede vesikler betegnet apoptotiske legemer. I et

40 flercellet miljø blir disse apoptotiske legemene til slut fagocytosert av makrofager eller naboceller for derved å slutføre fjerningen av den uønskede cellen.

### *Programmert celledød*

Programmert celledød (PCD) er ikke synonymt med apoptose selv om man kan henledes til å tro dette basert på mengden av litteratur som benytter disse uttrykkene kritikkfritt. Uttrykket PCD tar gradvis over, men uttrykket apoptose blir fremdeles benyttet for å beskrive et celledødsprogram som er orkestrert ved aktiveringen av kaspaser, spesielt kaspase-3. Visse cellers evne til å overleve aktiveringen av pro-apoptotiske kaspaser i tillegg til PCD med fullstendig fravær av kaspaseaktivering og kaspaseaktivering som fører til ikke-apoptotisk PCD har likevel avslørt en bemerkelsesverdig plastisitet for det cellulære dødsprogrammet/-programmene og PCD kan slik mer nøyaktig bli definert som celledød som er avhengig av signaler eller aktiviteter inne i den døende cellen. Det har blitt foreslått at PCD kan bli oppdelt i apoptose, apoptoselignende og nekroselignende PCD, i overensstemmelse med den nukleære morfologien til de døende cellene, der hver definisjon er tilordnet atskilte morfologiske karakteristika, der det viktigste trekket er formen på kromatinkondensering eller fraværet av dette, selv om det vil være fordelaktig å skille mellom PCD basert på signaliseringsveiene som deltar under ethvert gitt sett med betingelser som fører til PCD. Denne måten å skille mellom ulike modus for PCD er likevel fremdeles ikke anvendbar fordi trådene som fører frem til de ulike måtene for celledød fremdeles må bli funnet ut av.

### *Nekrose*

Nekrose er den konseptuelle motparten til PCD, fordi den ikke kan bli forhindre på noen annen måte enn å fjerne stimuleringen som gir opphav til nekrosen. Dette celldødsmodus blir vanligvis observert ved patologiske krenkelser av en organisme.

### *Det molekylære maskineriet for programmert celledød*

#### *Apoptose*

Som nevnt i det forrige avsnittet er apoptose definert ved aktiveringen av medlemmer av familien av cystein-endopeptidaser kjent som kaspaser og morfologien assosiert med deres aktivering. Kaspasene finnes i celler som ikke-aktive zymogener, som raskt kan bli aktivert ved proteolytisk prosessering. Denne prosesseringen fremskrider i en hierarkisk kaskade der et apoptotisk stimulus aktiverer en initiator-kaspase (for eksempel kaspase-8 og -9), som i sin tur aktiverer det neste nivået i hierarkiet, effektor-kaspasene (for eksempel kaspase-3, -6 og -7). De siste er ansett for å være de som utfører apoptose fordi de kløyver et antall substrater, der prosesseringen av disse til slutt fører til fenotypen som er assosiert med apoptose. Apoptoseprogrammet kan bli aktivert av en mengde stimuli som grovt sett kan deles opp i ekstracellulære og intracellulære stimuli, der den siste har mitokondriene som en viktig spiller. De ekstracellulære stimuli og den følgende responsen som gir opphav til apoptose blir også referert til som den ytre

signaliseringsveien og er omfattet av en serie hendelser som starter med aktivering av én av en mengde dødsreseptorer slik som Fas/Apo-1/CD95, TNFR eller TRAIL. Ved binding av deres ligand rekrutterer disse reseptorene dødsdomene (DD)-innholdende adaptormolekyler, slik som TRADD (TNFR1-assosiert dødsdomeneprotein) og FADD (Fas-assosiert protein med dødsdomene) via interaksjon med DD som foreligger i reseptorene. Disse adaptormolekylene kan deretter rekruttere kaspase-8 til reseptorkomplekset, der kaspasen blir aktivert, muligens ved proksimitesindusert autokatalytisk prosessering. I visse celler (de såkalte I-cellene) kløyver deretter kaspase-8 direkte og aktiverer prokaspase-3, mens i type-II-celler så er substratet for kaspase-8 det cytoplasmiske proteinet Bid. Kløyvingen av Bid genererer et fragment (trunkert Bid (tBid) som induserer oligomeriseringen, translokeringen og innsettingen av to pro-apoptotiske Bcl-2-familiemedlemmer, Bax og Bak inn i den ytre mitokondriemembranen. Denne innsettingen medierer frigjøringen av elektronbæreren cytokrom-c (CytC) fra mitokondrie-intermembranrommet sammen med en mengde andre proteiner, der de mest fremherskende av disse inkluderer apoptoseinduserende faktor (AIF), Smac/DIABLO som antagoniserer effektene av proteinene kjent som inhibitorer-av-apoptose (IAP)-proteiner og endonuklease G, som er en DNase. Det bør bemerkes at selv om dette er det avgjørende punktet i teoriene om kaspaseaktivering gjennom mitokondrier så har ikke noe konkluderende bevis blitt presentert med hensyn på hvordan innsettingen av Bax og Bak fremmer frigjøringen av cytokrom-c. Ved frigjøring fra mitokondriet akkumuleres CytC i cytoplasma, der det binder til proteinet Apaf-1 (apoptotisk proteaseaktiverende faktor-1) noe som fører til en konformasjonsendring, som fremmer oligomerisering av Apaf-1. Denne oligomeren binder deretter til prokaspase-9 via homotypiske interaksjoner mellom kaspaserekrutteringsdomener (CARD) og fører til dannelsen av et kompleks kalt apoptosomet. Dannelsen av dette komplekset fører til stor forsterket enzymatisk aktivitet for prokaspase-9, der dennes aktivitet fører til den proteolytiske aktiveringen av kaspase-3.

Apoptose kan også bli satt i gang ved intracellulære faktorer som utløser permeabilisering av den ytre mitokondriemembranen (MOMP), en prosess som er kjent som den indre veien. Disse faktorene inkluderer second-messengers assosiert med cellulært stress slik som  $Ca^{2+}$ , NO og arakidonsyre i tillegg til bilirubin, gallesalter og stimuli som kan gi opphav til proteindenaturering og nukleær og mitokondriell DNA-skade slik som ioniserende stråling, varmestress, reaktive oksygenenheter (ROS) og kjemoterapeutiske midler. I tilfellet med nukleær DNA-skade oppdages dette av en mengde proteinkinaser, som er avhengig av formen av DNA-skade men også av midlene som forårsaker den. Aktiviteten til disse kinasene induserer akkumuleringen av p53, som da kan virke som en transkripsjonsfaktor, og gi opphav til en forsterket transkripsjon av pro-apoptotiske gener slik som Bax, Noxa og PUMA, der alle disse kan indusere MOMP. På det mitokondrielle nivået

induserer p53 uttrykkningen av mitokondrielle enzymer som lokalt genererer ROS i tillegg til et mitokondrielt matriksprotein (p53AIP1), hvis overuttrykking utløser tap av mitokondriemembranpotensial og apoptose.

- 5 Induseringen av MOMP ved p53 eller ved virkningen av de indre stimuli beskrevet ovenfor utgjør punktet der den indre og ytre veien konvergerer, der ruten for den indre veien følger den som allerede er beskrevet for den ytre med frigjøring av cytochrom-c, der dannelse av apoptosomet og aktivering av kaspase-3 utgjør de siste trinnene mot bortgangen av den uønskede cellen.

10

#### *Alternativene til apoptose*

I løpet av det siste tiåret har den eksklusive rollen for kaspaser som utøvere av PCD blitt utfordret og mer og mer bevis tyder på at det finnes mer som ikke kan tilskrives kaspaser alene når det gjelder liv og spesielt død for en celle.

15

Fordi nylig utviklede kaspasespesifikke farmakologiske inhibitorer i tillegg til inaktivering av kaspaseveier med faktorer slik som energifjerning, nitrativt(oksidativt stress og medlemmer av inhibitorene av apoptoseprotein (IAP)-familien ikke alltid stoppet progresjonen mot død, avslørte de, eller til og med forsterket, en undergruppe av underliggende kaspaseuavhengige dødsprogrammer. Disse programmene inkluderer dødsreseptorinitierte veier i tillegg til veier som blir utløst av kreftlegemidler, vekstfaktorberøvelse, staurosporin, Bax-relaterte proteiner og fjerning av Hsp70. De morfologiske trekkene ved disse kaspaseuavhengige dødsprogrammene ligner ofte de som blir observert for klassisk apoptose, og eksperimentell støtte for en rolle for andre proteaser slik som katepsiner, calpainer og serinproteaser som essensielle kofaktorer enten oppstrøms eller nedstrøms for kaspaser vokser raskt. Argumentet styrkes ved funnene av at mange ikke-kaspase proteaser er i stand til å kløyve i det minste noen av de klassiske kaspasesubstratene, noe som kan forklare noen av likhetene som blir observert mellom de kaspaseavhengige og – uavhengige dødsprogrammene.

30

Selv om man kan argumentere for relevansen av slike dødsprogrammer, siden de maskeres av effektiviteten til kaspasene, så vokser mengden av bevis for en evolusjonært konserverte rolle for lysosomale katepsinproteaser i celledødsprogrammer som igangsettes som en respons på ulike stimuli slik som dødsreseptorer av tumornekrosefaktorfamilien, hypoksi, oksidativt stress, osmotisk stress, varme og antikreftlegemidler.

35

#### Lysosomal involvering ved programmert celledød

- 40 Mens rollen for lysosomer og deres hydrolaser i opprydningsfasen av PCD, dvs. oppslukningen av apoptotiske celler og legemer ved naboceller eller fagocytter, er godt etablert, har det tatt lang tid å anerkjenne viktigheten av lysosomer og



lysosomale hydrolaser i de mer umiddelbare hendelsene i PCD. En av grunnene til denne forsinkelsen kan tilskrives det faktumet at metylketonpeptidinhibitorer som benyttes vanlig for å undersøke rollen for kaspaser i PCD (for eksempel zVAD-fmk, Ac-DEVD-fmk, Boc-fmk, osv.) også inhiberer andre cysteinproteaser, inkludert flere cysteinkatepsiner. Til og med ni år etter anerkjennelsen av denne kryssreaksjonen blir beskyttende effekter med disse inhibitorene ved konsentrasjoner som er i stand til å inhibere ikke-kaspase proteaser ofte tolket som et bevis for kaspasemedierte dødsveier, og rollen for andre cysteinproteaser i PCD fortsetter slik å bli undervurdert. Oppdagelsen av lysosomal PCD kan ytterligere ha blitt forsinket fordi den lysosomale ultrastrukturen ser ut til å være inntakt i apoptotiske celler som analyseres med elektronmikroskop. Slik har den lysosomale revningen inntil nylig blitt ansett som en alt-eller-ingenting bryter under sene stadier med ukontrollert nekrotisk celledød og vevsautolyse. Likevel har nyere teknikker som tillater en mer nøyaktig vurdering av den lysosomale membranintegriteten avslørt at lysosomer med normal ultrastruktur kan ha lekket ut deler av deres enzymer og at partielle lysosommembranpermeabilisering (LMP) ikke bare forekommer tidlig i mange dødsprogrammer men faktisk kan utløse apoptose og apoptoselignende PCD.

#### 20 *Lysosommembranpermeabilisering (LMP) og dens konsekvenser*

Undersøkelser med ulike forbindelser som direkte er rettet på integriteten til lysosommembranen, slik som H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, L-leucyl-L-leucinmetylester, osmotisk stress, sfingosin, de lysosmotrofiske antibiotika norfloxacin og ciprofloxacin og fotooksidativ lysosomal skade (fotolyse) har overbevisende bevist at moderat lysosomal permeabilisering kan føre til PCD. Et kvantitativt forhold mellom mengden av lysosomal opprivning og celledødsmodus har blitt foreslått for å forklare de svært forskjellige morfologiske resultatene etter LMP. Ifølge denne modellen utløser lave stressintensiteter en begrenset frigjøring av lysosomalt innhold til cytoplasma etterfulgt av apoptose eller apoptoselignende celledød, mens høyintensitetsstress fører til en generalisert lysosomal opprivning og rask cellulær nekrose. Dermed induserer lave konsentrasjoner av sfingosin, som er en sur ceramidasegenerert metabolitt av ceramid med detergentliknende egenskaper ved lav pH, partiell LMP og kaspasemediert apoptose, mens høyere konsentrasjoner fører til massiv LMP og kaspaseuavhengig nekrotisk celledød. I denne modellen kan døden utløst av partiell LMP bli inhibert med farmakologiske inhibitorer av cystein- og aspartatkatepsiner, og økningen i katepsinaktiviteten i cytosol går forut for aktiveringen av kaspaser og mitokondriemembranpotensialendringer, noe som tyder på en direkte rolle for cytosol-katepsiner i dødsprosessen. Viktig er det at rollen til LMP og katepsiner i celledød ikke er begrenset til eksperimentelle modeller som benytter direkte lysosomale opprivere. LMP deltar også i utøvelsen av celledød som respons på et bredt utvalg klassiske apoptosestimuli, slik som aktivering av dødsreseptorer for tumornekrosefaktor (TNF)-reseptorfamilien, interleukin-1, p53-

aktivering, vekstfaktorberøvelse, mikrotubul-stabiliseringsmidler, etopsid, sigma-2-reseptoraktivering, syntetisk retinoid CD437, B-cellereseptoraktivering, staurosporin, osmotisk stress i tillegg til små molekyler identifisert i en screening for nye kreftlegemidler som induserer p53-uavhengig apoptose.

5

*LMP som en utløser av den mitokondrielle apoptoseveien*

De cytotoxiske effektene av LMP er ofte avhengige i det minste delvis av aktiveringen av den mitokondrielle dødsveien. En elegant mikroinjeksjonsundersøkelse har vist at når den er lokalisert i cytosol, så er en enkelt lysosomal hydrolase, katepsin-D, tilstrekkelig til å utløse permeabilisering av den ytre mitokondriemembranen og apoptose i humane fibroblaster ved cellulære doser som tilsvarer halvparten av den totale cellulære katepsin-D-aktiviteten. Katepsin-D er likevel ikke tilstrekkelig til å utløse PCD i alle celledødmodeller som involverer LMP. Andre veldokumenterte mediatorer av LMP-utløst PCD inkluderer cysteinkatepsinene B og C i tillegg til reaktive oksygenenheter. Det bør likevel understrekes at rollen til andre lysosomale hydrolaser, lysosomavledede second-messengers og LMP-indusert forsurening av cytosol ikke definitivt har blitt utelukket. Én av koblingene mellom katepsiner og permeabilisering av mitokondriemembran kan være Bid, som er et proapoptotisk BH3-only protein i Bcl-2-familien som kan bli prosessert og aktivert av flere cysteinkatepsiner, men ikke av katepsin-D, ved cytosolisk pH. Katepsin-D har likevel blitt foreslått å kløyve og aktivere Bid i det sure miljøet i den endolysosomale avdelingen etter TNF-reseptor-1 (TNF-R1)-internalisering. Ifølge denne modellen fører endocytosen av den ligandaktiverede TNF-R1 til sur sfingomyelinasemediert generering av ceramid, som deretter binder til det inaktive katepsin-D og aktiverer denne via autokatalytisk prosessering. Katepsin-D kan også aktivere Bax på en Bid-uavhengig måte som vist i staurosporin-behandlede T-celler. Også i fibroblaster behandlet med ciprofloxacin utløser LMP permeabilisering av mitokondriemembran via en Bid-uavhengig aktivering av Bax og Bak. I dette modellsystemet er Bax-aktiveringen uavhengig av katepsin-D, men er i stedet avhengig av reaktive oksygenenheter. Det bør bemerkes at ciprofloxacinindusert permeabilisering av mitokondriemembran ikke fullt ut er inhibert i celler som mangler både Bax og Bak. De alternative mekanismene som kobler LMP til permeabilisering av mitokondriemembran kan inkludere de direkte effektene av reaktive oksygenenheter og/eller lipidmediatorer slik som arakidonsyre som kan bli generert på en katepsin-B-avhengig måte.

Studier som benytter udødeliggjorte murine embryonale fibroblaster (MEF'er) fra mus som mangler individuelle katepsiner har klart avslørt at ulike katepsiner er engasjert i utøvelsen av celledød avhengig av stimulusen som utløser LMP. Udødeliggjorte MEF'er fra katepsin-B- og -L-manglende mus, men ikke fra katepsin-D-manglende mus, er svært resistente mot TNF, mens det motsatte bildet fremkommer når cellene blir behandlet med staurosporin. Omfattende undersøkelser

40

av TNF-induserte celledødsveier har ytterligere avslørt at rollen til individuelle katepsiner i PCD er avhengig av celletypen som blir studert. Som indikert ovenfor er TNF-indusert død for udødeliggjorte MEF'er avhengig av cysteinkatepsiner, men ikke katepsin-D. Likevel beskytter katepsin-D-fjerning effektivt HeLa-cervixkreftceller mot TNF- og cisplatinindusert cytotoxiskitet. Denne forskjellen ser ikke ut til å skyldes generelle forskjeller mellom humane og murine celler fordi katepsin-B alene eller sammen med andre cysteinkatepsiner også er avgjørende for den effektive TNF-induserte drepingen i humane cervix (ME-180) og bryst (MCF-7)-kreftcellelinjer. Forklaringen på denne diversiteten er per i dag ikke kjent, med varierende uttrykkningsnivåer av individuelle katepsiner og deres inhibitorer i ulike cellelinjer kan spille en rolle. Dermed kan den varierende evnen til ulike dødsstimuli i å regulere uttrykkningsnivåene til individuelle katepsiner eller deres inhibitorer forklare forskjellen i respons på ulike stimuli. Adriamycin og etoposid er for eksempel kjent for å forsterke uttrykkningen av katepsin-D via aktiveringen av p53. Alternativt kan andre signaliseringsveier som induseres ved ulike stimuli samarbeide med spesifikke katepsiner.

#### *Mitokondriuavhengige dødsveier indusert ved LMP*

Viktig er det at de dødelige effektene av LMP og cytosol-katepsiner ikke er begrenset til aktiveringen av den indre apoptoseveien. I småcellet lungekreftceller behandlet med mikrotubulstabiliserende legemidler (paclitaxel, epotilon-B og discodermolid) forekommer LMP tidlig i dødsprosessen og cysteinkatepsiner medierer mikronukleering og celledød på en kaspase-uavhengig måte. I TNF-behandlede humane karsinomcellelinjer foregår LMP nedstrøms for permeabilisering av den ytre mitokondriemembranen. Likevel gir inhiberingen av cysteinkatepsinaktivitet eller – uttrykkning signifikant beskyttelse mot TNF-indusert celledød uten vesentlig å inhibere effektorkaspaseaktiviteten. Videre er katepsin-B ansvarlig for apoptoseliknende endringer slik som kromatinkondensering, fosfatidylserineeksponering og utbøbling av plasmamembranen, i fravær av kaspaseaktivitet i TNF-behandlede WEHI-S-fibrosarkomceller. Videre utløser fjerning av varmesjokkprotein-70 (Hsp70) i ulike humane kreftceller i tillegg til supraoptimal aktivering av T-celler LMP og katepsinmediert apoptoseliknende PCD uten aktiveringen av den indre apoptoseveien. I overensstemmelse med disse dataene kan katepsin-B indusere nukleær apoptose i isolerte kjerner. Slik ser det ut til at katepsiner både har evnen til å virke som initiator- i tillegg til effektorproteaser for programmert celledød avhengig av stimulus og cellulær kontekst. Spesielt bringer deres evne til å mediere PCD i kreftceller, der den mitokondrielle dødsveien er blokkert for eksempel på grunn av overuttrykking av Bcl-2, håp om at behandlinger som induserer LMP kan vise seg effektive i behandling av kreftformer som er resistente mot indusere av klassisk apoptose. Denne ideen er ytterligere støttet av data som viser at udødeliggjøring og transformasjon kan sensitivisere celler overfor den lysosomale celledøden.

### *Signalisering til LMP*

Som beskrevet ovenfor er LMP etterfulgt av frigjøringen av lysosomalt innhold, spesielt katepsiner, ut i cytosol ansett for å være det aktiverende nøkkeltrinnet for den lysosomale dødsveien. Likevel er signaliseringsveien som fører til LMP fremdeles kun i ferd med å bli avslørt. En av de best studerte mekanismene er signaliseringen fra tumornekrosefaktorreseptor-1 selv om oppklaringen av denne signalveien til LMP har blitt gjort svært mye mer komplisert ved svært ulike responser i ulike målceller.

10

Oppsummert kan TNF enten indukere kaspaseavhengig eller kaspaseuavhengig LMP avhengig av cellulær kontekst. I tillegg har også de TNF-beslektede ligandene FasL, TRAIL og TWEAK blitt assosiert med kaspaseuavhengig PCD med enten apoptotisk eller nekrotisk morfologi. Farmakologiske og genetiske studier tyder på at den kaspasemedierte veien som fører fra TNF til LMP er avhengig av kaspase-8 og -9, selv om aktivering av kaspase-9 er svært forskjellig i humane og murine celler. Koblingen mellom kaspaser og LMP er fremdeles ukjent, og selv om TNF-indusert kaspase-8-mediert kløyving av Bid har blitt foreslått å bidra til LMP kunne ikke disse funnene bli verifisert ved TNF-indusert LMP i Bid-manglende iMEF'er. Bid har videre blitt foreslått å være et mål for katepsiner i lysosomale dødsveier og impliserer Bid nedstrøms heller enn oppstrøms for LMP.

25

TNF stimulerer også nedbrytning av svingomyelin til fosforylkolin og ceramid ved aktivering av nøytral svingomyelinase (SMase) på plasmamembranen og sur eller surlig SMase (aSMase) i den lysosomale avdelingen. Begge hendelser har blitt implisert i TNF-induserte celledødsveier, men så langt har kun nøytral SMase blitt koblet til LMP via faktoren som er assosiert med nøytral SMase (FAN). Studier basert på FAN-manglende iMEF'er i tillegg til humane fibroblaster som uttrykker en dominant negativ form av FAN har vist at FAN ikke bare medierer TNF-indusert ceramidproduksjon, men bidrar også til kaspase-8-prosesseringen og celledød. Fordi den TNF-induserte LMP i murine hepatocytter er avhengig av kaspase-8 kan dens reduserte prosessering forklare den reduserte LMP i TNF-behandlede hepatocytter som uttrykker dominant negativ FAN. Rollen til ceramid og dens metabolitter kan likevel ikke utelukkes. Deres rolle i TNF-indusert dødssignalisering er understøttet av den reduserte TNF- og Fas-induserte hepatoksisiteten i mus som mangler aSMase, som blir aktivert nedstrøms for kaspase-8. Spesielt er svingosin, som blir generert fra ceramid i en reaksjon katalysert av det lysosomale enzymet sur ceramidase, en fristende kandidat, ettersom den i motsetning til ceramid kan virke som en detergent, og direkte stabilisere den lysosomale membranen. I tillegg til å øke genereringen av svingosinforløperen ceramid ved å aktivere SMaser regulerer TNF svingosinnivåer også ved katepsin-B-mediert nedregulering av svingosinkinase-1, som er et enzym som konverterer det proapoptotiske svingosin til et anti-

40

apoptotisk sfingosin-1-fosfat. Denne aktiviteten for katepsin-B kan føre til akkumuleringen av sfingosin i lysosomene og kan slik i det minste delvis forklare rekrutteringen av katepsin-B for en effektiv LMP i TNF-behandlede hepatocytter.

- 5 TNF kan også utløse LMP og celledød i nærvær av kaspaseinhibitorer. Denne veien er uavhengig av kaspase-8 men krever det dødsdomeneinneholdende reseptorinteragerende protein-1 (RIP-1) og involverer genereringen av reaktive oksygenenheter. Oksidativt stress kan sammen med intra-lysosomalt jern generere oksygenradikaler via Fenton-type kjemi og kan derved forårsake oksidering av
- 10 lysosomale membranlipider, og føre til destabiliseringen av membranen og frigjøringen av det lysosomale innholdet. De molekylære koblingene mellom RIP-1, oksidativt stress og LMP mangler likevel fremdeles.

- 15 Induseringen av celledød ved flere klassiske apoptoseindusere (for eksempel p53, etoposid og staurosporin) involverer også LMP etterfulgt av katepsinavhengig permeabilisering av mitokondriemembran. Likevel er fremdeles ikke signaliseringsveien fra disse stimuli til LMP avslørt.

#### *Cellulære forsvarsmekanismer mot LMP*

- 20 Gitt det potensielle fatale resultatet av LMP så er det ikke overraskende at celler har utviklet utallige strategier for å motvirke det – enten ved å inhibere LMP selv eller ved å beskytte celler mot at de sure hydrolasene lekker ut i cytosol som en konsekvens av LMP.
- 25 Blant sine mange andre funksjoner har fosfatidylinositol-3-kinase (PI3K) blitt rapportert å beskytte lysosomer mot destabilisering. Inhibering av PI3K i humane vaskulære endotelceller induserer frigjøringen av katepsin-B til cytosol og argumenterer for en heller direkte rolle for PI3K i preservering av lysosomal membranintegritet. Videre sensitiviserer PI3K-inhibitorer cellene overfor de TNF-
- 30 og interleukin-1-induserte lysosomale dødsveiene. Endrede lysosomalfunksjoner og økte uttrykkningsnivåer av katepsiner i kreftceller kan utgjøre en trussel i form av minsket stabilitet for lysosomer. Slik kan PI3K, som vanlig blir aktivert i humane kreftceller, også bidra til lysosomal stabilitet for tumorceller og derved øke deres resistens overfor celledød. Mens rollen til PI3K for stabiliteten til
- 35 tumorcellelysosomer er rent spekulativ så tyder nyere data på en rolle for Hsp70 i beskyttelsen av lysosomer mot membranødeleggende stimuli. Dette arbeidet har i hovedsak blitt utført på tumorceller, som også ofte viser en lokalisering av Hsp70 på plasmamembranen i tillegg til i den endolysosomale avdelingen.
- 40 I tilfellet med frigjøring av lysosomale proteaser til cytosol ved LMP representerer cytosolforeliggende proteaseinhibitorer et bolverk mot dens skadelige konsekvenser. Mens ingen endogene inhibitorer av katepsin-D er kjent så kan

cysteinkatepsiner effektivt bli inhibert av minst tre proteaseinhibitorer i cytosol, dvs. cystatin-A og -B og serinproteaseinhibitor-2A (Spi2A) som nylig ble funnet å inneha sterk inhibitoraktivitet også mot flere cysteinkatepsiner (B, H, K, L og V) og katepsin-G. Viktigheten av disse inhibitorene i å forhindre PCD ved fysiologiske og patologiske betingelser er vist med cystatin-B-manglende mus som oppviser økt apoptose i cerebelare granulceller. Uttrykkningen av Spi2A blir videre induisert ved TNF-behandling via NF- $\kappa$ B-veien, og inhiberer effektivt TNF-indusert cytosolisk katepsin-B-aktivitet og celledød i MEF'er. Interessant nok har det nylig blitt rapportert at i *C.elegans* så kan den cytosoliske serinproteaseinhibitoren (serpin)-6 beskytte mot både induksjonen i tillegg til de dødelige effektene fra lysosomal skade forårsaket av hypo-osmotisk stress i tillegg til en mengde andre typer lysosomalt stress, noe som viser at beskyttelse mot LMP er en evolusjonært konservert mekanisme.

### 15 Lysosomale lagringssykdommer

Lysosomale lagringssykdommer (LSD'er) er en gruppe på omtrent 40 sjeldne, arvelige, metabolske forstyrrelser som skyldes defekter i lysosomal funksjon. LSD'er er forårsaket av lysosomal feilfunksjon vanligvis som en konsekvens av mangel på ett enkelt enzym som er nødvendig for metabolismen av lipider, glykoproteiner eller mucopolysakkarider. Selv om hver forstyrrelse er et resultat av ulike genmutasjoner som translateres til en mangel i enzymaktivitet så har alle et felles biokjemisk karakteristikum – alle lysosomale forstyrrelser stammer fra en unormal akkumulering av stoffer på innsiden av lysosomet.

25 Individuelle LSD'er forekommer med hyppighet på mindre enn 1:100 000, men som en gruppe er forekomsten omtrent 1:5000 – 1:10 000. De fleste av disse sykdommene blir autosomalt recessivt arvet, men noen få er X-bundet recessivt arvet, slik som Fabry-sykdom.

30 De lysosomale lagringssykdommene blir generelt klassifisert ved egenskapen til det primære lagrede materialet som er involvert, og kan bli grovt sett delt i følgende:

- lipidlagringsforstyrrelser (eller lipidoser), i hovedsak sfingolipidoser (inkludert Gauchers og Niemann-Picks sykdommer)
  - gangliosidoser (inkludert Tay-Sachs sykdom)
  - leukodystrofier
- mucopolysakkaridoser (inkludert Hunters syndrom og Hurler sykdom)
- glykoproteinlagringsforstyrrelser (glykoproteinose)
- mucolipidoser.

40 Avhengig av alvorligheten av sykdommen dør enten pasienter i ung og uforutsigbar alder, mange i løpet av noen få måneder eller år etter fødsel, mens andre overlever til tidlig voksenalder for til slutt å måtte gi tapt for de ulike patologiene ved deres

spesifikke forstyrrelse. Symptomene på LSD varierer, avhengig av den spesifikke forstyrrelsen og kan være milde til alvorlige. De kan inkludere utviklingsmessig forsinkelse, bevegelsesforstyrrelse, anfall, demens, døvhet og/eller blindhet. Noen mennesker med LSD har forstørret lever (hepatomegali) og forstørret milt (splenomegali), pulmonale problemer og hjerteproblemer, og unormal benvekst.

De fleste pasienter blir i første omgang screenet med en enzymanalyse, som er den mest effektive fremgangsmåten for å komme frem til en definitiv diagnose. I noen familier der den sykdomsforårsakende mutasjonen/mutasjonene er kjent og i visse genetiske isolater kan mutasjonsanalyse bli utført. Siden det kan foreligge utallige ulike mutasjoner er sekvensering av genet som koder for det spesifikke rammede enzymet noen ganger nødvendig for å bekrefte diagnosen. Prenatal diagnostisering kan være nyttig når det foreligger en kjent genetisk risikofaktor.

Foreliggende oppfinnelse er i én utførelsesform relatert til en fremgangsmåte for behandling av lysosomale lagringsforstyrrelser.

#### Lysosomal sfingolipidhydrolyse

En mengde enzymer er involvert i den lysosomale katabolismen av sfingolipider (eller glykosfingolipider) (se figur 4). Disse enzymene, eller mer spesifikt hydrolaser, er hvert ansvarlig for nedbrytningen av et spesifikt sfingolipid.

De lysosomale sfingolipidhydrolasene interagerer med sfingolipidaktivatorproteiner (SAP eller saposiner) for å stimulere aktiviteten til nevnte hydrolaser. SAP'er er ansett å fremme enzym-/substratinteraksjonen mellom vannløselige enzymer og membranbundne substrater.

Videre er lipidsammensetningen i sene endosomale og lysosomale avdelinger karakterisert ved tilstedeværelsen av negativt ladde fosfolipider slik som BMP og PI (fosfatidylinositol), som også stimulerer aktiviteten til noen hydrolaser. De BMP-avhengige lysosomale hydrolasene inkluderer sialidase,  $\alpha$ -galaktosidase-A, glukosylceramidase,  $\beta$ -galaktosylceramidase, arylsulfatase-A, sur ceramidase og sfingomyelinase.

#### *Kofaktor-saposiner*

Saposiner er små lysosomale proteiner som virker som aktivatorer av ulike lysosomale lipidnedbrytende enzymer. De virker trolig ved å isolere lipidsubstratet fra membranen for slik å gjøre det mer tilgjengelig for de løselige, nedbrytende enzymene. Alle pattedyr-saposiner blir syntetisert som et enkelt forløpermolekyl (prosaposin) som inneholder fire *Saposin-B-domener*, og gir de aktive saposinene etter proteolytisk kløyving, og to *Saposin-A-domener* som blir fjernet i

aktiveringsreaksjonen. Saposin-B-domenen forekommer også i andre proteiner, mange av dem aktive i lysering av membraner.

Prosaposin (PSAP) er et protein som hos mennesker er kodet for av *PSAP*-genet. Dette genet koder for et svært konservert glykoprotein som er en forløper for 4 kløyvingsprodukter: saposin-A, -B, -C og -D. Saposin er et akronym for sfingolipidaktivatorprotein eller SAP. Hvert domene i forløperproteinene er omtrent 80 aminosyrerester langt med nesten identisk plassering av cysteinrester og glykosyleringssteder. Saposinene A-D er primært lokalisert i den lysosomale avdelingen der de fremmer katabolisme av glykosfingolipider med korte oligosakkaridgrupper. Forløperproteinene eksisterer både som et sekretorisk protein og som et integrert membranprotein og har nevrotrofiske aktiviteter. Saposinene A-D er nødvendige for hydrolysen av visse sfingolipider ved spesifikke lysosomale hydrolaser.

Saposinene er viktige koaktivatorer av sialidase (SAP-B),  $\alpha$ -galaktosidase-A (SAP-B), glukosylceramidase (SAP-C),  $\beta$ -galaktosylceramidase (SAP-C), arylsulfatase-A (SAP-B), sur ceramidase (SAP-D). Sur sfingomyelinase (sSMase) er ikke kritisk avhengig av noen av de kjente aktivatorproteinene, men tilstedeværelsen av saposiner øker aktiviteten til dette enzymet. Et femte saposin, GM2-aktivatorprotein, har også blitt karakterisert.

### *BMP*

Bis(monoacylglysero)fosfat (BMP), også kjent som lysobisfosfatsyre, utgjør en stor del av lipidsammensetningen i sene endosomale og lysosomale avdelinger. Den er et negativt ladd fosfolipid, mer spesifikt et glyserolfosfolipid.

BMP ble først isolert fra kaninlunge men er nå kjent for å være en vanlig om enn liten bestanddel i alle dyrevæv. Dens stereokjemiske konfigurasjon er forskjellig fra den for andre glyserolfosfolipider i dyr ved at fosfodiesterenheten er koblet til posisjonene sn-1 og sn-1' på glyserol, heller enn til posisjon sn-3. Det er fremdeles uklart hvorvidt posisjonene sn-3 og 3' eller sn-2 og sn-2' på glyserolenhetene er forestret med fettsyrer. Uansett posisjonene til fettsyrene på glyserolmolekylet kan deres sammensetning være distinktiv med 18:1(n-9) og 18:2(n-6), 20:4 og 22:6(n-3) vanlig forekommende, selv om dette er svært avhengig av det spesifikke vev, celletype eller organelle. Slike distinkte sammensetninger tyder på svært spesifikke funksjoner, der noen fremdeles ikke er avslørt.

BMP er vanligvis en heller liten komponent i dyrevæv. Likevel er den svært anrikt i lysosomene i lever og andre vev, der den kan stå for 15 % eller mer av membranfosfolipidene, og er nå ansett som en markør for denne organelle. Det er de sene endosomene og lysosomene som inneholder det unike lipidet BMP. Faktisk



ser det ut til at det er interne membraner i de sene endosomene som inneholder så mye som 70 % av fosfolipidet som BMP.

5 Dersom den rapporterte tilstedeværelsen av BMP i noen alkalofile stammer av Bacillus-arter kan bli bekreftet, så vil dette være det eneste kjente unntaket fra regelen om at dette lipidet er av strengt pattedyropphav og ikke til stede i prokaryoter, gjær og høyere planter.

10 Det finnes godt bevis på at BMP blir syntetisert fra fosfatidylglyserol, primært i det endosomale systemet. I det som er antatt å være den primære ruten fjerner en fosfolipase A<sub>2</sub> fettsyren fra posisjon sn-2 på fosfatidylglyserol i det første trinnet. I det andre trinnet blir lysofosfatidylglyserolet acylert på sn-2'-posisjonen på hodegruppeglyserolenheten for å gi sn-3:sn-1'-lysobisfosfatsyre, ved hjelp av en transacylasereaksjon med lysofosfatidylglyserol som både acyldonoren og  
15 acylakseptoren. Det tredje trinnet er fremdeles ikke adekvat beskrevet men må involvere fjerning av fettsyren fra posisjon sn-1 på den primære glyserolenheten og en rearrangering av fosforylesteren fra sn-3- til sn-1-posisjonen. Til slutt blir an-2 på den primære glyserolenheten forestret, sannsynligvis ved en  
20 transacyleringsreaksjon med et annet fosfolipid som donor (og dermed den distinkte fettsyresammensetningen). Andre biosynteseveier kan være mulige.

Funksjonen til BMP i lysosomer er under aktiv undersøkelse. Den kan ha en strukturell rolle i utvikling av det komplekse intraluminale systemet, hjulpet av en tendens til ikke å danne et bilag. Den er et kjegleformet molekyl, og den  
25 oppmuntrer til fusjon av membraner ved pH-verdien i endosomene. Videre betyr dens unike stereokjemi at den er resistent overfor fosfolipaser, slik at den vil hindre eller forhindre selvfordøyning av de lysosomale membranene. Fettsyrebestanddelene kan snus raskt ved transacylering men glyserofosfatryggraden er stabil. En ytterligere mulighet er at dette lipidet kan assosieres med spesifikke proteiner i  
30 membrandomener, funksjonelt tilsvarende med flåter. Det har blitt foreslått at det karakteristiske nettverket for BMP-rike membraner inneholdt i multivesikulære sene endosomer regulerer kolesteroltransport ved å virke som et innsamlings- eller redistribueringspunkt. For eksempel, når lysosomale membraner blir inkubert med  
35 antistoffer mot BMP, så har kolesterol en tendens til å akkumulere. Prosessen er under kontroll av Alix/AIP1, som er et protein som spesifikt interagerer med BMP og er involvert i sortering inn i multivesikulær endosomer.

40 BMP er kjent for å omfattende å stimulere enzymene som er involvert i nedbrytningen av glykosylceramider, slik som sfingolipidaktivatorproteiene som saposinene. I dette tilfellet kan den ganske enkelt virke for å tilveiebringe et passende miljø for interaksjonen mellom glykosfingolipidhydrolasene og deres

aktivator. I tillegg har den en dynamisk rolle i å tilveiebringe arakidonat for eikosanoidproduksjon i alveolare makrofager.

5 For BMP-avhengige enzymer blir hydrolysehastigheten økt dramatisk når BMP er til stede i membranen, for aSMase til og med uten nærværet av et aktivatorprotein slik som saposin. I figur 4 markerer en stiplet linje enzymene, eller sykdommen der enzymet er defekt, som viser en avhengighet av BMP.

10 BMP er involvert i patologien for lysosomale lagringssykdommer slik som Niemann-Pick-C-sykdom (kolesterolakkumulering) og visse legemiddelinduserte lipidoser. Ved disse forholdene har dens sammensetning en tendens til å endres for å favorisere enheter som inneholder mindre av de flerumettede komponentene. Den er et antigen gjenkjent av autoimmune sera fra pasienter med en sjelden og dårlig forstått sykdom kjent som antifosfolipidsyndrom, så den er sannsynligvis en faktor i 15 den patologiske basisen for denne sykdommen.

Foreliggende oppfinnelse vedrører i én utførelsesform en fremgangsmåte for behandling av lysosomale lagringsforstyrrelser ved å utnytte interaksjonen mellom Hsp70 og BMP.

20

#### Lipidlagringsforstyrrelsene

Lipidlagringsforstyrrelser (eller lipidoser) er en undergruppe av de lysosomale lagringsforstyrrelsene der skadelige mengder lipider akkumuleres i det intracellulære rommet på grunn av redusert uttrykking eller funksjon for enzymene 25 som er nødvendige for å metabolisere lipider. Over tid kan denne omfattende lagringen av lipider forårsake permanent cellulær skade og vevsskade, spesielt i hjernen, det perifere nervesystemet, leveren, milten og benmargen.

Lipider er en bred gruppe med naturlig forekommende molekyler som inkluderer 30 fettyper, vokstyper, steroler, fettløselige vitaminer (slik som vitamin A, D, E og K), monoglyserider, diglyserider, fosfolipider og andre. De biologiske hovedfunksjonene til lipider inkluderer energilagring, som strukturelle komponenter i cellemembraner, og som viktige signaliseringsmolekyler.

35 Lipider kan bredt bli definert som hydrofobe eller amfifile, små molekyler, der den amfifile egenskapen til noen lipider tillater dem å danne strukturer slik som vesikler, liposomer eller membraner i et vandig miljø. Biologiske lipider stammer i sin helhet eller delvis fra to distinkte typer biokjemiske subenheter, ketoacyl- og isoprengrupper. Ved å benytte denne tilnærmingen kan lipider bli oppdelt i 40 åtte kategorier: fettacyler, glyserolipider, glyserofosfolipider, sfingolipider, sakkarolipider og polyketider (avledet fra kondensering av ketoacylsubenheter), og sterollipider og prenollipider (avledet fra kondensering av isoprensubenheter).

Selv om uttrykket lipid noen ganger blir benyttet som et synonym for fettyper så er fett en undergruppe av lipider kalt triglyserider. Lipider omfatter også molekyler slik som fettsyrer og deres derivater (inkludert tri-, di- og monoglyserider og fosfolipider) i tillegg til andre sterolinneholdende metabolitter slik som kolesterol.

Flere lysosomale lagringsforstyrrelser karakterisert ved akkumuleringen (dvs. lipidlagringsforstyrrelser) har blitt karakterisert, og disse er beskrevet nedenfor.

10 Foreliggende oppfinnelse vedrører i én utførelsesform en fremgangsmåte for behandling av lipidlagringsforstyrrelser.

#### *Niemann-Pick-sykdom*

15 Niemann-Pick-sykdom (NPD) er forårsaket av en defekt i det sure svingomyelinase-enzymet (aSMase), med det systematiske navnet svingomyelinfosfodisterase. Hoveddelen av membransvingomyelinase blir hydrolysert av det lysosomale enzymet aSMase for å gi ceramid (og fosfokolin). Svingomyelin består av en ceramidmembranforankring som er koblet til en kort hydrofil fosforylkolinenhet.

20 Svingomyelinase er ikke kritisk avhengig av noen kjente aktivatorproteiner, noe som gjør det antatte intramolekylære domenet til aSMase og tilstedeværelsen av negativt ladde lipider i lysosomene tilstrekkelig for svingomyelinomsetning. aSMase krever slik ikke tilstedeværelse av saposiner som en kofaktor, likevel stimulerer tilstedeværelsen av saposiner alltid ytterligere aktiviteten for dette enzymet.  
25 (Ferlinz et al., 1999). aSMase-aktivitet blir stimulert ved BMP.

Når svingomyelin ikke kan bli metabolisert passende blir det akkumulert i cellen, og vil til slutt forårsake celledød og feilfunksjonen i hovedorgansystemer. Symptomer kan inkludere mangel på muskelkoordinasjon, hjernedegenerering, læreproblemer, tap av muskeltonus, økt berøringssensitivitet, spasmer, spise og svelgevansker, slurvet tale og forstørret lever og milt. Det kan forekomme uklarhet i cornea og en karakteristisk kirsebærrød ring dannes rundt sentret av retina.

35 Niemann-Pick-sykdom (NPD) har 4 beslektede typer: type A, B, C og D. Alle typer NPD er arvelige i et autosomalt recessivt mønster og kan ramme både menn og kvinner. I type A og B forårsaker utilstrekkelig aktivitet av enzymet aSMase oppbygning av toksiske mengder med svingomyelin. Sykdommen fremkommer når begge kopiene av en persons aSMase-gen (begge alleler) har en mutasjon.

40 Niemann-Pick type A (NPDA), som er den vanligste typen, forekommer hos nyfødte. Den er karakterisert ved gulsott, en forstørret lever og tydelig hjerneskade.

Det finnes per i dag ingen effektiv behandling for personer med type A, og pasienter med type A dør som spedbarn, vanligvis før de er 18 måneder gamle.

5 Niemann-Pick type B (NPDB) involverer en forstørret lever og milt, som vanligvis fremkommer i årene før tenårene, og respiratoriske problemer er vanlig.

Forstørringen av organer og de respiratoriske problemene kan forårsake kardiovaskulært stress og kan føre til hjertesykdom senere i livet. Pasienter med NPDB har generelt lite eller ingen nevrologisk involvering.

10 Benmargstransplantasjon har blitt forsøkt på noen få pasienter med type B, og blandede resultater har blitt rapportert. Den fremtidige utviklingen av enzymerstatnings- og genterapier kan også være nyttig for de som har type B. Barn med type B kan leve i forholdsvis lang tid, men kan kreve tilførsel av oksygen på grunn av lungeskade.

15 NPDA og NPDB er begge forårsaket av den samme enzymatiske mangelen og det finnes mer og mer bevis på at de to formene representerer motsatte ender av et kontinuum. Mennesker med NPDA har generelt lite eller ingen produksjon av aSMase (mindre enn 1 % av normalen) mens de med NPDB har omtrent 10 % av det normale nivået av aSMase.

20

Det finnes omtrent 1200 tilfeller med NPA og NPB i hele verden, der hoveddelen er type B eller en intermediær form.

25 NPDA og NPDB blir diagnostisert ved å måle nivået av aktivitet for aSMase i hvite blodlegemer fra en blodprøve. Mens denne testen vil identifisere personer med type A og B så er den ikke særlig pålitelig for å påvise personer som er bærere (som kun har én ikke funksjonell kopi av ASM-genet). Videre vil testen vise minsket aktivitet for aSMase, men kan ikke forutsi hvorvidt individet har type A eller type B eller en intermediær variant av sykdommen, til dette kreves klinisk evaluering av individet.

30

I visse populasjoner står spesifikke mutasjoner for en høy prosentandel av tilfeller med aSMase-mangel. For NPDA står mutasjonene R469L, fsP330 og L302P for over 95 % av sykdomsforårsakende genetiske endringer i den Ashkenazi-jødiske populasjonen. Direkte testing av individer i denne populasjonen for disse 3  
35 endringene blir benyttet for identifisering av bærere. I andre populasjoner må mutasjonene først bli identifisert i det rammede individet før DNA-bærertesting kan bli utført for familiemedlemmer.

40

For NPDB står aSMase-mutasjonene H421Y og K576N for 85 % av den Saudi Arabiske NPD-populasjonen, mutasjonene L137P, fsP189 og L549P står for 75 % av den Tyrkiske NPDB-populasjonen, mutasjonene S379P, R441X og R474W står for 55 % av den portugisiske NPDB-populasjonen, mutasjonen A196P står for 42 %

av den engelske/skotske NPDB-populasjonen og mutasjonene F480L og DeltaR608 har også blitt identifisert som sykdomsforårsakende hos NPDB-pasienter.

5 Niemann-Pick type C (NPDC) er svært forskjellig fra type A eller B. NPDC-  
pasienter er ikke i stand til å metabolisere kolesterol og andre lipider riktig inne i  
cellen, og er karakterisert ved en defekt som ødelegger transporten av kolesterol  
mellom hjerneceller. Overskuddsmengder av kolesterol og andre lipider  
akkumuleres derved i leveren, milten og hjernen. NPDC forårsaker en sekundær  
10 reduksjon av aSMase-aktivitet som førte til at alle tre typer ble ansett å være former  
av samme sykdom.

Det varierer sterk når type C-symptomer først viser seg i progresjonen av  
sykdommen. Symptomer kan fremkomme så tidlig som ved få måneders alder eller  
så sent som i voksenlivet. Vertikal stirrelammelse (manglede evne til å bevege øyne  
15 opp og ned), forstørret lever, forstørret milt, eller gulsott hos unge barn er sterke  
indikatorer på at NPDC bør bli vurdert. Det er vanlig at kun ett eller to symptomer  
fremkommer i de tidlige stadiene av sykdommen. I de fleste tilfeller begynner  
nevrologiske symptomer å fremkomme mellom en alder på 4 og 10. Generelt er det  
slik at jo senere de nevrologiske symptomene fremkommer jo saktere utvikles  
20 sykdommen.

Type C Niemann-Pick-sykdom har omtrent 500 tilfeller diagnostisert i verden. Det  
er likevel antatt at antallet mennesker som er rammet av NPDC er høyere, men  
diagnostiske vanskeligheter tillater ikke en nøyaktig vurdering av forekomsten.  
25 NPDC ble opprinnelig diagnostisert som en manglende evne til innlæring, mild  
retardasjon, klossethet, og forsinket utvikling av finmotorikk.

Niemann-Pick type D er nå ansett å være en variant av type C. Type D forekommer  
vanligvis hos mennesker med aner fra Nova Scotia. Individuer med type C og D blir  
30 ofte satt på en lavkolesteroldiett, men dens kliniske fortrinn er ikke overbevisende.  
Forventet livslengde for personer med type C og D varierer, men sykdommen er  
alltid dødelig. De fleste dør før fylte 20 år.

NPDC er en sjelden og ekstremt variabel tilstand og gjenkjennes derfor ikke alltid  
35 av helsepersonell. For de spesialistene som mistenker denne diagnosen hos en  
pasient kan den bli bestemt ved å ta en hudbiopsi, dyrke fibroblastene og studere  
deres evne til å transportere og lagre kolesterol. Transporten av kolesterol i cellene  
blir undersøkt ved å måle konvertering av kolesterol fra én form til en annen  
(forestring). Lagringen av kolesterol blir vurdert ved farging av cellene et kjemisk  
40 stoff (filipin) som gløder under ultrafiolett lys.

I 1997 ble NPC1-genet identifisert. Mutasjoner, eller sykdomsforårsakende endringer, i dette genet er ansvarlig for omtrent 95 % av alle NPDC-tilfeller. Siden den gang er over 250 ulike genetiske mutasjoner relatert til NPDC blitt identifisert i dette genet og det andre NPDC-genet, kalt NPC2. Totalt sett, i over 95 % av tilfellene, er det mulig å identifisere de genetiske endringene som har forårsaket sykdommen dersom diagnostiseringen av NPC først har blitt bekreftet ved testingen som er beskrevet ovenfor. Fordi det er så mange unike mutasjoner i disse genene, og det finnes pasienter med klassisk NPD der mutasjoner ikke har blitt identifisert, så er det likevel ikke optimalt å benytte genetisk testing som et generelt diagnostisk redskap for NPDC.

Niemann-Pick-sykdom rammer alle segmenter av populasjonen med tilfeller rapportert fra Nord-Amerika, Sør-Amerika, Europa, Afrika, Asia og Australia. Likevel er hyppigheten funnet å være større i visse populasjoner:

- 15       -       Jødisk Ashkenazi-populasjon (NPDA og NPDB)
- Fransk Kanadisk populasjon fra Nova Scotia (type D – nå ansett som en variant av NPDC)
- Magreb-regionen (Tunisia, Marokko og Algeri) i Nord-Afrika (NPDB)
- 20       -       Spansk-Amerikansk populasjon i sydlige deler av New Mexico og Colorado (NPDC).

Foreliggende oppfinnelse vedrører i én utførelsesform en fremgangsmåte for behandling av Niemann-Pick-sykdom, ved modulering av sur sfingomyelaseenzym (aSMase)-aktivitet.

#### *Farber-sykdom*

Farber-sykdom er forårsaket av en defekt i det sure ceramidaseenzymet. Sur ceramidase er ansvarlig for konverteringen av ceramid til sfingosin (og fettsyre), og defekten fører slik til en akkumulering av ceramider. Dens aktivitet blir stimulert av BMP og er avhengig av saposiner.

Sur ceramidase er også kjent som N-acylsfingosinamidohydrolase, og er kodet for av genet ASAH1. Den er et heterodimert protein som består av en ikke-glykosylert alfa-subenhet og en glykosylert beta-subenhet som blir kløyd til det modne enzymet posttranslasjonelt.

Farber-sykdom er også kjent som Farbers lipogranulomatose, ceramidmangel, fibrocytisk dysmucopolysakkaridose og lipogranulomatose. Den er en ekstremt sjelden autosomal recessiv sykdom som er karakterisert ved unormalheter i leddene, leveren, strupen, vev og sentralnervesystem. Leveren, hjertet og nyrene kan også bli

rammet. Symptomer blir typisk oppdaget i de første få ukene etter fødsel og inkluderer svekket motorisk og mental evne og vanskeligheter med å svelge. Andre symptomer kan inkludere artritt, oppsvulmede lymfeknuter og ledd, heshet, knuter under huden (og noen ganger i lungene og andre deler av kroppen), kronisk  
5 forkortning av muskler eller sener rundt ledd og oppkast. Rammede personer kan være avhengig av innsetting av pusterør. I alvorlige tilfeller er leveren og milten forstørret.

Per i dag finnes ingen spesifikk behandling for Farber-sykdom. Kortikosteroider  
10 kan hjelpe til å lindre smerte. Knuter kan bli behandlet med benmargstransplantater i visse tilfeller, eller kan bli kirurgisk redusert eller fjernet. De fleste barn med den klassiske formen for Farbers sykdom dør i 2 års alderen, vanligvis fra lungebetennelse. Individuer som har en mildere form for sykdommen kan leve opp i tenårene.

15 Foreliggende oppfinnelse vedrører i én utførelsesform en fremgangsmåte for behandling av Farber-sykdom, ved modulering av aktiviteten til surt ceramidaseenzym.

#### 20 *Krabbe-sykdom*

Krabbe-sykdom er forårsaket av en defekt i  $\beta$ -galaktosylceramidaseenzymet. B-galaktosylceramidase er ansvarlig for konverteringen av galaktosylceramid til ceramid, og defekten fører slik til en akkumulering av galaktosylceramid. Dens aktivitet blir stimulert av BMP og er avhengig av saposiner.

25 Krabbe-sykdom er også kjent som globoidcelleleukodystrofi eller galaktosylceramidlipidose. Den er en sjelden, ofte dødelig degenerativ autosomt recessiv forstyrrelse som rammer myelinkappen i nervesystemet. Den forekommer i omtrent 1 av 100 000 fødsler. En høyere forekomst, omtrent 1 av 6000, har blitt  
30 rapportert i noen arabiske samfunn i Israel.

Krabbe-sykdom er forårsaket av mutasjoner i GALC-genet, som forårsaker en feil i galaktosylceramidaseenzymet. Lipidoppbygningen rammer veksten til nervenes beskyttende myelinkappe (belegningen som isolerer mange nerver) og forårsaker  
35 alvorlig degenerering av motoriske ferdigheter.

Nyfødte med Krabbe-sykdom er normale ved fødsel. Symptomer fremkommer i en alder av 3 til 6 måneder med irritabilitet, feber, stive lemmer, anfall, vanskeligheter med spising, oppkast og nedbremsing av mental og motorisk utvikling. I de første  
40 stadiene av sykdommen tar leger ofte symptomene for å tilhøre cerebral lammelse. Andre symptomer inkluderer muskelsvakhet, spasmer, døvheter, optisk atrofi og blindhet, paralyse, og vanskeligheter med svelging. Forlenget vekttap kan også

forekomme. Det eksisterer også tilfeller av Krabbe-sykdom som oppstår hos barn og i voksen alder, som har liknende symptomer men senere progresjon. Hos nyfødte er sykdommen generelt dødelig før en alder på 2 år. Pasienter der Krabbe-sykdom oppstår sent har en tendens til å ha en langsommere progresjon for sykdommen og lever vesentlig lengre.

Selv om det ikke finnes noen kur for Krabbe-sykdom har benmargstransplantasjon blitt vist å avhjelpe tilfeller i den tidlige utviklingen av sykdommen. Generelt er behandling av forstyrrelsen symptomatisk og støttende. Fysisk terapi kan hjelpe til med å opprettholde eller øke muskeltonus og sirkulasjon. En nyere undersøkelse rapporterer at navlestrengblodtransplantering har vært vellykket i å stoppe sykdommen så lenge denne gis før åpenlyse symptomer fremkommer.

Foreliggende oppfinnelse vedrører i én utførelsesform en fremgangsmåte for behandling av Krabbe-sykdom, ved modulering av  $\beta$ -galaktosylceramidaseenzymaktivitet.

#### *Fabry-sykdom*

Fabry-sykdom er forårsaket av en defekt i  $\alpha$ -galaktosidase-A enzymet.  $\alpha$ -galaktosidase-A er ansvarlig for konverteringen av globotriaosylceramid til laktosylceramid, der defekten slik fører til en akkumulering av globotriaosylceramid (også forkortet som Gb3, GL-3 eller ceramidtriheksosid). Dens aktivitet blir stimulert ved BMP og er avhengig av saposiner.

Fabry-sykdom er også kjent som Anderson-Fabry-sykdom, Angiokeratoma corporis diffusum, Rüter-Pompen-Wyers syndrom, ceramidtriheksosidose og Sweely-Kilonsky-sykdom. Den er en X-bundet recessiv (arvelig) sykdom som rammer hemizygoter menn, i tillegg til både heterozygoter og homozygoter kvinner, der menn har en tendens til å oppleve de mest alvorlige kliniske symptomene mens kvinner varierer fra nesten ingen symptomer til de som er like alvorlige som hos menn. Denne variasjonen er antatt å skyldes X-inaktiveringsmønstrene under embryonal utvikling av kvinner.

Symptomer inkluderer anhidrose (mangel på svetting), utmattethet, angiokeratomer (godartet kutan skade på kapillærer), brennende smerte i ekstremiteter og okular involvering. Angiokeratomer er små, smertefrie papiller som fremkommer på enhver region av kroppen, men er vanligst på lårene, rumpa, nedre mageregion og skrittet. Kosmetisk okular involvering kan foreligge som viser cornea verticillata (også kjent som vortekskeratopati). Keratopati kan være det fremherskende trekket hos asymptotiske bærere, og må bli skilt fra andre årsaker til vortekskeratopati (for eksempel legemiddeldeponering i cornea). Andre okulære funn som kan bli observert inkluderer konjunktivale aneurismer, posteriære spoke-liknende



katarakter, papillødem, makulært ødem, optisk atrofi og retinal vaskulær utvidelse. Nyrekomplikasjoner er en vanlig og alvorlig effekt av sykdommen, nyreutilstrekkelighet og nyresvikt kan forverres gjennom livet. Proteinuri er ofte det første tegnet på nyreinvolvering. Hjertekomplikasjoner kan også forekomme, hjerterelaterte effekter forverres med alder og kan føre til økt risiko for hjertesykdom. Cerebrovaskulære effekter fører til en økt risiko for slag. Andre symptomer inkluderer tinnitus, vertigo, kvalme og diaré.

Symptomer blir typisk først opplevd i tidlig barndom og kan være svært vanskelige å forstå, den sjeldne forekomsten av Fabry-sykdom for mange klinikere fører til feildiagnostisering og ignorering. Manifesteringer av sykdommen øker vanligvis i antall og alvorlighet ettersom et individ blir eldre.

Inntil nylig var behandlingen av Fabry-sykdom rettet på de symptomatiske effektene. Per i dag blir den likevel behandlet på cellulært nivå via enzymerstatningsterapi (ERT) ved å benytte Agalsidase alfa (Replagal) og Agalsidase beta (Fabrazyme). Kostnaden for disse legemidlene er problematisk (omtrent 250 000 US-dollar i året per pasient) og forblir en barriere for mange pasienter i noen land. Enzymerstatningsterapi (infusert typisk hver andre uke) kan bli utført hjemme hos pasienten av pasienten selv. Enzymerstatningsterapi er ikke en kur, og den må bli infusert gjentatte ganger for maksimal nytte.

Foreliggende oppfinnelse vedrører i én utførelsesform en fremgangsmåte for behandling av Fabry-sykdom, ved modulering av aktiviteten til enzymet  $\alpha$ -galaktosidase.

#### *Gaucher-sykdom*

Gaucher-sykdom er forårsaket av en defekt i enzymer glukosylceramidase (også kjent som glukocerebrosidase og sur  $\beta$ -glukosidase), som er et protein som er på 55,6 kD, og har en lengde på 497 aminosyrer. Glukosylceramidase er ansvarlig for konverteringen av glykosylceramid (eller glukocerebrosid) til ceramid, og defekten fører slik til en akkumulering av glykosylceramid. Dens aktivitet blir stimulert av BMP og er avhengig av saposiner.

Gauchers sykdom er den vanligste av de lysosomale lagringssykdommene. Fettmateriale kan samles i milten, lever, nyrer, hjerne og benmarg. Symptomer kan inkludere forstørret milt og lever, feilfunksjon i lever, skjelettforstyrrelser og beinlesjoner som kan være smertefulle, alvorlige nevrologiske komplikasjoner, svelling av lymfeknuter og (av og til) nærliggende ledd, oppblåst buk, et brunaktig anstrøk i huden, anemi, lavt antall blodplater og gule fettdeponeringer på sklera. De personene som er mest alvorlig rammet kan også være utsatt for infeksjon.

Sykdommen viser autosomal recessiv arvelighet og rammer derfor både menn og kvinner. Ulike mutasjoner i glukosylceramidase bestemmer den gjenværende aktiviteten av enzymet, og i stor grad fenotypen. Forskning tyder på at heterozygote for spesifikke glukosylceramidasemutasjoner har en økt risiko for Parkinsons sykdom og spesifikke maligniteter (non-Hodgkin lymfom, melanom og pankreaskreft).

Glykosylceramid er en bestanddel i cellemembranen til røde og hvite blodlegemer. Makrofagene som fjerner disse cellene er ikke i stand til å eliminere avfallsproduktet, som akkumuleres i fibriller, og omformes til Gaucher-celler, som fremkommer i lysmikroskop der de ligner opprullet papir.

Gauchers sykdom har tre vanlige kliniske undertyper. Hver type har blitt koblet til spesifikke mutasjoner. Totalt er det kjent omtrent 80 mutasjoner.

- Type I (eller ikke-nevropatisk type) er den vanligste formen for sykdommen, og forekommer i omtrent 1 av 50 000 levende fødte. Den forekommer oftest blant personer av jødisk Ashkenazi-opphav med 100 ganger hyppigheten i forhold til i den generelle populasjonen. Symptomer begynner tidlig i livet eller i voksen alder og inkluderer forstørret lever og svært forstørret milt (sammen med hepatosplenomegali), milten kan sprekke og forårsake ytterligere komplikasjoner. Svakt skjelett og beinsykdom kan være omfattende. Forstørrelse av milten og fortrenkning av benmarg forårsaker anemi, trombocytopeni og leukopeni. Hjernen er ikke rammet, men det kan foreligge lungesvikt, og sjeldnere nyrefeil. Pasienter i denne gruppen får generelt lett sår i huden (på grunn av lave nivåer av blodplater) og opplever utmattelse på grunn av lavt antall røde blodlegemer. Avhengig av fremkomsten av sykdommen og alvorligheten kan type-1-pasienter leve godt inn i voksenlivet. Mange pasienter har en mild form for sykdommen eller de viser ingen symptomer.

- Type II (eller akutt infantil nevropatisk Gauchers sykdom) begynner typisk i løpet av 6 måneder fra fødselen og har en forekomsthypighet på omtrent 1 av 100 000 levende fødte. Symptomer inkluderer en forstørret lever og milt, omfattende og progressiv hjerneskade, øyebevegelsesforstyrrelse, spasmer, anfall, stive lemmer og en dårlig evne til å suge og svelge. Rammede barn dør vanligvis før de er 2 år gamle.

- Type III (den kronisk nevropatiske formen) kan oppstå på ethvert tidspunkt i barndommen eller til og med i voksen alder, og forekommer hos omtrent 1 av 100 000 levende fødte. Den er kjennetegnet ved sakte progressive men mildere neurologiske symptomer sammenlignet med den akutte eller type 2-versjonen. Hoved symptomer inkluderer en forstørret milt og/eller lever, anfall, dårlig koordinasjon, skjellettirregulariteter, øyebevegelsesforstyrrelser, blodforstyrrelser inkludert anemi og respiratoriske problemer. Pasienter lever ofte til de tidlige tenårene og til voksen alder.

- The National Gaucher Foundation fastslår at omtrent 1 av 100 mennesker I den generelle populasjonen I USA er bærer av type 1 Gauchers sykdom, noe som gir en forekomst på 1 av 40 000, og blant Ashkenazi-jøder er hyppigheten av bærere vesentlig høyere, omtrent 1 av 15. Type 2 Gauchers sykdom viser ingen spesiell preferanse for noen etnisk gruppe. Type 3 Gauchers sykdom er spesielt vanlig i populasjonene i nordre Sverige i Norrbotten, der forekomsten av sykdommen er 1 av 50 000.
- For type 1 og de fleste type 3 pasienter kan enzymerstatningsbehandling med intravenøs rekombinant glukosylceramidase minske størrelsen på lever og milt, redusere skjelettunormalheter og reversere andre manifesteringer. Sykdommens sjeldenhet betyr at dosebestemmelsesundersøkelser har vært vanskelig å gjennomføre, slik at det fremdeles eksisterer kontroverser vedrørende den optimale dosen og doseringshyppighet. På grunn av den lave forekomsten har dette blitt et stemoderlig behandlet legemiddel i mange land. Den nåværende eksisterende behandlingen av Gauchers sykdom, Cerezyme (imigluserase for injeksjon) koster opp til 550 000 US-dollar årlig for en enkelt pasient og behandlingen bør bli fortsatt livet ut. Miglustat er et annet legemiddel som ble godkjent for denne sykdommen i 2003.
- Vellykket benmargstransplantasjon kurerer de ikke-nevrologiske manifesteringene for sykdommen, fordi den introduserer en monocyttopulasjon med aktiv glukosylceramidase. Likevel er denne prosedyren forholdsvis risikofylt og blir sjelden utført på pasienter med Gauchers. Kirurgi for å fjerne milten (splenektomi) kan være nødvendig i sjeldne tilfeller dersom pasienten er anemisk eller når det forstørrede organet påvirker pasientens velvære. Blodtransfusjoner kan hjelpe noen anemiske pasienter. Andre pasienter kan kreve ledderstatningskirurgi for å forbedre mobilitet og livskvalitet. Andre behandlingsmuligheter inkluderer antibiotika for injeksjon, antiepilepsimidler for anfall, bisfosfonater for beinlesjoner og levertransplantasjon.
- Substratreduksjonsterapi kan vise seg å være effektiv i å stoppe type 2, fordi den kan overstige blodbarrieren inn i hjernen. Det finnes per i dag ingen effektiv behandling av den alvorlige hjerneskaden som kan forekomme hos pasienter med type 2 og 3 Gaucher-sykdom.
- Foreliggende oppfinnelse vedrører i én utførelsesform en fremgangsmåte for behandling av Gaucher sykdom, ved modulering av aktiviteten til enzymet glukosylceramidase.

### *Sialidose*

Sialidose, eller mukolipidose type I (ML I), er forårsaket av en defekt i sialidaseenzymet (eller alfa-neuraminidase). Sialidase er ansvarlig for konverteringen av GM3 til laktosylceramid, der defekten slik fører til en  
5 akkumulering av GM3. Dens aktivitet blir stimulert av BMP og er avhengig av saposiner.

Sialidose er arvelig på en autosomal recessiv måte. Symptomer enten til stede ved fødsel eller utvikles i løpet av det første leveåret. Hos mange rammede spedbarn blir  
10 omfattende oppsvulming av hele kroppen lagt merke til ved fødsel. Disse spedbarna blir ofte født med grove ansiktstrekk, slik som flat neserygg, oppsvulmede øyelokk, forstørrede gummer og omfattende tungestørrelse (makroglossi). Mange spedbarn blir også født med skjelettmisddannelser slik som hofte ute av ledd. Spedbarn utvikler ofte plutselige ufrivillige muskelsammentrekninger (kalt myoclonus) og har  
15 røde flekker i øynene (kirsebærrøde makuler). De er ofte ute av stand til å koordinere frivillig bevegelse (kalt ataksi). Skjelvinger, dårlig syn og anfall forekommer også. Tester avslører unormal forstørrelse av leveren (hepatomegali) og milt (splenomegali) og ekstrem oppsvulming av buken. Spedbarn mangler generelt muskeltonus (hypotoni) og er mentalt tilbakestående, med en enten initiell eller  
20 progressiv alvorlighet. Mange pasienter lider av manglende evne til å trives og av gjentatte respiratoriske infeksjoner. De fleste barn med ML I dør før de er ett år gamle.

Sialidose kan bli delt opp i kategorier i overensstemmelse med den alderen da  
25 symptomer fremkommer og typene av symptomer. Effektene av sykdommen kan strekke seg fra mild til alvorlig.

Sialidose er en sjelden forstyrrelse som ikke er knyttet til rase. Svært lite populasjonsdata er tilgjengelig, men en undersøkelse fra Nederland rapporterte en  
30 hyppighet på omtrent 1 tilfelle per 2 175 000 fødsler. Denne hyppigheten gjelder likevel nødvendigvis ikke alle populasjoner, der enkelt kan ha høyere hyppighet, og videre er manglede klinisk gjenkjenning en viktig faktor når screening av nyfødte ikke er en mulighet.

35 Behandlingsmuligheter for sialidose forblir begrenset og er primært rettet på støttende behandling og symptomatisk lindring.

Foreliggende oppfinnelse vedrører i én utførelsesform en fremgangsmåte for  
40 behandling av sialidose, ved modulering av sialidaseaktiviteten.

*Metakromatisk leukodystrofi*

Metakromatisk leukodystrofi (MLD) eller arylsulfatase-A-mangel, blir forårsaket av en defekt i enzymet arylsulfatase-A (eller cerebrosidsulfatase). Arylsulfatase-A er ansvarlig for konverteringen av sulfatid (eller cerebrosid-3-sulfat) til galaktosylceramid, der defekten slik fører til en akkumulering av sulfatid. Dens aktivitet blir stimulert av BMP og er avhengig av saposiner.

Den er en lysosomal lagringssykdom som vanligvis plasseres i familien av leukodystrofier. Leukodystrofi rammer veksten og/eller utviklingen av myelin, den fettaktige kappen som virker som en isolator rundt nervefibre i sentralnervesystemet og det perifere nervesystemet.

Som mange andre genetiske forstyrrelser som rammer lipidmetabolisme finnes det flere former for MLD, som oppstår sent i spedbarnsalder, hos barn eller hos voksne:

- I den sene infantile formen, som er den vanligste formen for MLD, begynner rammede barn å få vanskeligheter med å gå etter det første leveåret. Symptomer inkluderer muskelsvinn og svakhet, muskelstivhet, utviklingsforsinkelser, progressivt tap av syn som fører til blindhet, krampetrekninger, forstyrret svelging, paralyse og demens. Barn kan bli bevisstløse. Ubehandlet dør de fleste barn med denne formen for MLD før de er 5 år gamle, ofte mye tidligere.

- Barn med den juvenile formen for MLD (fremkomst i en alder av 3-10 år) får vanligvis dårlige resultater på skolen, mental svekkelse og demens og utvikler symptomer som ligner den sene infantile formen men med senere progresjon. Alder for død varierer, men normalt 10 til 15 år fra fremkomst av symptomer.

- Den adulte formen fremkommer vanligvis etter en alder av 16 år som en psykiatrisk forstyrrelse eller progressiv demens. Adult MLD progresserer saktere enn sen infantil og juvenil form, med en uthalt utvikling i et tiår eller mer.

I sjeldne tilfeller kan kroppen kompensere for mangelen og personen vil ikke oppvise noen symptomer.

Det finnes ingen kur for MLD, og ingen standardbehandling, det er en dødelig sykdom. Barn med fremskreden juvenil eller adult form, og pasienter med sen infantil form som oppviser symptomer har behandling begrenset til smerte- og symptomhåndtering. Presymptomatiske sene infantile MLD-pasienter, i tillegg til de med juvenil eller adult MLD som enten er presymptomatiske eller som oppviser milde til moderate symptomer, har muligheten for beinmargstransplantasjon (inkludert stamcelletransplantasjon) som er under undersøkelse.

Foreliggende oppfinnelse vedrører i én utførelsesform en fremgangsmåte for behandling av metakromatisk leukodystrofi, ved modellering av aktiviteten til enzymet arylsulfatase-A.

#### 5 *Saposinmangel*

Hos både mennesker og mus fører prosaposin-/saposinmangel til alvorlige neurologiske mangler.

10 Humane pasienter med punktmutasjoner i saposin-A, -B og -C viser fenotyper for Krabbe-sykdom, metakromatisk leukodystrofi og Gaucher sykdom, noe som tyder på deres primære in vivo-substrater er henholdsvis galaktosylceramid, sulfatid og glukosylceramid.

15 Krabbe-sykdom, atypisk, på grunn av saposin-A-mangel: En arvelig biokjemisk forstyrrelse som fører til neurologisk regresjon i løpet av få måneder etter fødsel. Død inntreffer vanligvis i løpet av de første leveår. Forstyrrelsen ligner Krabbe-sykdom men blir skilt fra denne ved det genetiske opphavet til den biokjemiske defekten. Krabbe-sykdom involverer en defekt i galaktocerebrosidasegenet mens atypisk Krabbe-sykdom involverer en defekt i prosaposingenet som forårsaker en  
20 mangel på saposin-A.

Saposin-B, tidligere kjent som SAP-1 og sulfatidaktivator, stimulerer hydrolysen av et bredt utvalg substrater inkludert cerebrosidsulfat, GM1-gangliosid, og  
25 globotriaosylceramid ved henholdsvis arylsulfatase-A, sur beta-galaktosidase og alfa-galaktosidase. Human saposin-B-mangel, som overføres autosomal recessivt, fører til vevsakkumulering av cerebrosidsulfat og et klinisk bilde som ligner metakromatisk leukodystrofi (aktivator-manglende metakromatisk leukodystrofi) men med normal arylsulfataseaktivitet. Saposin-B-mangel er en heterogen sykdom med et spektrum som ligner det for metakromatisk leukodystrofi.

30 Saposin (SAP-) C er nødvendig for glukosylceramidnedbrytning, og mangel på denne fører til en variantform av Gaucher-sykdom, ikke-nevropatisk Gaucher-sykdom som skyldes SAP-C-mangel. Svært høye nivåer av kitotriosidaseaktivitet, kjemokin CCL18, og økt konsentrasjon av glukosylceramid i plasma og normal  $\beta$ -  
35 glukosidaseaktivitet i hudfibroblaster blir observert hos pasientene. En missensmutasjon, p.L349P, lokalisert i SAP-C-domenet og en annen mutasjon, p.M1L, lokalisert i startkodonet for prosaposinforløperproteiner har blitt identifisert.

40 Hos noen få ikke-nevropatiske Gaucher-pasienter har en mutasjon i både saposin-C og saposin-D blitt identifisert.

Kombinerte saposin-C- og -D-mangler hos mus fører til en nevronopatisk fenotype med akkumulering av glukosylceramid og alfa-hydroksyceramid.

5 Hos mus er saposin-D-mangel assosiert med ceramidakkumulering, delvis tap av Purkinje-celler og svekket urinærssystemfunksjon. Denne fenotypen ligner ikke den embryonale dødeligheten som oppvises hos mus med den fullstendige mangelen på sur ceramidase, som er saposin-D sitt beslektede enzym.

10 To mutasjoner er kjent hos mennesker som fører til fullstendig inaktivering av alle fire saposiner og prosaposin. Total saposinmangel er en fullstendig ødeleggende sykdom med involvering av mange organer og mange sfingolipider. Kombinert saposinmangel (eller prosaposinmangel) har blitt rapportert i et tilfelle som viste alvorlig nevrovisceral dystrofi som forårsaket død som nyfødt. Mange sfingolipider var forhøyet i urinen, der globotriaosylceramid viste den høyeste økningen. En ny  
15 mutasjon i PSAP-genet ble identifisert, som er homozygot for en splice-akseptorsetemutasjon to baser oppstrøms for ekson 10. Denne mutasjonen førte til et prematurt stoppkodon og ga lave nivåer av transkript.

20 Foreliggende oppfinnelse vedrører i én utførelsesform en fremgangsmåte for behandling av saposinmangel. Nevnte saposinmangel kan bli valgt fra gruppen som består av saposin-A-mangel, saposin-B-mangel, saposin-C-mangel, saposin-D-mangel, eller kombinerte saposinmangler (eller prosaposinmangel).

#### *Gjenværende enzymatisk aktivitet*

25 De lysosomale lagringssykdommene er, slik de er forklart her, forårsaket av et defekt enzym. Nevnte defekte enzym har ingen gjenværende aktivitet, eller kan ha noe gjenværende aktivitet.

30 Gjenværende enzymatisk aktivitet betyr slik det benyttes her at selv om enzymet er defekt, for eksempel på grunn av en mutasjon, så er ikke aktiviteten til enzymet fullstendig fraværende, men heller redusert til et patologisk nivå.

35 Foreliggende oppfinnelse vedrører i ett aspekt et bioaktivt middel for anvendelse i behandling av en lysosomal lagringssykdom, og en fremgangsmåte for behandling av et individ med en lysosomal lagringssykdom.

40 I én utførelsesform av foreliggende oppfinnelse er den lysosomale lagringssykdommen som blir behandlet ifølge foreliggende oppfinnelse kjennetegnet ved å ha gjenværende enzymaktivitet for det defekte enzymet som er involvert i sykdomspatologien.

- I én utførelsesform ligger nevnte gjenværende enzymatiske aktivitet i området fra 0,1 % til 50 %, slik som i området på 0,1 til 1 %, for eksempel 1 til 2 %, slik som 2 til 3 %, for eksempel 3 til 4 %, slik som 4 til 5 %, for eksempel 5 til 6 %, slik som 6 til 7 %, for eksempel 7 til 8 %, slik som 8 til 9 %, for eksempel 9 til 10 %, slik som 10 til 11 %, for eksempel 11 til 12 %, slik som 12 til 13 %, for eksempel 13 til 14 %, slik som 14 til 15 %, for eksempel 15 til 20 %, slik som 20 til 25 %, for eksempel 25 til 30 %, slik som 30 til 35 %, for eksempel 35 til 40 %, slik som 40 til 45 %, for eksempel i området på 45 til 50 % gjenværende enzymatisk aktivitet.
- 10 *Nåværende behandlingsmodaliteter for LSD*  
 Det finnes ingen kur for de lysosomale lagringssykdommene og behandling er for det meste symptomatisk, selv om beinmargtransplantasjon og enzymerstatningsterapi (ERT) har blitt prøvd med noe suksess, I tillegg blir transplantering av navlestrengblod utført på spesialiserte sentre for et antall av disse sykdommene. Transplantasjonsterapi er likevel knyttet til store bivirkninger og fører ofte til komplikasjoner for pasientene. I tillegg blir substratreduksjonsterapi, som er en fremgangsmåte for å redusere akkumuleringen av lagringsmateriale, per i dag evaluert for noen av disse sykdommene.
- 15
- 20 For de fleste av de lysosomale lagringssykdommene finnes fremdeles et stort og umettet behov for å tilveiebringe en effektiv behandlingsmodalitet.
- Enzymerstatningsterapi har blitt utviklet for en undergruppe av de lysosomale lagringssykdommene, og Cerezyme har vært på markedet i et antall år for behandlingen av Gaucher-sykdom. Det defekte enzymet glukocerebrosidase blir fremstilt ved rekombinante teknikker og gitt med intravenøs infusjon i løpet av noen få timer. Behandling er ikke en kur og pasientene må motta livslang behandling for å stoppe sykdomsprogresjon. Noen symptomer kan bedres ved ERT.
- 25
- 30 For de fleste LSD'er har likevel ikke noen effektiv ERT blitt utviklet. Dett kan være fordi produksjonen av aktivt enzym har vist seg vanskelig på grunn av den komplekse subenhetstrukturen til de defekte enzymene. Faktisk kan enzymer foldes feil ved produksjon.
- 35 For de LSD-typene der ERT er tilgjengelig finnes det ulemper som gjør denne typen terapi mindre ønskelig. For det første er ERT en svært dyr form for terapi, og utgjør en finansiell byrde for samfunnet og gjør den utilgjengelig for noen pasienter. ERT er også rettet spesifikt på kun én sykdom. Noen bivirkninger har blitt rapportert for Cerezyme, inkludert utviklingen av en immunrespons, kvalme, oppkast, buksmerte, diaré, utslett, utmattelse, hodepine, feber, svimmelhet, kuldegysninger, ryggsmerte og raske hjerteslag i tillegg til symptomer som tyder på allergiske reaksjoner.
- 40



Det som er tilkjennegitt for foreliggende oppfinnelse tilveiebringer slik en ny og innovativ fremgangsmåte for behandling av de lysosomale lagrings sykdommene. Dette er spesielt relevant for sykdommer for hvilke ingen effektiv terapi har blitt utviklet, de som kan ha nytte av billigere behandling og de som kan ha nytte av en kombinasjonsterapi som omfatter det bioaktive middelet ifølge foreliggende oppfinnelse.

Som tilkjennegjort her tilveiebringer fremgangsmåten ifølge foreliggende oppfinnelse en behandlingsmodalitet som er vesentlig billigere å produsere enn ERT og som er rettet på mer enn én spesifikk lysosomal forstyrrelse.

De molekylære chaperonene, eller varmesjokkproteinene, blir her nedenfor introdusert fordi oppfinnerne har funnet at en interaksjon mellom varmesjokkprotein-70 og lysosomalt BMP, som introdusert ovenfor, danner basisen for modulering av lysosomal enzymatisk aktivitet, og behandling av lysosomale lagringsforstyrrelser, ifølge foreliggende oppfinnelse.

#### De molekylære chaperonene

Etter å ha brukt mye energi på først å transkribere og deretter translaterer den genetiske koden i DNA har cellen til slutt produsert et polypeptid, hvis funksjon antatt er nødvendig på dette tidspunktet i cellens liv. Likevel må noen siste hindringer overkommes for å oppnå et fullt funksjonelt protein – der én av disse er korrekt folding av denne nakne polypeptidkjeden. De evolusjonære imperativene for oppnåelse av korrekt folding er åpenbare – ikke bare ville det være en forferdelig sløsing med energi å ha syntetisert et peptid uten den riktige konformasjonen og dermed funksjon, men også aggregeringen av slike proteiner i den cellulære lumen kan vise seg ødeleggende for cellen. Denne aggregeringen er faktisk et svært sannsynlig resultat når man kjenner til det intracellulære miljøet med høy proteinkonsentrasjon, så det kommer ikke som noen overraskelse at et komplisert og sofistisert maskineri med proteiner eksisterer for å hjelpe til i proteinfolding, for å tillate at den funksjonelle tilstanden til proteiner blir opprettholdt ved slike betingelser. Disse proteinene blir kollektivt kalt molekylære chaperoner (anstander) fordi de i likhet med sine menneskelige motsvarigheter forhindrer uønskede interaksjoner mellom deres umodne klienter.

De molekylære chaperonene finnes i alle deler av en celle der konformasjonsmessige rearrangeringer av proteiner foregår, og selv om proteinsyntese er hovedkilden for ikke-foldede peptider i cellen så blir en utfordring for cellen med høy temperatur eller andre stimuli som kan gjøre proteiner strukturelt labile, og dermed utsatt for utfolding og aggregering, møtt med en spesifikk cellulær respons som involverer produksjonen av beskyttende proteiner. Denne responsen er et fenomen som observeres i alle celletyper fra prokaryoter til

eukaryoter og blir referert til som varmesjokk- eller stressresponsen. Proteinene som induseres ved denne responsen er kjent som varmesjokkproteinene (HSP'er) som det eksisterer flere familier av. Disse familiene sammensatt av både sekvensielt, strukturelt og funksjonelt beslektede proteiner, mens chaperoner fra ulike familier kan være markant forskjellig både når det gjelder struktur i tillegg til cellulær funksjon. Et primært eksempel på en familie med chaperoner er Hsp70-proteinene, som utgjør den sentrale delen av et allestedsnærværende chaperonsystem som er til stede på de fleste steder i eukaryote celler, i eubakterier og i mange arkebakterier. Denne familien har nylig blitt implisert i andre aspekter av cellulær homeostase ved siden av å virke som et chaperon – mest markant via dens anti-apoptotiske trekk, dens funksjon ved immunitet og den øyensynlige avhengigheten av kreftceller på oppreguleringen av Hsp70.

#### Varmesjokkprotein-70-familien

Hsp70-proteiner er involvert i et bredt utvalg av cellulære prosesser inkludert proteinfolding og nedbrytning av ustabile cellulære proteiner i tillegg til å ha andre cytobeskyttende roller. Den vanlige funksjonen til Hsp70 i disse prosessene ser ut til å være bindingen av korte hydrofobe segmenter i delvis foldede polypeptider, for derved å fremme riktig folding og forhindre aggregering. I eukaryoter interagerer Hsp70-chaperoner in vivo med ulike klasser av proteiner som virker for å regulere avgjørende trinn i deres funksjonelle syklus, blant disse J-familieproteinet Hsp40. Videre har ytterligere partnerproteiner blitt identifisert, der noen av disse kobler Hsp70 til andre chaperonsystemer slik som Hsp90-systemet.

#### *Medlemmer av den humane Hsp70-familien*

Noen av de viktige funksjonene som er tilskrevet de molekylære chaperonene inkluderer import av proteiner inn i cellulære avdelinger, folding av proteiner i cytosol, endoplasmatisk retikulum og mitokondrier, forhindring av proteinaggregering og refolding av feilfoldede proteiner. Per i dag inkluderer den humane Hsp70-familien 10 medlemmer som er kodet for av ulike gener, og dette avsnittet er ment å skulle gi en oversikt over disse familiemedlemmene med hensyn på funksjon, uttrykkingsmønster og homologi. Det eksisterer noe forvirring omkring nomenklaturet til de ulike humane Hsp70-familiemedlemmene, selv om et sett med generelle retningslinjer har blitt utarbeidet av Tavarria et al., som gir en logisk kobling mellom lokus-navn, gener og proteiner. Fordi det fremdeles eksisterer noe forvirring mellom enhetene blir Hsp70-genene og –proteinene her referert til ved deres lokus-navn. Navnet Hsp70 kan referer til de to induserbare Hsp70-familiemedlemmene med lokus-navn HSPA1A og HSPA1B eller til hele Hsp70-familien generelt som dette fremgår fra konsensusen i teksten. Som benyttet gjennom hele foreliggende oppfinnelse så er likevel Hsp70 ment å skulle betegne enhver av de to induserbare Hsp70-familiemedlemmene med lokus-navn HSPA1A og HSPA1B.

*HSPA1A og HSPA1B*

Genene som transkriberes fra lokusene HSPA1A og HSPA1B er de to varme-  
 /stressinduserbare Hsp70-genene og hoveddelen av litteraturen som vedrører human  
 5 Hsp70 refererer til proteinene kodet for av disse to genene. Genene gir opphav til  
 proteiner som består av 641 aminosyrer, som har 99 % homologi med hverandre og  
 som var de første humane Hsp70-familiemedlemmene som ble klonet og  
 karakterisert. Genene er koblet i HMC-klasse II-komplekset på 6p21.3, er intronløse  
 og med promoterregioner inneholdende HSE'er, som gjør dem i stand til å binde  
 10 HFS'er og indusere transkripsjon som respons på en mengde cellulære angrep.

Proteinsekvensen til Homo sapiens varmesjokk 70kDa protein 1A (HSPA1A) er  
 (SEKV ID NR:1) (aksjesjonsnummer NM\_005345.5):

```

MAKAAAIGIDLGTTYSCVGVFQHGKVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVALNPQNTVFDA
KRLIGRKFQDPVVQSDMKHWPFQVINDGDKPKVQVSYKGETKAFYP EEISSMVLTKMKEIAEAYLGYPVT
NAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNLVRIINEPTAAAIAYGLDRITGKGERNVLIFDLGGGTFDVSIL
TIDDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRLVNHVFVEEFKRKHKKDISQNKRAVRRRLTACERAKRTLSSSTQA
SLEIDSLFEGIDFYTSITRARFEELCSDLFRSTLEPVEKALRDAKLDKAQIHDLVVLVGGSTRIPKVQKLL
QDFFNDRDLNKSINPDEAVAYGAAVQAAIILMGDKSENVQDLLLDDVAPLSLGLTAGGVM TALIKRNSTI
PTKQTQIFTTYSDNQPGVLIQVYEGERAMTKDNNLLGRFELSGIPPAPRGVPEVTFDIDANGILNVTA
TDKSTGKANKITITNDKGRLSKEEIERMVQEAKEYKADEVQRERVS AKNALESYAFNMKSAVEDEGLKG
KI SEADKKKVLDKCQEVISWLDANTLAEKDEFEHKRKELEQVCNPIISGLYQGAGGPGGGFQAQGP KGG
SGSGPTIEEVD
  
```

Nukleinsyre (DNA) –sekvensen for Homo sapiens varmesjokkprotein 70kDa protein  
 1A (HSPA1A) er (SEKV ID NR:2) (aksjesjonsnummer NM\_005345.5):

```

1 ataaaagccc aggggcaagc ggtccggata acggctagcc tgaggagctg ctgcgacagt
61 ccaactacct ttctcgagagt gactcccgtt gtcccaagge tcccagagc gaacctgtgc
121 ggctgcaggc accggcgcgt cgagtttccg gcgtccggaa ggaccgagct cttctcgcgg
181 atccagtgtt ccgtttccag cccccaatct caqagcggag ccgacagaga gcagggaaacc
241 ggcattggcca aagccgcggc gatcggcacc gacctgggca ccacctactc ctgcgtgggg
301 gtgttccaac acggcaaggt ggagatcacc gccaacgacc agggcaaccg caccaccccc
361 agctacgtgg cttcacgga caccgagcgg ctcatcgggg atgcccgaac gaaccaggtg
421 ggcgtgaacc cgcagaacac cgtgtttgac gcgaagcggc tgattggccg caagttcggc
481 gacccgggtg tgcagtcgga catgaagcac tggcctttcc aggtgatcaa cgacggagac
541 aagcccaagg tgcaggtgag ctacaagggg gagaccaagg cattctaccg cgaggagatc
601 tcgtccatgg tgetgaccaa gatgaaggag atcgcggagg cgtacctggg ctaccgggtg
661 accaacgcgg tgatcacctg gccggcctac ttcaacgact cgcagcgcga ggccaccaag
721 gatgcgggtg tgatcgcggg gctcaacgtg ctgcggatca tcaacgagcc cacggccgcc
781 gccatcgcct acggcctgga cagaacgggc aagggggagc gcaacgtgct catctttgac
841 ctgggcccgg gcaccttcga cgtgtccacc ctgacgatcg acgacggcat cttcgaggtg
901 aaggccacgg ccggggacac ccacctgggt ggggaggact ttgacaacag gctggtgaac
961 cacttcgtgg aggagttcaa gagaaaacac aagaaggaca tcagccagaa caagcgagcc
1021 gtgaggcggc tgcgcaccgc ctgcgagagg gccaaagagg ccctgtcgtc cagcaccagc
1081 gccagcctgg agatcgactc cctgtttgag ggcacgactc tctacacgtc catcaccagg
1141 gcgaggttcg aggagctgtg ctccgacctg ttccgaagca ccctggagcc cgtggagaag
1201 gctctgcgcg acgccaaagt ggacaaggcc cagattcacg acctggtcct ggtcggggggc
1261 tccaccgcga tccccaaagt gcagaagctg ctgcaggact tcttcaacgg gcgcgacctg
1321 aacaagagca tcaaccgcga cgaggctgtg gcctacgggg cggcgggtgca ggccggccatc
1381 ctgatggggg acaagtcgga gaacgtgctg gacctgctgc gctcctctg
1441 tgcgtggggc tggagacggc cggagcctg atgactgcc tgatcaagcg caactccacc
1501 atccccacca agcagacgca gatcttcacc acctactccg acaaccaacc cggggtgctg
1561 atccaggtgt acgagggcga gagggccatg acgaaagaca acaatctgtt ggggcgcttc
1621 gagctgagcg gcatccctcc ggccccagg ggcgtgcccc agatcgaggt gaccttcgac
1681 atcgatgcca acggcactct gaacgtcacg gccacggaca agagcaccgg caaggccaac
1741 aagatcacca tcaccaacga caagggccgc ctgagcaagg aggagatcga gcgcatggtg
1801 caggagggcg agaagtaca agcggaggac gaggtgcagc gcgagagggg gtcagccaag
1861 aacgccctgg agtctacgc cttcaacatg aagagcggc tggaggatga ggggctcaag
1921 ggcaagatca gcgagggcga caagaagaag gtgctggaca agtgtcaaga ggtcatctcg
1981 tggctggacg ccaacacctt ggccgagaag gacgagttt agcacaagag gaaggagctg
2041 gagcaggtgt gtaaccccat catcagcggc ctgtaccagg gtgccgggtg tcccgggctc
2101 gggggcttcg gggctcaggg tcccaaggga gggctcgggt caggccccac cattgaggag
2161 gtagattagg ggcctttcca agattgctgt ttttgtttg gagcttcaag actttgcatt
2221 tcctagtatt tctgtttgtc agttctcaat ttctgtgtt tgcaatgtt aaatTTTTTg
2281 gtgaagtact gaacttgctt tttttccggg ttctacatgc agagatgaat ttatactgcc
2341 atcttacgac tattttctct ttttaataca cttaactcag gccattttt aagttggtta
2401 cttcaaagta aataaacttt aaaattcaaa aaaaaaaaa aaaaa

```

5 Proteinsekvensen for Homo sapiens varmesjokk 70kDa protein 1B (HSPA1B) er (SEKV ID NR:3) (aksesjonsnummer NM\_005346):

```

MAKAAAIGIDLGTTYSCVGVFQHGKVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVALNPQNTVFDA
KRLIGRKFQDPVVQSDMKHWPVQVINDGDKPKVQVSYKGETKAFYP EEI SSMVLTKMKEIAEAYLGPVVT
NAVITVPAYFNDSQRQATKDAGVIAGLNLVRIINEPTAAAIAYGLDRITGKGERNLIFDLGGGTDFDVSIL
TIDDGIFEVKATAGDTHLGGEDFDNRLVNHFEVEEFKRKHKKDI SQNKRAVRRRLTACERAKRLTSSSTQA
SLEIDSLFEGIDFYTSITRARFEELCSDLFRSTLEPVEKALRDAKLDKAIHDLVLVGGSTRIPKVQKLL
QDFNQRDLNKSINPDEAVAYGAAVQAAILMGDKSENVQDLLLDVAPLSLGLTAGGVM TALIKRNSTI
PTKQTQIFTTYSDNQPGVLIQVYEGERAMTKDNLLGRFELSGIPPAPRGVVPQIEVTFDIDANGILNVTI
TDKSTGKANKITITNDKGRLSKEEIERMVQEAKEYKADEVQRERVS AKNALESYAFNMKSAVEDEGLKG
KISEADKKKVLDKCQEVISWLDANTLAEKDEFEHKRKELEQVCNPIISGLYQAGGGPGPGGFGAQGPKG
SGSGPTIEEVD

```

Nukleinsyre (DNA) –sekvensen for Homo sapiens varmesjokkprotein 70kDa protein 1B (HSPA1B) er (SEKV ID NR:4) (aksjesjonsnummer NM\_005346):

```

1  ggaaaacggc cagcctgagg agctgctgcg aggggtccgct tcgtctttcg agagtgactc
61  ccgcggtccc aaggctttcc agagcgaacc tgtgcggtcg caggcaccgg cgtggtgagt
121  ttccggcggt ccgaaggact gagctcttgt cgcggatccc gtccgcccgt tccagccccc
181  agtctcagag cggagcccac agagcagggc accggcatgg ccaaagccgc ggcgatcggc
241  atcgacctgg gcaccaccta ctctgctggt ggggtgttcc aacacggcaa ggtggagatc
301  atcgccaacg accagggcaa cgcaccacc cccagctacg tggccttcac ggacaccgag
361  cggctcatcg gggatgcggc caagaaccag gtggcgtgta acccgcagaa caccgtgttt
421  gacgcgaagc ggctgatcgg ccgcaagttc ggcgaccogg ttgtgcagtc ggacatgaag
481  cactggcctt tccaggtgat caacgacgga gacaagccca aggtgcaggt gagctacaag
541  ggggagacca aggcattcta ccccgaggag atctcgtcca ttgtgctgac caagatgaag
601  gagatcggcg aggcgtacct gggctaccgg gtgaccaacg cggatgatcac cgtgccggcc
661  tacttcaacg actcgcagcg ccaggccacc aaggatgcgg gtgtgatcgc ggggtcaac
721  gtgctgcgga tcatcaacga gccacggcc gccgccatcg cctacggcct ggacagaacg
781  ggcaaggggg agcgaacgt gctcatcttt gacctgggcg ggggcacctt cgacgtgtcc
841  atcctgacga tcgacgacgg catcttcgag gtgaaggcca cggccgggga caccacctg
901  ggtggggagg actttgacaa caggctggtg aaccacttcg ttgaggagtt caagagaaaa
961  cacaagaagg acatcagcca gaacaagcga gccgtgaggc ggctgcgcac cgctgcgag
1021  agggccaaga ggacctgtc gtccagcacc caggccagcc ttgagatcga ctccctgttt
1081  gagggcatcg acttctacac gtccatcacc agggcgaggt tcgaggagct gtgctccgac
1141  ctgttccgaa gcacctgga gcccggtggag aaggtctgct gcgacgcca gctggacaag
1201  gccagattc acgacctggt cctggtcggg ggctccacc gcaccccaa ggtgcagaag
1261  ctgctgcagg acttcttcaa cgggcgcgac ctgaacaaga gcaccaacc cgacgaggct
1321  gtggcctacg gggcggcggg gcaggcggcc atcctgatgg gggacaagtc cgagaacgtg
1381  caggacctgc tgetgctgga cgtggctccc ctgtcgtggt ggctggagac ggccggaggc
1441  gtgatgactg ccctgatcaa gcgcaactcc accatcccca ccaagcagac gcagatcttc
1501  accacctact ccgacaacca acccgggggtg ctgatccagg tgtacgaggg cgagagggcc
1561  atgacgaaa acaacaatct gttggggcgc ttcgagctga gcggcatccc tccggcccc
1621  agggcgctgc ccagatcga ggtgacctc gacatcgatg ccaacggcat cctgaacgtc
1681  acggccacgg acaagagcac cggcaaggcc aacaagatca ccatcaccia cgacaagggc
1741  cgcctgagca aggaggagat cgagcgcgat gtgcaggagg cggagaagta caaagcggag
1801  gacgaggtgc agcgcgagag ggtgtcagcc aagaacgccc ttgagtctta cgccttcaac
1861  atgaagagcg ccgtggagga tgaggggctc aagggaaga tcagcaggc ggacaagaag
1921  aaggttctgg acaagtgtca agaggtcacc tcgtggctgg acgccaacac cttggccgag
1981  aaggacgagt ttgagcacia gaggaaggag ctggagcagg ttgtgaacct catcatcagc
2041  ggactgtacc aggggtccgg ttggtcccgg cctggcggct tcggggctca gggteccaag
2101  ggagggtctg ggtcaggccc taccattgag gaggtggatt aggggccttt gttctttagt
2161  atgtttgtct ttgaggtgga ctggtgggac tcaaggactt tgctgctggt ttctatgtc
2221  atttctgctt cagctctttg ctgcttcaact tctttgtaaa gttgtaacct gatggtaatt
2281  agctggcttc attatthttg tagtacaacc gatatgttca ttagaattct ttgcatttaa
2341  tgttgatact gtaagggtgt ttcgttccct ttaaatgaat caacactgcc accttctgta
2401  cgagtttgtt tgthtttttt tttttttttt ttttttgctt ggcgaaaaca ctacaaaggc
2461  tgggaatgta tgthttttata atthgtttat ttaaatatga aaaataaaat gttaaacttt
2521  aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a

```

## 5 *HspA1L* og *HspA2*

To Hsp70-familiemedlemmer har blitt betegnet ”sjåvinistiske gener” fordi mannlige kjønnsceller begunstiger deres uttrykking med sterk forutinntatthet. *hspA1L*-genet er et konstitutivt uttrykt intronløst Hsp70-familiemedlem lokalisert 4kb telomert for HSPA1A-lokuset i det samme MHC-klasse II-komplekset på kromosom 6. Det blir uttrykt i lave mengder både før og etter varmesjokk men med et uttrykingsmønster som favoriserer testiklene hos mus, rotte og menneske der det 641 aminosyrer (aa) lange proteinet er 90 % homologt med HspA1A. *hspA2*-genet ble først isolert fra

genomisk bibliotek fra mus og har senere blitt vist å bli konstitutivt uttrykt selv om dette foregår ved lave nivåer i ulike vev i menneskekroppen inkludert skjelettmuskel, ovarier, tynntarm, kolon, hjerne, placenta og i nyrene, men blir høyt uttrykt i testikler. Dets uttrykking, eller heller mangel på denne, har blitt knyttet til unormal human spermatogenese og hspA2<sup>(-/-)</sup>-hannmus er sterile. Genet er lokalisert på kromosom 14 og gir opphav til et protein på 639 aa med 84 % homologi med HspA1A, selv om den eksakte lokaliseringen er utsatt for diskusjon fordi to artikler presenterte ulike lokusposisjoner – 14q24.1 versus 14q22.

#### 10 *HspA6 og HspA7*

hspA6- og hspA7-genene er varmeinduserbare medlemmer av Hsp70-familien uten noen øyensynlige motsvarigheter i mus. De inneholder HSE'er på sine promoterseter og genene er intronløse. De er lokalisert på kromosom 1 og er 94 % homologe med hverandre i nukleotidsekvensen. Likevel er kun hspA6 funksjonelt fordi hspA7-genet inneholder et enkelt nukleotidinnskudd som genererer et prematurt stoppkodon på +1324. HspA6-proteinet er 643 aa langt og viser 77 % homologi med HspA1A og HspA1B.

#### *HspA5 og HspA9*

20 hspA5- og hspA9-genene er de to avdelingsspesifikke medlemmene av Hsp70-familien. Det 655 aa lange HspA5-proteinet er lokalisert i det endoplasmatiske retikulum (ER) og fremmer folding og transport av nylig syntetiserte proteiner i denne avdelingen. Proteinet er 64 % homologt med HspA1A, der genet er lokalisert på 9q34. Det 679 aa lange HspA9-proteinet er lokalisert i mitokondriene der det 25 hjelper til i folding av proteiner etter deres transport over mitokondriemembranen. HspA9 er lokalisert på 5q31.1, og proteinet er 52 % homologt med HspA1A.

#### *HspA8*

30 Det tilhørende Hsp70-medlemmet kjent som Hsc70 er kodet for av et gen kalt hspA8 på 11q24, og gir opphav til et protein på 646 aa med 86 % homologi med HspA1A, og som blir konstitutivt uttrykt i alle vev og cellelinjer. Proteinet er analogt med Hsp70 i sine cellulære funksjoner, og tilveiebringer den nødvendige chaperon-funksjoneringen under normale betingelser, men har også blitt tilskrevet en rolle i avbelegningen av klatrinbelagte vesikler i tillegg til chaperon-mediert 35 autofagi.

#### *HspA3 og HspA4*

40 Disse vil ikke bli diskutert her fordi det eksisterer tvil om hvorvidt HSPA3 i det hele tatt eksisterer og fordi HSPA4 mest sannsynlig er et medlem av Hsp10-familien og ingenting er kjent om denne så langt, bortsett fra den kromosomale lokalisering på 5q31.1-2.

Lokus	Navn benyttet her, gen/protein	Posisjon	% aa-homologi med HSPA1A	Alternative navn
-------	--------------------------------	----------	--------------------------	------------------

HSPA1A	<i>hspA1A</i> /HspA1A (Hsp70)	6p23.1	100	Hsp70; Hsp72; Hsp70-1
HSPA1B	<i>hspA1B</i> /HspA1B (Hsp70)	6p23.1	99	Hsp70; Hsp72; Hsp70-2
HSPA1L	<i>hspA1L</i> /HspA1L	6p23.1	90	Hsp70-Hom; Hsp70t
HSPA2	<i>hspA2</i> /HspA2	14q24.1	84	Hsp70-3
HSPA4	<i>hspA4</i> /HspA4	5q31.1	31	Hsp70RY; APG-2
HSPA5	<i>hspA5</i> /HspA5	9q34	64	BiP; GRP78
HSPA6	<i>hspA6</i> /HspA6	1q	84	Hsp70-6; Hsp70B'
HSPA7	<i>hspA7</i> /HspA7	1q	-	Hsp70-7; Hsp70B
HSPA8	<i>hspA8</i> /HspA8 (Hsc70)	11q24	86	Hsc70; Hsp73
HSPA9	<i>hspA9</i> /HspA9	5q31.1	52	GRP75; PBP74; mtHsp75; mortalin; mot-2

5

**Tabell 1: Liste over den humane Hsp70-genfamilien.** Genene er listet opp i overensstemmelse med lokusnavn, navn som er benyttet her, kromosomal lokalisering (posisjon), aminosyrehomologi med HSPA1A i tillegg til alternative navn som ofte ses i litteraturen.

## 10 Transkripsjonsregulering av Hsp70

Genomisk fotavtrykkanalyse av den humane Hsp70-promoterer har avslørt at varmesjokk/stress induserer en rask binding av varmesjokktranskripsjonsfaktorer (HSF) til en region som omfatter nGAAn-sekvenser kalt varmesjokkelementer (HSE'er). Ved normale betingelser er Hsp70 bundet til HSF'er som foreligger i cytosol, men ved stress blir HSF'ene separert fra Hsp70 og antar en homotrimer konformasjon ved fosforylering ved PKC eller andre serin/treoninkinaser. HSF-trimerene går inn i kjernen der de binder HSE'er lokalisert i promoterregionen til Hsp70-gener og blir ytterligere fosforylert ved HSF-kinaser.

20 Tre HSF'er har så langt blitt karakterisert hos mennesker (HSF1, HSF2 og HSF4). HSF1 er hovedtranskripsjonsfaktoren som blir aktivert ved de fleste stressbetingelser og responderer på et bredt utvalg stimuli, som kan bli kategorisert i fysiologiske (for eksempel celledeling, hormonell stimulering), patologiske (for eksempel infeksjoner, feber, inflammasjon, malignitet) og miljømessige betingelser (for eksempel varmesjokk, tungmetaller, etanol). HSF2 responderer kun på hemin, mens HSF4 fortrinnsvis uttrykkes i det humane hjertet, pankreas, hjerne og skjelettmuskel, mangler den c-terminale hydrofobe repetisjonen som er felles for alle vertebrat-HSF'er og ser ut til å undertrykke uttrykking av HSP'er- HSP70-genreguleringen som er ansvarlig for syntese av det konstitutivt uttrykte Hsp70 (Hsc70) er ikke klart forstått, men HSF'er ser ikke ut til å være involvert.

30

Selv om HSF'ene er de mest fremherskende av faktorene som regulerer HSP-uttrykking så har andre transkripsjonsfaktorer blitt vist å inneha samme evne. Spesifikke CCAAT-boks-bindende faktorer (CBF) har blitt vist å inducere Hsp70-transkripsjon, tumorsuppressoren p53 kan undertrykke transkripsjon ved å binde til promoterregionen til Hsp70 og ved å nøytralisere CBF, og HSF'er kan bli antagonisert av det varmesjokkfaktorbindende protein-1 (HSBP1), som på denne måten avslutter Hsp70-transkripsjon.

### Strukturelle og funksjonelle egenskaper ved Hsp70

10 Strukturen og funksjonen for Hsp70-systemet er best forstått for det eubakterielle Hsp70, DnaK, dets ko-chaperon DnaJ og nukleotidendringsfaktoren GrpE. Likevel er mekanismen generelt ansett å være analog i eukaryoter, selv om bevis tyder på en utkobling av GrpE. Dette avsnittet vil fokusere på det eukaryote Hsp70-systemet, men vil også inkludere kommentarer vedrørende det eubakterielle systemet, der dette er ansett hensiktsmessig.

Hsp70 omfatter to funksjonelle enheter – et N-terminalt ATPase-domene og et mindre C-terminalt peptidbindende domene. ATPase-domenet omfatter to underdomener separert ved en kløft inneholdende det nukleotidbindende setet, som bestemmer peptidbindingsegenskapene for det C-terminale domenet. Når ATP blir bundet binder peptidsubstrater og dissosieres raskt, men med lav affinitet, mens i tilstand der enten ikke noe nukleotid eller ADP er bundet til det N-terminale domenet, så minsker hastighetene for peptidbinding og dissosiering og affiniteten øker. ATP-hydrolyse virker slik som en molekylær bryter mellom to tilstander for Hsp70, der syklusen til denne er regulert ved J-domenefamilieproteinet Hsp40 i eukaryoter og DnaJ og GrpE i eubakterier. Det N-terminale J-domenet på Hsp40 binder til Hsp70 og akselererer ATP-hydrolyse, for herved å fremme peptidinnfangning, mens den C-terminale delen av Hsp40 virker som et chaperon ved å gjenkjenne hydrofobe peptider, hvorved Hsp70 blir rekruttert til nakne polypeptidkjeder. Det er viktig å bemerke at de molekylære chaperonene ikke tilveiebringer spesifikk sterisk informasjon for foldingen av det bundne proteinet, men heller inhiberer uproduktive interaksjoner, for slik å tillate proteinet å foldes mer effektivt til sin native struktur.

35 I eubakterier induserer GrpE frigjøringen av ADP fra DnaK (bakteriell Hsp70), mens for eukaryote Hsp70-proteiner ser en slik faktor ut til å være unødvendig på grunn av at det hastighetsbegrensende trinnet i denne ATPase-syklusen ikke er dissosieringen av bundet ADP men heller ATP-hydrolysen selv. Ytterligere proteiner ser likevel ut til å regulere Hsp70-funksjon i eukaryoter, der det homo-oligomere proteinet Hip (Hsp70-interagerende protein) virker som en positiv regulator ved å stabilisere den ADP-bundne tilstanden til Hsp70, mens proteinets karboksyterminal for Hsp70-bindende protein (CHIP) og Bcl-2-assosiert atanogen-1



(Bag-1) begge har inhibitorisk effekt – CHIP ved å inhibere ATPase-aktiviteten til Hsp70 og Bag-1 ved å antagonisere refoldingsaktiviteten til Hsp70. Ytterligere interaksjoner blir tilveiebrakt ved de to humane Hsp40-proteinene Hdj1 og Hdj2, som ved siden av deres Hsp40-funksjoner (beskrevet ovenfor) har blitt vist å fremme koblingen av Hsp70 og Hsp90 via Hop (Hsp-organiserende protein), som er et adaptorprotein som fysisk kobler sammen chaperonene via sine to tetratrikoptidrepetisjons (TPR) –domener som binder henholdsvis de forlengede C-terminale sekvensene til Hsp70 og Hsp90. Det har nylig blitt vist at noen av de ovenfor nevnte proteinene er regulatoriske i overføringen av ikke-native eller feilfoldede proteiner fra chaperonene til ubikitinproteasom-maskineriet. Proteinet CHIP er bortsett fra sin negative regulatoriske rolle på Hsp70 i stand til å assosiere med Hsp90 via et N-terminalt TPR-domene og målsøker Hsp90-substrater for degradering via et C-terminalt ubikitinligasedomene, men er også i stand til å samarbeide funksjonelt med BAG-1, som binder til Hsp70 (i tillegg til proteasomet). Disse funnene tilveiebringer en mulig kobling mellom mekanismene som integrerer chaperonassistert folding og proteolytisk degradering, som er de to hovedkomponentene i proteinkvalitetskontroll i cytosol.

#### Cytobeskyttelse via Hsp70

Bortsett fra sine anti-apoptotiske evner som en konsekvens av å være et molekylært chaperon, dvs. fremmer proteinfolding ved ellers denaturerende betingelse, så er Hsp70 i stand til å påvirke overlevelsen av celler på ulike andre måter, inkludert beskyttelse av mitokondriefunksjon etter iskemi-reperfusjonsskade, blokkering av aktivering av stresskinasen c-jun N-terminal kinase (JNK) ved stimulering av primære fibroblaster med TNF, og et Hsp70/Bag-1-kompleks har blitt foreslått for regulering av cellevekst og mitogenese ved betingelser med cellulært stress. Hsp70 sin evne til å beskytte celler fra celledød induisert av en mengde ulike stimuli slik som TNF, TRAIL, oksidativt stress, UV-stråling og antikreftlegemidlene doxorubicin, etoposid og taxol understreker ytterligere dens anti-apoptotiske egenskaper. Til slutt har rapporter også tilveiebrakt bevis på mer direkte interaksjoner mellom Hsp70 og det apoptotiske maskineriet fordi Hsp70 har blitt vist å antagonisere apoptoseinduserende faktor (AIF), i tillegg til å uttøve en anti-apoptotisk funksjon nedstrøms for kaspase-3.

Nyere bevis tyder også på at deler av den sterke cytotbeskyttende effekten av Hsp70 skyldes stabilisering av lysosomalmembranene. Som bevis på dette utløser fjerning av Hsp70 en tidlig permeabilisering av lysosomalmembraner og katepsinmediert celledød i kreftceller, og eksogent Hsp70 inhiberer effektivt lysosomal destabilisering induisert ved ulike stresstyper. Videre lider mus som mangler Hsp70 av pankreatitt forårsaket av lekkasjen av lysosomale proteaser inn i cytosol. Alle disse hendelsene understreker rollen til Hsp70 som en viktig regulator av PCD og dermed overlevelsesfaktor for celler.

### Hsp70 ved kreft

Hsp70 blir ofte overuttrykt i maligne humane tumorer, og dens uttrykking korrelerer med dårlig prognose ved brysttumorer og endometrietumorer. I tråd med dette øker  
5 Hsp70 det tumorigene potensiale for gnagerceller implantert i immunkompromiterte eller syngenetiske dyr.

Hsp70 sin rolle som en essensiell faktor for kreftcelleoverlevelse er ytterligere substansiert fra en rapport fra Wei et al., som utførte den første  
10 fjerningsundersøkelsen av Hsp70 i kreftceller. Resultatene tyder på at når Hsp70-uttrykking ble inhibert i ulike kreftcellerlinjer ved anvendelsen av en antisensoligomer så ble inhibering av celleproliferasjon og påfølgende apoptose induisert. Dette arbeidet har blitt utfyllt med en serie eksperimenter der adenovirus-antisensmediert fjerning av Hsp70 utløser et tumorcellespesifikt lysosomalt  
15 dødsprogram.

In vivo-undersøkelser som benytter ortotopiske xenografts for glioblastom og brystkarsinomer i tillegg til som subkutane xenografts for kolonkarsinom i immunmanglende mus har ytterligere vist antikreftpotensialet ved fjerning av  
20 Hsp70, ettersom tumorene fra mus som mottok lokoregional påføring av det ovenfor nevnte adenoviruskonstrukt viste massiv apoptoseliknende celledød og rekruttering av makrofager. Disse undersøkelsene viser klart avhengigheten for noen tumorer av tilstedeværelsen av Hsp70, selv om undersøkelser har argumentert med at cytotoxisiteten som observeres i cellekultur ved adenovirusmediert fjerning  
25 av Hsp70 skyldes en kombinasjon av virusmediert celledød og nedregulering av Hsp70. På tross av denne kontroversen var ikke cytotoxisiteten i cellekultur induisert ved fjerningen av Hsp70 avhengig av kaspaser fordi verken overuttrykking av Bcl-2 eller farmakologisk inhibering av kaspaser kunne redde cellene. Heller var utløsingen av LMP og frigjøring av katepsiner til cytosol de sannsynlige  
30 dødsinduserende hendelsene fordi inhiberingen av cysteinkatepsiner overførte signifikant cytoproteksjon. Videre førte fjerning av Hsp70 i de tidligere nevnte tumorxenograftene i mus til katepsinfrigjøring og tumorcelledød.

Som nevnt tidligere er én av de cytoprotektive mekanismene for Hsp70, som  
35 mange kreftceller ser ut til å ha tilpasset seg, translokeringen av Hsp70 til den endolysosomale avdelingen der den har en membranbeskyttende rolle. Denne translokeringen er kanskje ikke bare drevet av behovet for å beskytte de lysosomale membranene siden studier har vist at mer enn 50 % av tumorer viser lokalisering av Hsp70 på plasmamembranoverflaten – et område som er i direkte kontakt med den  
40 endolysosomale avdelingen via endocytose og sekretoriske hendelser, som tidligere beskrevet. Den overflateeksponerte Hsp70 presenterer en unik epitop som kan virke som en gjenkjenningsstruktur for naturlige dreperceller (NK-celler) ved å stimulere

deres proliferasjon og cytolytiske aktivitet. NK-celler aktivert med denne Hsp70-peptidsekvensen har blitt vist å inhibere tumorvekst hos mus med alvorlig kombinert immunmangel (SCID), og en mulig mekanisme for dette kan være at det celleoverflatebundne Hsp70 medierer apoptose ved den spesifikke bindingen og opptaket av granzym-B, uavhengig av perforin.

Som tidligere skrevet blir de endolysosomale membranene og plasmamembranene konstant bytte mellom hverandre. Tilstedeværelsen av Hsp70 på overflaten av kreftceller kan slik være en "uheldig" konsekvens av to hendelser som fremmer tumorprogresjon, utskillingen av katepsiner, som fremmer invasjon og angiogenese, og lokaliseringen av Hsp70 på de lysosomale membranene, som forhindrer feilaktig frigjøring av cysteinkatepsiner til cytosol og påfølgende celledød.

#### Ekstracellulært Hsp70

Slik det fremgår fra de tidligere avsnittene er de intracellulære funksjonene til Hsp70 essensielle for riktig cellehomeostase, ikke minst med tanke på skadelige utfordringer. Likevel kommer interessante roller også frem for ekstracellulært Hsp70 (sHsp70), spesielt når det gjelder immunresponser og inflammatoriske responser, som igjen kan ha viktige roller for fjerningen av kreftceller. Videre er også involvering i en generell fysisk tilpasning til stress og beskyttelse versus cellulær skade temaer som fremkommer for eHsp70.

#### *Ekstracellulært Hsp70 og nervebeskyttelse*

Det første beviset på tilstedeværelse av eHsp70 kom fra undersøkelser i det store aksonet hos blekksprut, der det ble vist at forhøyning av temperatur induerte et sett med varmesjokkproteiner i glikappen som omgir aksonet som ble overført inn i aksonet. Disse funnene ble snart reproduisert i dyrkede rotte-embryoceller, og viktig er det at allerede på dette tidspunktet ble bevis presentert for at en ikke-klassisk eksocytosevei var ansvarlig for frigjøringen av Hsp70 fordi verken monesin eller colchicin, som begge er inhibitorer av den klassiske sekretoriske veien, kunne blokkere utskillingen av Hsp70. Siden disse publikasjonene har andre rapporter tilveiebrakt eksempler på frigjøring av Hsp'er ved glia og opptaket av nevroner i ulike dyremodellsystemer slik som frosker, kreps og rotter. Støtte for en rolle for gli-celler som kilder for eHsp70 hos mennesker ble tilveiebrakt ved en undersøkelse med dyrkede humane glioblastomceller. Undersøkelsen viste at under kontrollbetingelser så frigjorde cellene omtrent 10 pg Hsp70 per million celler til mediet i en tidsperiode på 24 timer. Denne frigjøringen ble økt 2,5-5 ganger når et 20 minutters varmesjokk ble påført i begynnelsen av tidsperioden. Viktig å bemerke er at denne undersøkelsen også viste at frigjøringen av Hsp70 var høyere enn det som kunne tilskrives celledød. Disse dataene støtter alle den opprinnelig foreslåtte hypotesen fremlagt av Tytell et al., om at gli-cellefrigjøring av Hsp'er kan være en måte å støtte nevronfunksjon under metabolsk stress.

In vivo-bevis for at eHsp70 har en nervebeskyttende rolle under akutt stress kommer fra en mengde undersøkelser. En undersøkelse av Tidwell et al., fant at eHsp70 er i stand til å redusere mengden post-axotomi motornevroncelledød når eHsp70 ble påført via en gel-svamp etter axotomi. I den samme undersøkelsen ble også økt overlevelse av dorsale rotganglionsensoriske nevronceller observert ved administrering av Hsp70, selv om dette var avhengig av noe høyere doser med Hsp70 enn motornevronene. I tillegg har Hsp70 blitt vist å beskytte motornevroner som ellers var utpekt til å dø under embryonal kylling utvikling, og også beskytte motornevroner isolert fra kyllingryggmarg ved berøvelse av trofisk faktor. En in vivo-beskyttende rolle for eHsp70 har også blitt beskrevet når det gjelder lysskade i retina. I denne undersøkelsen injiserte Yu et al., intravitralt en løsning av rekombinant Hsp70 og Hsc70 etter eksponering overfor skadeinduserende lys ved en dose som tidligere hadde blitt beskrevet å forårsake omfattende fotoreseptordegenerering. Interessant nok førte tilstedeværelse av eHsp70-blandingen i det vitrøse kammeret i øyet til at vesentlig flere fotoreseptorer overlevde i retina. Videre viste evaluering av opptak av fluorescein-merket Hsc/Hsp70 at den var til stede i retina 6 timer etter administrering. Ekstracellulært Hsp70 administrert via intranasal behandling har også blitt vist å forhindre konsekvensene av uunngåelig stress hos rotter og det ble nylig beskrevet at intraperitonalt injisert rekombinant humant Hsp70 var effektivt i å øke livslengden, forsinke fremkomst av symptomer, opprettholde motorfunksjon og forlenge motornevronoverlevelse i en musemodell for amyotrofisk lateral sklerose. Ytterligere in vitro-arbeid ved å benytte Hsp70 eller Hsc/Hsp70-blandingen i nevronale systemer har videre vist at eHsp70 kan forsterke stresstoleranse for nevronceller og redusere polyglutamintoksisitet og aggregering.

#### *Ekstracellulært Hsp70 og immunitet*

Ved siden av roller i cytobeskyttelse har både plasmamembranassosiert i tillegg til fritt systemisk eHsp70 blitt dokumentert å ha roller i immunitet. Når man vet at en av hovedfunksjonene til Hsp70 er å passe på intracellulære proteiner så er det kanskje ikke overraskende at den kan være involvert i binding av immunogene peptider og hjelpe til i presenteringen av disse ved hovedhistokompatibilitetskompleks (MHC) klasse 1-molekyler. Videre har tumoravledet eHsp70 blitt vist å passe på immunogene peptider og selektivt binde antigenpresenterende celler (APC). Etter reseptormediert endocytose blir deretter disse Hsp70-peptid-kompleksene presentert på MHC klasse 1-molekyler og fører til en cytotoksisk T-cellerespons. I tillegg til å passe på selv-antigener er Hsp70 også i stand til å binde mikropeptider og ikke-metylerede CpG-motiver på bakterie-DNA.

I tillegg til sin rolle som et antigenpresenterende chaperon har eHsp70 også blitt implisert i stimuleringen av naturlig immunitet. Mens et antall celletyper har blitt

vist å frigjøre Hsp70 så har eHsp70 også blitt vist å binde til et antall reseptorer på ulike leukocyt-underspopulasjoner inkludert naturlige dreperceller (NK-celler), makrofager, monocytter og dendrittceller. Reseptorene som er involvert i eHsp70-gjenkjenning inkluderer i hovedsak mønstergjenkjenningsreseptorer (PRR'er) og består av en mengde ulike reseptorer fra ulike reseptorfamilier slik som toll-liknende reseptorer (TLR), scavenger-reseptorer og c-type-lektiner. Ved binding til reseptor er eHsp70 i stand til å utløse en bred cytokinrespons inkludert frigjøring av pro-inflammatoriske cytokiner slik som TNF-a, IL-1b, IL-12, IL-6 og GM-CSF, som er en prosess utløst ved translokalisering av NF-kB til kjernen, noe som tyder på en cytokinvirkning for eHsp70, noe som også har ført til forslaget om å tilskrive uttrykket chaperokin til eHsp70 for bedre å beskrive de unike funksjonene til eHsp70 som både et chaperon og cytokin.

Mye av in vivo-arbeidet på en rolle for eHsp70 i immunitet har blitt utført i gnagermodeller. Økninger i eHsp70-konsentrasjon som respons på hale-sjokk ble for eksempel assosiert med redusert inflammasjon og raskere innhentingstider etter en subkutan E.coli-injeksjon. I tillegg akselererte in vivo-levering av Hsp70 til mus lukking av sår, et trekk som sannsynlig skyldes forsterket makrofag-fagocytose av sårsmuss.

Bevis for de immunmodulerende rollene for Hsp70 hos mennesker mangler, men undersøkelser har vist sammenheng mellom økt eHsp70 og forbedret prognose/resultat for hjernetraume, selv om det motsatte også har blitt vist. Det er likevel også kjent at konsentrasjoner av eHsp70 faller med fremskridende alder, noe som kan tyde på en aldersrelatert redusert evne til å igangsette en full stressrespons, noe som igjen kan tilskrives den økte sykkeligheten og dødeligheten som observeres ved aldring, selv om dette kun er ren spekulasjon.

#### *Frigjøring av Hsp70*

Bortsett fra dataene som viser overføring av eHsp70 mellom naboceller slik som glia/akson-modellen så har flere rapporter dokumentert tilstedeværelsen av fritt eHsp70 i sirkulasjonen. For at Hsp70 skal kunne være til stede i denne avdelingen må den nødvendigvis ha blitt frigjort fra et organ/celle. To hovedveier for å oppnå dette blir vanligvis overveid. Den ene er en passiv måte der observasjonen av eHsp70 i den perifere sirkulasjonen er konsekvensen av frigjøring fra et intracellulært lager av Hsp70 som skyldes celledød eller celledød. Alternativt, eller kanskje i tillegg, så blir Hsp70 aktivt frigjort via en ikke-klassisk eksocytosevei.

Det har blitt foreslått at Hsp70 sammen med andre varmesjokkproteiner kun blir frigjort ved patologiske betingelser som fører til nekrotisk død og ikke ved programmert celledød. Det er ingen tvil om at alvorlig traume og patologiske tilstander som fører til nekrose kan føre til frigjøring av Hsp70 til blodstrømmen.

5 Dette har blitt godt dokumentert og vil også logisk være forventet. Likevel har nyere undersøkelser vist at Hsp70 kan bli frigjort fra intakte celler ved aktive mekanismer og at graden av stimulering bestemmer frigjøringsmåten. Sterke bevis for den ikke-nekrotiske frigjøringen av Hsp70 kommer også fra undersøkelser på treningsindusert frigjøring av eHsp70 til den perifere blodstrømmen. Avhengig av treningsmåten (jo høyere fysisk belastning, jo større frigjøring) så kan store økninger av eHsp70 bli påvist i den perifere blodstrømmen, og viktig er det at ingen undersøkelser har rapportert en direkte korrelasjon mellom eHsp70 og markører for muskulær skade. At eHsp70 kan bli frigjort uavhengig av cellulær skade eller

10 vevsskade har videre elegant blitt vist av Fleshner og samarbeidspartnere som har vist at psykologisk stress slik som predatorfrykt og elektrisk sjokk kan fremkalle en stressindusert eHsp70-frigjøring, en prosess som ble foreslått å være avhengig av katekolaminsignalisering.

15 Måten hsp70 forlater cellen på er fremdeles uklar, ikke minst fordi Hsp70 ikke inneholder noen klassisk peptidledersekvens som kan styre den mot utskilling. Siden klassisk utskilling allerede tidlig ble stilt spørsmål ved tyder dette i tillegg på at alternative mekanismer for frigjøring av eHsp70 må eksistere. Det har blitt vist at eHsp70 kan bli frigjort i vesikler karakterisert som eksosomer, men bevis har også

20 blitt fremlagt for at eHsp70 kan bli frigjort som fritt eHsp70, både i cellulære systemer i tillegg til in vivo. Det har blitt foreslått at lipidflåter er nødvendige for eHsp70-frigjøring selv om dette også er omdiskutert. Det har videre blitt vist at en funksjonell lysosomal avdeling er nødvendig for frigjøring av eHsp70 og at denne frigjøringen følges av tilstedeværelsen av lysosomale markørproteiner på overflaten

25 av cellene, noe som tyder på en utskilling avhengig av plasma – og lysosomal membranfusjon. Uavhengig av hvorvidt frigjøringen foregår via eksosomer eller via direkte frigjøring fra lysosomer er det interessant å legge merke til at en eller annen form for sekretorisk MVB/sen endosomal/lysosomal avdeling tydelig er involvert i alle frigjøringsmåter.

30 Siden katekolaminer vis den  $\alpha_1$ -adrenerge reseptoren kan føre til intracellulære kalsiumstrømmer, og fordi de samme kalsiumstrømmene har blitt foreslått å forårsake eksocytose av eksosomer, multivesikulære legemer og lysosomer, så sier en nåværende hypotese at under stress så fører økning i noradrenalin som virker på

35  $\alpha_1$ -adrenerge reseptorer til en kalsiumstrøm i cellen og en påfølgende frigjøring av Hsp70 i eksosomer.

#### Bioaktivt middel ifølge foreliggende oppfinnelse

40 Foreliggende oppfinnelse vedrører i én utførelsesform moduleringen av enzymatisk aktivitet, der nevnte enzym interagerer med BMP, ved anvendelsen av et bioaktivt middel som er i stand til å øke den intracellulære konsentrasjonen og/eller aktiviteten av Hsp70.

Moduleringen av enzymatisk aktivitet kan bli oppnådd ved å tilveiebringe én av de følgende klassene med forbindelser og terapier, som øker den intracellulære konsentrasjonen og/eller aktiviteten av Hsp70:

- 5           - Hsp70, eller et funksjonelt fragment eller variant derav,
- Hsp70-induserere og ko-induserere,
  - Småmolekyllegemidler slik som Bimocloamol og Arimocloamol
  - Membranfluidiserere slik som benzylalkohol
  - Subletal varmeterapi ( $\leq 42$  °C) eller hypertermi
- 10          - Visse legemidler fra gruppen av anti-inflammatoriske og anti-neoplastiske legemidler
  - Cellulært stress
    - Reaktive oksygenenheter (ROS)
    - Adrenalin, noradrenalin
- 15          - UV-lys
  - Strålingsterapi

Også tilkjennegitt blir ethvert middel, kjemikalie eller forbindelse som øker den intracellulære konsentrasjonen og/eller aktiviteten til Hsp70, og inkluderer HSP70 selv, eller et funksjonelt fragment eller variant derav, on enhver Hsp70-induserer eller ko-induserer som er kjent for fagfolk på området, hvorved nevnte bioaktive middel er i stand til å modulere aktiviteten til et enzym som interagerer med BMP.

Det følger at et bioaktivt middel kan øke den intracellulære konsentrasjonen og/eller aktiviteten til Hsp70, enten direkte eller indirekte.

I én utførelsesform er det bioaktive middelet ifølge foreliggende oppfinnelse en Hsp70-induserer eller ko-induserer.

I én utførelsesform omfatter det bioaktive middelet ifølge foreliggende oppfinnelse en kombinasjon av Hsp70, et funksjonelt fragment eller variant derav, og en Hsp70-induserer eller ko-induserer.

I ett aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse et bioaktivt middel som er i stand til å øke den intracellulære konsentrasjonen og/eller aktiviteten av Hsp70, for anvendelse som et medikament.

Det er et ytterligere aspekt av foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe et bioaktivt middel som er i stand til å øke den intracellulære konsentrasjonen og/eller aktiviteten av Hsp70, for anvendelse i behandlingen av en lysosomal lagringsforstyrrelse.

Det er et ytterligere aspekt av foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe et bioaktivt middel som er i stand til å øke den intracellulære konsentrasjonen og/eller aktiviteten for Hsp70, for anvendelse som et medikament eller for anvendelse i behandlingen av en lysosomal lagringsforstyrrelse.

5

I én utførelsesform kan nevnte behandling være profylaktisk, kurerende eller lindrende. I én spesifikk utførelsesform er nevnte behandling profylaktisk. I en annen utførelsesform er nevnte behandling kurerende. I en ytterligere utførelsesform er nevnte behandling lindrende.

10

I én utførelsesform er nevnte lysosomale lagringsforstyrrelse valgt fra gruppen som består av forstyrrelsene Niemann-Pick sykdom, Farber-sykdom, Krabbe-sykdom, Fabry-sykdom, Gaucher-sykdom, Sialidose, Metakromatisk leukodystrofi og saposin-mangel.

15

I en spesifikk utførelsesform er nevnte lysosomale lagringsforstyrrelse Niemann-Pick sykdom type A eller B. I en annen spesifikk utførelsesform er nevnte lysosomale lagringsforstyrrelse Farber-sykdom. I en annen spesifikk utførelsesform er nevnte lysosomale lagringsforstyrrelse Krabbe-sykdom. I en annen spesifikk utførelsesform er nevnte lysosomale lagringsforstyrrelse metakromatisk leukodystrofi. I en annen spesifikk utførelsesform er nevnte lysosomale lagringsforstyrrelse sialidose. I en annen spesifikk utførelsesform er nevnte lysosomale lagringsforstyrrelse Fabry-sykdom. I nok en annen spesifikk utførelsesform er nevnte lysosomale lagringsforstyrrelse Gaucher-sykdom. I nok en annen spesifikk utførelsesform er nevnte lysosomale lagringsforstyrrelse saposinmangel.

20

Det er også et aspekt ved foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe et bioaktivt middel som er i stand til å øke den intracellulære konsentrasjonen og/eller aktiviteten til Hsp70, for anvendelse i behandlingen av en lysosomal lagringsforstyrrelse, der nevnte lysosomale lagringsforstyrrelse er én, slik som to, for eksempel tre, slik som fire, for eksempel fem, slik som seks, for eksempel syv forstyrrelser som er valgt fra gruppen som består av Niemann-Pick sykdom, Farber-sykdom, Krabbe-sykdom, Fabry-sykdom, Gaucher-sykdom, Sialidose, Metakromatisk leukodystrofi og saposin-mangel.

30

Det følger at det bioaktive middelet ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli benyttet til behandlingen av en undergruppe av de lysosomale lagringsforstyrrelsene som er valgt fra gruppen som består av Niemann-Pick-sykdom, Farber-sykdom, Krabbe-sykdom, Fabry-sykdom, Gaucher-sykdom, Sialidose, Metakromatisk leukodystrofi og saposin-mangel.

35

40



I én spesifikk utførelsesform kan det bioaktive middelet ifølge foreliggende oppfinnelse bli benyttet i behandlingen av Niemann-Pick sykdom type A og B og Farber-sykdom.

5 Også tilkjennegitt er en kombinasjon av Hsp70, eller et funksjonelt fragment eller variant derav, og et stoff som øker interaksjonen mellom Hsp70 og BMP.

Det er nok et ytterligere aspekt av foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe anvendelsen av et bioaktivt middel som er i stand til å øke den intracellulære konsentrasjonen og/eller aktiviteten for Hsp70, for fremstillingen av et medikament for behandling av en lysosomal lagringsforstyrrelse.

10

Bioaktivt middel – Hsp70, eller et funksjonelt fragment eller variant derav

Også tilkjennegitt er moduleringen av enzymatisk aktivitet, der nevnte enzym interagerer med BMP, ved anvendelsen av Hsp70, eller et funksjonelt fragment eller variant derav.

15 Også tilkjennegitt er Hsp70, eller et funksjonelt fragment eller variant derav, for anvendelse som et medikament.

Også tilkjennegitt er Hsp70, eller et funksjonelt fragment eller variant derav, for anvendelse i behandling av lysosomale lagringsforstyrrelser.

20 Også tilkjennegitt er Hsp70, eller et funksjonelt fragment eller variant derav, for fremstillingen av et medikament for behandling av lysosomale lagringsforstyrrelser.

Det er på det rene at Hsp70, eller et funksjonelt fragment eller variant derav kan være ethvert naturlig eller syntetisk produkt, og kan bli fremstilt ved enhver konvensjonell teknikk som er kjent for fagfolk på området.

25 Hsp70, eller et funksjonelt fragment eller variant derav, kan bli rensset fra en naturlig kilde. Nevnte naturlige kilde kan være enhver plante, dyr eller bakterie som uttrykker, eller som kan bli induert til å uttrykke, Hsp70 i en form som er hensiktsmessig for administrering til et individ med behov derav.

30 Hsp70, eller et funksjonelt fragment eller variant derav, kan bli fremstilt syntetisk. Det følger at Hsp70, eller et funksjonelt fragment eller variant derav, kan være et rekombinant protein fremstilt ved konvensjonelle teknikker for dette og blir som et slikt betegnet rHsp70.

35 Hsp70, syntetisk eller naturlig, kan ha en sekvens som er avledet fra enhver hensiktsmessig art av plante, dyr eller bakterie. rHsp70 kan være avledet fra et pattedyr. Nevnte pattedyr kan være valgt fra gruppen som består av menneske (Homo sapiens), mus (Mus musculus). Ku, hund, rotte, ilder, svin, sau og ape. rHsp70 kan være avledet fra bakterier.

Hsp70 er delvis karakterisert ved å ha en svært høy grad av sekvenskonservering mellom arter, for slik muligens å tillate Hsp70 avledet fra en art å bli benyttet i en annen art uten å utløse en skadelig immunrespons.

Også tilkjennegitt er rHsp70 som har en sekvens som er avledet fra human Hsp70.

- 5 Også tilkjennegitt er rHsp70 som har en sekvens som er avledet fra mer enn én art. Nevnte Hsp70, eller et funksjonelt fragment eller variant derav, kan slik i én utførelsesform være en kimær.

Et rekombinant protein er et protein som er avledet fra rekombinant DNA.

- 10 Rekombinant DNA er en form for DNA som ikke eksisterer naturlig, som blir dannet ved å kombinere DNA-sekvenser som ikke naturlig ville forekomme sammen. Når det gjelder genetisk modifisering blir rekombinant DNA introdusert ved tilsetningen av relevant DNA inn i et eksisterende organisme-DNA, slik som plasmidene til bakterier, for å kode for ulike egenskaper for spesifikke formål. Det er forskjellig fra genetisk rekombinasjon ved at det ikke skjer via prosesser inne i
- 15 cellen, men blir iscenesatt av mennesker.

- Også tilkjennegitt er Hsp70 som har 100 % homologi med villtype-Gsp70-proteinet, eller mindre enn 100 % homologi med villtype-Hsp70-proteinet, slik som mellom 99,9 til 95 % homologi, for eksempel 95 til 90 % homologi, slik som 90 til 85 % homologi, for eksempel 85 til 80 % homologi, slik som 80 til 75 % homologi, for
- 20 eksempel 75 til 60 % homologi med villtypeproteinet. Uavhengig av graden av homologi er enhver variant av Hsp70 som opprettholder sin evne til å modulere den enzymatiske aktiviteten til et enzym som binder til BMP tilkjennegitt.

Også tilkjennegitt er Hsp70, slik som fullengde-Hsp70.

- Også tilkjennegitt er et funksjonelt fragment eller variant av Hsp70 som har den
- 25 ønskede funksjonen, som har en evne til å modulere den enzymatiske aktiviteten til et enzym, der nevnte enzym interagerer med BMP.

Også tilkjennegitt er et funksjonelt fragment eller variant av Hsp70.

Også tilkjennegitt er et funksjonelt fragment eller variant av Hsp70, der Hsp70 er modifisert ved delesjon(er), addisjon(er) eller substitusjon(er) i villtype-Hsp70.

- 30 Villtype-Hsp70-proteinet har en total lengde på 641 aminosyrer. Et fragment av Hsp70 omfatter ethvert fragment med en total lengde på mindre enn villtypefragmentet på 641 aminosyrer, slik som mindre enn 625 aminosyrer, for eksempel mindre enn 600 aminosyrer, slik som mindre enn 575 aminosyrer, for eksempel mindre enn 550 aminosyrer, slik som mindre enn 525 aminosyrer, for
- 35 eksempel mindre enn 500 aminosyrer, slik som mindre enn 475 aminosyrer, for eksempel mindre enn 450 aminosyrer, slik som mindre enn 425 aminosyrer, for eksempel mindre enn 400 aminosyrer, slik som mindre enn 375 aminosyrer, for eksempel mindre enn 350 aminosyrer, slik som mindre enn 325 aminosyrer, for

eksempel mindre enn 300 aminosyrer, slik som mindre enn 275 aminosyrer, for  
 eksempel mindre enn 250 aminosyrer, slik som mindre enn 225 aminosyrer, for  
 eksempel mindre enn 200 aminosyrer, slik som mindre enn 175 aminosyrer, for  
 eksempel mindre enn 150 aminosyrer, slik som mindre enn 125 aminosyrer, for  
 5 eksempel mindre enn 100 aminosyrer, slik som mindre enn 75 aminosyrer, for  
 eksempel mindre enn 50 aminosyrer, slik som mindre enn 25 aminosyrer.

Villtype-Hsp70-proteinet har en total lengde på 641 aminosyrer. Et fragment av  
 Hsp70 er i én utførelsesform ment å skulle omfatte ethvert fragment med en total  
 lengde på mer enn 10 aminosyrer, slik som mer enn 25 aminosyrer, for eksempel  
 10 mer enn 50 aminosyrer, slik som mer enn 75 aminosyrer, for eksempel mer enn 100  
 aminosyrer, slik som mer enn 125 aminosyrer, for eksempel mer enn 150  
 aminosyrer, slik som mer enn 175 aminosyrer, for eksempel mer enn 200  
 aminosyrer, slik som mer enn 225 aminosyrer, for eksempel mer enn 250  
 aminosyrer, slik som mer enn 275 aminosyrer, for eksempel mer enn 300  
 15 aminosyrer, slik som mer enn 325 aminosyrer, for eksempel mer enn 350  
 aminosyrer, slik som mer enn 375 aminosyrer, for eksempel mer enn 400  
 aminosyrer, slik som mer enn 425 aminosyrer, for eksempel mer enn 450  
 aminosyrer, slik som mer enn 475 aminosyrer, for eksempel mer enn 500  
 aminosyrer, slik som mer enn 525 aminosyrer, for eksempel mer enn 550  
 20 aminosyrer, slik som mer enn 575 aminosyrer, for eksempel mer enn 600  
 aminosyrer, slik som mer enn 625 aminosyrer.

Det følger at den totale lengden av fragmentet av Hsp70 kan ligge innenfor området  
 på 5 til 25 aminosyrer, slik som 25 til 50 aminosyrer, for eksempel 50 til 75  
 aminosyrer, slik som 75 til 100 aminosyrer, for eksempel 100 til 125 aminosyrer,  
 25 slik som 125 til 150 aminosyrer, for eksempel 150 til 175 aminosyrer, slik som 175  
 til 200 aminosyrer, for eksempel 200 til 225 aminosyrer, slik som 225 til 250  
 aminosyrer, for eksempel 250 til 275 aminosyrer, slik som 275 til 300 aminosyrer,  
 for eksempel 300 til 325 aminosyrer, slik som 325 til 350 aminosyrer, for eksempel  
 350 til 375 aminosyrer, slik som 375 til 400 aminosyrer, for eksempel 400 til 425  
 30 aminosyrer, slik som 425 til 450 aminosyrer, for eksempel 450 til 475 aminosyrer,  
 slik som 475 til 500 aminosyrer, for eksempel 500 til 525 aminosyrer, slik som 525  
 til 550 aminosyrer, for eksempel 550 til 575 aminosyrer, slik som 575 til 600  
 aminosyrer, for eksempel 600 til 625 aminosyrer, slik som 625 til 640 aminosyrer.

Fragmentet eller varianten av Hsp70 kan omfatte hele eller deler av ATPase-  
 35 domenet til Hsp70. Det følger at fragmentet eller varianten av Hsp70 kan omfatte  
 hele eller del av aminosyrenummer 30 til 382.

Fragmentet eller varianten av Hsp70 kan omfatte tryptofan på aminosyreposisjon 90  
 på Hsp70-ATPase-domenet.

Et fragment av Hsp70 kan være en trunkert versjon av villtypeproteinet, noe som  
 40 betyr at det er en kortere versjon. Et fragment kan være trunkert ved å forkorte

proteinet fra enten den aminoternale eller karboksyterminale enden til proteinet, eller det kan bli trunkert ved delesjon av én eller flere interne regioner av enhver størrelse i proteinet.

5 Et fragment eller variant av Hsp70 kan ha 100 % homologi med villtypeproteinet. Fragmentet eller varianten av Hsp70 kan også være en variant av Hsp70 som har mindre enn 100 % homologi med villtypeproteinet, slik som mellom 99,9 til 95 % homologi, for eksempel 95 til 90 % homologi, slik som 90 til 85 % homologi, for eksempel 85 til 80 % homologi, slik som 80 til 75 % homologi, for eksempel 75 til 60 % homologi med villtypeproteinet.

10 Det skal forstås slik at ethvert fragment eller variant av Hsp70 som opprettholder sin evne til å modulere lysosomal enzymaktivitet er tilkjenegitt.

Det skal bli forstått slik at ethvert fragment eller variant av Hsp70 som opprettholder sin evne til å interagere med BMP er tilkjenegitt.

15

Det er på det rene at den eksakte kvantitative effekten av det funksjonelle fragmentet eller varianten kan være forskjellig fra effekten av fullengdemolekylet. I noen tilfeller kan faktisk det funksjonelle fragmentet eller varianten være mer effektive enn fullengdemolekylet. Videre kan den tilkjenegitte anvendelsen av fragmenter i stedet for fullengdemolekyler være fordelaktig i lys av mindre størrelse for fragmentene.

20

Et funksjonelt fragment eller variant av Hsp70 være en variant av Hsp70 der én eller flere aminosyrer har blitt substituert. Nevnte substitusjon(er) kan være en ekvivalent eller konservativ substitusjon(er), eller en ikke-ekvivalent eller ikke-konservativ substitusjon(er).

25

Mellom 0,1 til 1 % av aminosyrerestene i villtype-Hsp70 kan bli substituert, slik som mellom 1 til 2 % aminosyrerester, for eksempel mellom 2 til 3 % aminosyrerester, slik som mellom 3 til 4 % aminosyrerester, for eksempel mellom 4 til 5 % aminosyrerester, slik som mellom 5 til 10 % aminosyrerester, for eksempel mellom 10 til 15 % aminosyrerester, slik som mellom 15 til 20 % aminosyrerester, for eksempel mellom 20 til 30 % aminosyrerester, slik som mellom 30 til 40 % aminosyrerester, for eksempel mellom 40 til 50 % aminosyrerester, slik som mellom 50 til 60 % aminosyrerester, for eksempel mellom 60 til 70 % aminosyrerester, slik som mellom 70 til 80 % aminosyrerester, for eksempel mellom 80 til 90 % aminosyrerester, slik som mellom 90 til 100 % aminosyrerester.

30

35

Mellom 1 til 5 av aminosyrerestene i villtype-Hsp70 kan bli substituert, slik som mellom 5 til 10 aminosyrerester, for eksempel mellom 10 til 15 aminosyrerester,

slik som mellom 15 til 20 aminosyrerester, for eksempel mellom 20 til 30 aminosyrerester, slik som mellom 30 til 40 aminosyrerester, for eksempel mellom 40 til 50 aminosyrerester, slik som mellom 50 til 75 aminosyrerester, for eksempel mellom 75 til 100 aminosyrerester, slik som mellom 100 til 150 aminosyrerester, for eksempel mellom 150 til 200 aminosyrerester, slik som mellom 200 til 300 aminosyrerester, for eksempel mellom 300 til 400 aminosyrerester, slik som mellom 400 til 500 aminosyrerester.

Også tilkjenngitt er et funksjonelt fragment eller variant av Hsp70 som er et fusjonsprotein. Nevnte funksjonelle fragment eller variant av Hsp70 kan være fusjonert til et merke.

#### *Fortrinn ved å benytte Hsp70*

Som diskutert ovenfor finnes det ingen kurer for de lysosomale lagringssykdommene og behandling er for det meste symptomatisk, med unntaket av utviklingen av enzymerstatningsterapier (ERT) for Gaucher-sykdom og Fabry-sykdom. Som nevnt er ERT en svært dyr form for terapi som kun er effektiv for én spesifikk sykdom.

For oppfinnerne er det per i dag ikke kjent noen vellykkede forsøk på å tilveiebringe ERT for de gjenværende lysosomale lagringsforstyrrelsene som er assosiert med lipidakkumulering, og slik er det et stort umettet behov for en effektiv og spesifikk behandling av disse LSD'ene i dag.

Anvendelsen av Hsp70, induserere eller ko-induserere ifølge foreliggende oppfinnelse, kan også bli benyttet til behandling av mer enn én spesifikk lysosomal lagringsforstyrrelse. Faktisk kan det bioaktive middelet som er i stand til å øke den intracellulære konsentrasjonen og/eller aktiviteten av Hsp70 bli benyttet til behandling av enhver lysosomal lagringssykdom som kan bli reversert ved å modulere den enzymatiske aktiviteten til det involverte defekte enzymet, der nevnte enzym interagerer med BMP.

#### *Ektopisk uttrykking av Hsp70*

Også tilkjenngitt er en vektor som koder for Hsp70, eller et funksjonelt fragment eller variant derav.

Hsp70, eller et funksjonelt fragment eller variant derav, bli administrert til et individ med behov derav i formen av en vektor.

Vektoren som blir benyttet for å uttrykke Hsp70, eller et funksjonelt fragment eller variant derav, kan bli valgt fra gruppen som består av: virusvektorer (retrovirale eller adenovirale) eller ikke-virusvektorer (plasmid, cosmid, bakteriofag).

- Nevnte vektor kan omfatte ett eller flere replikasjonsstartsteder, en markør for seleksjon og ett eller flere gjenkjennings seter for en restriksjonsendonuklease. Nevnte vektor kan være opererbart koblet til regulatoriske sekvenser som kontrollerer transkripsjonen av nevnte Hsp70, eller et funksjonelt fragment eller variant derav, i en passende vertscelle.
- Også tilkjennegitt er en fremgangsmåte for produksjon av Hsp70, eller et funksjonelt fragment eller variant derav, som beskrevet her, der nevnte fremgangsmåte omfatter trinnene med å tilveiebringe en vektor som koder for nevnte Hsp70, eller et funksjonelt fragment eller variant derav, og uttrykke nevnte vektor enten in vitro eller in vivo i en passende vertsorganisme, for derved å produsere nevnte Hsp70, eller et funksjonelt fragment eller variant derav.
- Også tilkjennegitt er en isolert rekombinant eller transgen vertscelle som omfatter en vektor som koder for Hsp70, eller et funksjonelt fragment eller variant derav, ifølge foreliggende oppfinnelse.
- Også tilkjennegitt er en fremgangsmåte for å generere en rekombinant eller transgen vertscelle, der nevnte fremgangsmåte omfatter trinnene med å tilveiebringe en vektor som koder for Hsp70, eller et funksjonelt fragment eller variant derav, introdusere nevnte vektor inn i nevnte rekombinante eller transgene vertscelle og eventuelt også uttrykke nevnte vektor i nevnte rekombinante eller transgene vertscelle, for derved å generere en rekombinant eller transgen vertscelle som produserer nevnte Hsp70, eller et funksjonelt fragment eller variant derav.
- Også tilkjennegitt er en transgen pattedyrorganisme som omfatter vertscellen beskrevet ovenfor.
- Den transgene pattedyrorganismen som omfatter den rekombinante eller transgene vertscellen kan være ikke-human.
- Den transgene vertscellen kan bli valgt fra gruppen som består av en pattedyr-, plante-, bakterie-, gjær- eller soppvertscelle.
- For å forbedre leveringen av DNA'et inn i cellen må DNA'et bli beskyttet fra skade og dets inngang inn i cellen må bli fremmet. Lipoplekser og polyplekser har blitt dannet som har evnen til å beskytte DNA'et fra uønsket nedbrytning under transfeksjonsprosessen. Plasmid-DNA kan bli belagt med lipider i en organisert struktur som i en micelle eller et liposom. Når den organiserte strukturen blir kompleksert med DNA blir den kalt en lipopleks. Det finnes tre typer lipider som kan bli benyttet for å danne liposomer; anioniske (negativt ladde), nøytrale eller kationiske (positivt ladde). Komplekser av polymerer med DNA blir kalt polyplekser. De fleste polyplekser består av kationiske polymerer og deres produksjon er regulert ved ioniske interaksjoner.

Også tilkjennegitt er en vektor som omfatter Hsp70, eller et funksjonelt fragment eller variant derav, benyttet til genterapi. Genterapi er innsettingen av gener inn i et individs celler og vev for å behandle en sykdom, slik som en arvelig sykdom der et skadelig mutant allel blir erstattet med et funksjonelt allel.

- 5 Også tilkjennegitt er Hsp70, eller et funksjonelt fragment eller variant derav, bli administrert som nakent DNA. Dette er den enkleste formen for ikke-viral transfeksjon. Levering av nakent DNA kan bli utført ved anvendelse av elektroporering, sonoporering, eller anvendelsen av en "gen-kanon" som skyter DNA-belagte gullpartikler inn i en celle ved å benytte høytrykks-gass.

10

#### Bioaktivt middel, Hsp70-induserere og ko-induserere

Foreliggende oppfinnelse vedrører i én utførelsesform moduleringen av enzymatisk aktivitet, der nevnte enzym interagerer med BMP, ved anvendelsen av Hsp70-induserere eller ko-induserere.

- 15 En Hsp70-induserer er en forbindelse som i seg selv kan amplifisere Hsp70-genuttrykking og proteinuttrykking uten et samtidig stress.

En Hsp70-ko-induserer er en forbindelse som ikke kan amplifisere Hsp70-genuttrykking og proteinuttrykking uten et samtidig (mildt) stress, men den stressinduserte økningen i Hsp70-nivåer blir ytterligere forhøyet eller forsterket ved deres tilstedeværelse.

20

Også tilkjennegitt er en Hsp70-induserer eller ko-induserer til anvendelse som et medikament.

Det er et aspekt av foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe en Hsp70-induserer eller ko-induserer for anvendelse i behandling av lysosomale lagringsforstyrrelser.

- 25 Det er nok et ytterligere aspekt av foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe anvendelsen av en Hsp70-induserer eller ko-induserer, for fremstillingen av et medikament for behandling av lysosomale lagringsforstyrrelser.

I én utførelsesform er nevnte lysosomale lagringsforstyrrelse valgt fra gruppen som består av Niemann-Pick sykdom, Farber-sykdom, Krabbe-sykdom, Fabry-sykdom, Gaucher-sykdom, metakromatisk leukodystrofi, sialidose og saposin-mangel.

30

I en spesifikk utførelsesform er nevnte lysosomale lagringsforstyrrelse Niemann-Pick-sykdom type A eller B. I en annen spesifikk utførelsesform er nevnte lysosomale forstyrrelse Farber-sykdom. I en annen spesifikk utførelsesform er nevnte lysosomale forstyrrelse Krabbe-sykdom. I en annen spesifikk utførelsesform er nevnte lysosomale forstyrrelse metakromatisk leukodystrofi. I en annen spesifikk utførelsesform er nevnte lysosomale forstyrrelse sialidose. I en annen spesifikk utførelsesform er nevnte lysosomale forstyrrelse Fabry-sykdom. I nok en annen

35

spesifikk utførelsesform er nevnte lysosomale forstyrrelse Gaucher-sykdom. I nok en annen spesifikk utførelsesform er nevnte lysosomale forstyrrelse saposin-mangel.

I én utførelsesform er det bioaktive middelet ifølge foreliggende oppfinnelse en Hsp70-induserer eller ko-induserer. I en spesifikk utførelsesform er det bioaktive middelet ifølge foreliggende oppfinnelse en Hsp70-induserer. I en annen spesifikk utførelsesform er det bioaktive middelet ifølge foreliggende oppfinnelse en Hsp70-ko-induserer.

#### *Småmolekyl-legemidler – hydroksylaminderivater*

10 I én utførelsesform er nevnte er det bioaktive middelet ifølge foreliggende oppfinnelse en Hsp70-ko-induserer. I en ytterligere utførelsesform er nevnte Hsp70-ko-induserer et småmolekyl-legemiddel.

I en spesifikk utførelsesform er Hsp70-ko-indusereren ifølge foreliggende oppfinnelse et hydroksylaminderivat. Nevnte hydroksylaminderivat kan i en ytterligere utførelsesform bli valgt fra gruppen av Bimoclolomol (BRLP-42), Arimoclolomol (BRX-220), BRX-345 og BGP-15.

I en spesifikk utførelsesform er nevnte hydroksylaminderivat Arimoclolomol (BRX-220).

20 Bimoclolomol ([2-hydroksy-3-(1-piperidinyl)propoksy]-3-pyridin-karboksimidoyl-kloridmaleat) er en ikke-toksisk forbindelse som opprinnelig ble utviklet for behandling av diabeteskomplikasjoner slik som nevropatier. Bimoclolomol har blitt vist å forbedre celleoverlevelse under eksperimentelle stressbetingelser delvis ved å øke intracellulære varmesjokkproteiner (HSP'er), inkludert Hsp70, via en aktivering av HSF-1. Det har blitt vist at bimoclolomol innehar evnen til Hsp70-ko-induksjon i fraværet av ikke-foldede proteiner, og at bimoclolomol interagerer med og øker fluiditeten til negativt ladde membranlipider. BRX-345 er en strukturell analog av bimoclolomol med noe mindre evne til å indusere HSP'er.

30 Arimoclolomol (BRX-220) er en analog av bimoclolomol som også interagerer med og amplifiserer varmesjokkresponsen. Arimoclolomol er per i dag under klinisk utprøving for behandlingen av ALS (amyotrofisk lateral sklerose), som er en progressiv nevrodegenererende forstyrrelse. Arimoclolomol er eiet av CytRx Corporation.

35 Det er slik et aspekt av oppfinnelsen å tilveiebringe en hydroksylaminderivat-Hsp70-ko-induserer for anvendelse i behandling av lysosomale lagringsforstyrrelser.

Det er nok et ytterligere aspekt av foreliggende oppfinnelse å benytte en hydroksylaminderivat-Hsp70-ko-induserer i fremstillingen av et medikament for behandling av lysosomale lagringsforstyrrelser.



I én utførelsesform er nevnte lysosomale lagringsforstyrrelse valgt fra gruppen av Niemann-Pick sykdom, Farber-sykdom, Krabbe-sykdom, Fabry-sykdom, Gaucher-sykdom, metakromatisk leukodystrofi, sialidose og saposin-mangel.

#### 5 *Membranfluidiserere*

I én utførelsesform er det bioaktive middelet ifølge foreliggende oppfinnelse en Hsp70-induserer. Også tilkjenngitt er en Hsp70-induserer som er en membranfluidiserer.

Behandling med en membranfluidiserer kan også bli betegnet lipidterapi.

10 Også tilkjenngitt er en Hsp70-induserer som er en membranfluidiserer som er valgt fra gruppen av benzylalkohol, heptanol, AL721, docosaheksaensyre, alifatiske alkoholer, oleylalkohol, dimetylaminoetanol, A<sub>2</sub>C, farnesol og anestetika slik som lidokain, ropivacain, bupivacain og mepivacain, i tillegg til andre som er kjent for fagfolk på området.

15 Ved siden av denatureringen av en andel av cellulære proteiner under varme (proteotoksisitet) er også en endring i fluiditeten til membraner foreslått å være en cellulær termosensor som setter i gang varmesjokkresponsen og induserer HSP'er. Faktisk er kjemisk induserte membranperturberinger – analogt med varmeindusert plasmamembranfluidisering – i stand til å aktivere HSP, uten å forårsake  
20 proteindenaturering.

Membranfluiditet refererer til viskositeten til lipidbilaget i en cellemembran. Membranfosfolipidene inkorporerer fettsyrer av varierende lengde og metning.

Membranfluidisererne virker ved å interkalere mellom membranlipider for slik å inducere en forstyrrende effekt ved å svekke van der Waals-interaksjoner mellom  
25 lipidacylkjedene.

Også tilkjenngitt blir en membranfluidiserer som er valgt fra gruppen benzylalkohol, heptanol, AL721, docosaheksaensyre, alifatiske alkoholer, oleylalkohol, dimetylaminoetanol, A<sub>2</sub>C, farnesol og anestetika slik som lidokain, ropivacain, bupivacain og mepivacain, i tillegg til andre som er kjent for fagfolk på  
30 området, til anvendelse i behandling av lysosomale lagringsforstyrrelser.

Også tilkjenngitt blir anvendelsen av en membranfluidiserer som er valgt fra gruppen av benzylalkohol, heptanol, AL721, docosaheksaensyre, alifatiske alkoholer, oleylalkohol, dimetylaminoetanol, A<sub>2</sub>C, farnesol og anestetika slik som lidokain, ropivacain, bupivacain og mepivacain, i tillegg til andre som er kjent for  
35 fagfolk på området, i fremstillingen av et medikament for behandling av lysosomale lagringsforstyrrelser.

Nevnte lysosomale lagringsforstyrrelse kan bli valgt fra gruppen som består av Niemann-Pick sykdom, Farber-sykdom, Krabbe-sykdom, Fabry-sykdom, Gaucher-sykdom, metakromatisk leukodystrofi, sialidose og saposin-mangel.

5 *Andre måter for indusering av Hsp70*

Enhver måte for indusering av Hsp70-uttrykking er tilkjennegitt, der noen av disse er forklart her nedenfor.

Økning av temperaturen hos et individ er en sterk induserer av HSP'er inkludert Hsp70, og som en slik er ikke-dødelig tilkjennegitt. Ikke-dødelig varmeterapi kan omfatte å øke temperaturen til et individ til en kjernetemperatur på omkring 38 °C, 10 slok som omkring 39 °C, for eksempel 40 °C, slik som omkring 41 °C, for eksempel omkring 42 °C, slik som omkring 43 °C.

Også tilkjennegitt er ikke-dødelig varmeterapi for anvendelse i behandling av lysosomale lagringsforstyrrelser.

15 Psykologisk stress slik som predatorfrykt og elektrisk sjokk kan fremprovosere en stressindusert eHsp70-frigjøring, en prosess som er foreslått å være avhengig av katekolaminsignalisering. Videre kan adrenalin og noradrenalin fremprovosere Hsp70-frigjøring.

20 De følgende forbindelsene har blitt vist å indusere (eller ko-indusere) HSP'er, inkludert Hsp70: den membraninteraktive forbindelsen alkyllysofosfolipid Edelfosin (ET-18-OCH<sub>3</sub> eller 1-oktadecyl-2-metyl-rac-glysero-3-fosfokolin), anti-inflammatoriske legemidler inkludert syklooksygenase-1-/2-inhibitorer slik som celecoxib og rofecoxib, i tillegg til NSAID'er slik som acetylsalisylsyre, natriumsalicylat og indometacin, prostaglandiner PGA<sub>1</sub>, PGj<sub>2</sub> og syklopten-1-on, 25 peroksidaseproliferatoraktiverede reseptor-gammaagonister, tubulin-interagerende antikreftmidler inkludert vincristin og paclitaxel, insulinsensitisereren pioglitazon, antineoplastiske midler slik som carboplatin, doxorubicin, fludarabin, ifosfamid og cytarabin, Hsp90-inhibitorer geldanamycin, 17-AAG, 17-DMAG, radicicol, herbimycin-A og arakidonsyre, proteasom-inhibitorer MG132 og 30 lactacystin, serinproteaseinhibitorer DCIC, TLCK og TPCK, anti-sårlegemidlene geranylgeranylaceton (GGA), rebamipid, carbenoxolon og polaprezinc (sink-L-carnosin), tungmetaller (sink og tinn), det anti-inflammatoriske legemidlet dexametason, kokain, nikotin, alkohol, alfa-adrenerge agonister, sykloptenonprostanoider, i tillegg til urtemedisinene paeoniflorin, glycyrrizin, 35 celastrol, dihydrocelastroidiacetat og curcumin.

Også tilkjennegitt er en forbindelse som er valgt fra gruppen av Edeifosin (ET-18-OCH<sub>3</sub> eller 1-oktadecyl-2-metyl-rac-glysero-3-fosfokolin), celecoxib og rofecoxib, acetylsalisylsyre, natriumsalicylat, indometacin, PGA<sub>1</sub>, PGj<sub>2</sub> og syklopten-1-on, peroksidaseproliferatoraktiverede reseptor-gammaagonister, vincristin, paclitaxel,

pioglitazon, carboplatin, doxorubicin, fludarabin, ifosfamid, cytarabin, geldanamycin, 17-AAG, 17-DMAG, radicicol, herbimycin-A, arakidonsyre, MG132, lactacystin, DCIC, TLCK, TPCK, geranylgeranylacetone (GGA), rebamipid, carbenoxolon, polaprezinc (sink-L-carnosin), dexametason, kokain, nikotin, alkohol, alfa-adrenerge agonister, syklopienonprostanoider, paeoniflorin, glycyrrizin, celastrol, dihydrocelastroidiacetat og curcumin, i tillegg til andre HSP-induserere som er kjent for fagfolk på området, til anvendelse i behandling av lysosomale lagringsforstyrrelser.

#### 10 Farmasøytisk preparat ifølge foreliggende oppfinnelse

Foreliggende oppfinnelse vedrører moduleringen av enzymatisk aktivitet, der nevnte enzym interagerer med BMP, ved anvendelse av et bioaktivt middel som er i stand til å øke konsentrasjonen og/eller aktiviteten av Hsp70, for derved å hjelpe pasienter som lider av lysosomale lagringsforstyrrelser.

15 Mens det er mulig for de bioaktive midlene ifølge foreliggende oppfinnelse å bli administrert som det ubehandlede kjemikalet, så er det foretrukket å presentere dem i formen av en farmasøytisk formulering. Dermed tilveiebringer foreliggende oppfinnelse ytterligere et farmasøytisk preparat for medisinsk bruk, som omfatter et bioaktivt middel ifølge foreliggende oppfinnelse eller farmasøytisk akseptable salter derav, som definert her, og en farmasøytisk akseptabel bærer for dette.

20 Det er et aspekt av foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe et preparat, slik som et farmasøytisk preparat, som omfatter et bioaktivt middel identifisert her som kan bli administrert til et individ med behov for dette.

25 I én utførelsesform vedrører oppfinnelsen et preparat som omfatter et bioaktivt middel ifølge foreliggende oppfinnelse. Preparatet kan slik det er beskrevet her i én utførelsesform bli formulert i kombinasjon med en fysiologisk akseptabel bærer. Preparatet kan slik det er beskrevet her i én utførelsesform bli formulert i kombinasjon med en farmasøytisk akseptabel bærer.

30 Farmasøytiske preparater som inneholder et bioaktivt middel ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli fremstilt ved konvensjonelle teknikker, for eksempel som beskrevet i Remington: The Science and Practice of Pharmacy 1995, redigert av E.W. Martin, Mack Publishing Company, 19. utgave, Easton, Pa, USA.

35 De bioaktive midlene ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli formulert for parenteral administrering og kan bli presentert i enhetsdoseform i ampuller, forhåndsfylte sprøyter, infusjons- eller flerdosebeholdere med lite volum med et tilsatt conserveringsmiddel. Preparatene kan ha slike former som suspensjoner, løsninger eller emulsjoner oljeaktige eller vandige vehikler, bærere,

fortynningsmidler eller løsningsmidler inkludert vandige løsninger av mineralsalter eller andre vannløselige molekyler, propylenglykol, polyetylen glykol, vegetabiliske oljer, animalske oljer, syntetiske oljer, injiser bare organiske estere, og kan inneholde formuleringsmidler slik som conserveringsmidler, fuktemidler, emulgatorer eller suspensjonsmidler, stabiliseringsmidler og/eller dispergeringsmidler, fargemidler, buffere, fortykningsmidler, løseliggjørende midler og liknende. Alternativt kan den aktive ingrediensen foreligge i pulverform, oppnådd ved aseptisk isolering av sterilt fast stoff eller ved lyofilisering fra løsning for konstituering før anvendelse med en passende vehikkel, for eksempel sterilt pyrogenfritt vann.

Farmasøytisk akseptable salter av de bioaktive midlene, der de kan bli fremstilt, er også ment å skulle være dekket ved denne oppfinnelsen, og der er også spesifikke hydratformer av et salt. Disse saltene vil være de som er akseptable i deres benyttelse i en farmasøytisk anvendelse. Med det menes det at saltet vil opprettholde den biologiske aktiviteten til mor-forbindelsen og saltet vil ikke ha uønskede eller skadelige effekter ved sin bruk og anvendelse i behandling av sykdommer.

Farmasøytisk akseptable salter blir fremstilt på en standardmåte. Dersom mor-forbindelsen er en base blir den behandlet med et overskudd av en organisk eller uorganisk syre i et passende løsningsmiddel. Dersom mor-forbindelsen er en syre blir den behandlet med en uorganisk eller organisk base i et passende løsningsmiddel.

Enhver passende formulering av det bioaktive middelet ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli benyttet, som er kjent for fagfolk på området.

Også tilkjenne gitt er Hsp70, eller et funksjonelt fragment eller variant derav, formulert i en biologisk nedbrytbar mikrosfære, slik som et liposom.

### Administrering

Enhver passende administreringsmåte kan bli benyttet for å tilveiebringe et pattedyr, fortrinnsvis et menneske, med en effektiv mengde med bioaktivt middel ifølge foreliggende oppfinnelse.

Administrering av bioaktive midler eller farmasøytiske preparater til et individ med behov derav kan foregå via tre hovedruter for levering: 1) Topisk (påført kroppsoverflater slik som hud eller slimhinner), 2) Enteral (via gastrointestinaltraktus eller fordøyelsessystemet) og 3) Parenteralt (ruter forskjellig fra gastrointestinaltraktus eller fordøyelsessystemet).

Topisk administrering inkluderer epikutant (påføring på huden), inhalering, klyster, øyedråper (på øyets bindehinne), øredråper, intranasal og vaginal administrering.

Enteral administrering er enhver form for administrering som involverer enhver del av gastrointestinaltraktus og inkluderer oral administrering (gjennom munn, for eksempel tabletter, kapsler eller dråper), intrarektal (for eksempel stikkpille eller klyster) administrering ved siden av gastro- eller duodenaltilførselsrør.

- 5 Parenteral levering, slik som ved injeksjon eller infusjon, er effektiv for å levere det bioaktive middelet til et målsted eller for å introdusere legemiddelet inn i blodstrømmen, og inkluderer intravenøs (inn i en vene), intra-arteriell (inn i en arterie), intramuskulær (inn i en muskel), intrakardial (inn i hjertet), subkutan (under huden), intraosseøs (inn i benmargen), intradermal (inn i selve huden),  
10 intratekal eller intraspinal (inn i ryggmargskanalen), intraperitoneal (inn i peritoneum), transdermal (diffusjon gjennom den intakte huden), transmukosal (diffusjon gjennom en slimhinne­membran, for eksempel innsufflering (inn gjennom nesen), sublingvale, buccale eller vaginale stikkpiller), inhalering, epidural (inn i epiduralrommet) og intravitreal (inn i øyet). Sublingval administrering (under  
15 tungen) er også en form for parenteral administrering hvorved bioaktive midler diffuserer inn i blodstrømmen gjennom slimhinnevevet under tungen. Det bioaktive middelet ifølge foreliggende oppfinnelse kan bli administrert ved enhver parenteral rute for levering og fortrinnsvis enhver av de som er beskrevet ovenfor.

- 20 Parenteral levering har fortrinnet av å unngå nedbrytning i gastrointestinaltraktus, noe som er assosiert ved enteral levering.

Parenteral levering har det ytterligere fortrinnet å unngå førstehåndsmetabolisme som er assosiert med enteral levering fordi den tillater forbindelser å bli absorbert direkte inn i den systemiske sirkulasjonen.

- 25 Førstehåndsmetabolisme er et fenomen ved legemiddel­metabolisme hvorved konsentrasjonen av et legemiddel blir redusert i stor grad før det når den systemiske sirkulasjonen. Det er fraksjonen med tapt legemiddel under absorpsjonsprosessen som generelt er relatert til leveren og tarmveggen.

- 30 Etter at et legemiddel er svelget blir det absorbert av fordøyelsessystemet og kommer inn i det hepatiske portalsystemet. Det blir fraktet gjennom portvenen inn i leveren før det når resten av kroppen. Leveren metaboliserer mange legemidler, noen ganger i et slikt omfang at kun en liten del av aktivt legemiddel kommer ut av leveren til resten av sirkulasjonssystemet. Den første passeringen gjennom leveren reduserer slik den biologiske tilgjengeligheten av legemiddelet mye.

- 35 De fire primære systemene som påvirker den første passeringseffekten for et legemiddel er enzymene i gastrointestinal­lumen, tarmveggenzymer, bakterielle enzymer og lever­enzymer.

Passende doseringsformer for slik administrering kan bli fremstilt ved konvensjonelle teknikker. Passende doseringsformer for administrering ved

inhalering, slik som en aerosolformulering eller inhalator med utmålt dose, kan bli fremstilt ved konvensjonelle teknikker.

I én utførelsesform er en spesifikk administreringsmåte for et bioaktivt middel ifølge foreliggende oppfinnelse parenteral administrering.

- 5 I én utførelsesform er en spesifikk parenteral administrering av et bioaktivt middel ifølge foreliggende oppfinnelse administrering intravenøst, subkutant, intramuskulært, intraarterielt, subkutant eller intraperitoneal injeksjon.

I én utførelsesform er en spesifikk parenteral administrering av et bioaktivt middel ifølge foreliggende oppfinnelse inhalering.

10

I én utførelsesform er en spesifikk parenteral administrering av et bioaktivt middel ifølge foreliggende oppfinnelse intravenøs infusjon.

- 15 Intravenøs infusjon ifølge foreliggende oppfinnelse kan i én utførelsesform foregå over en tidsperiode på fra 10 minutter til 20 minutter, slik som 20 til 30 minutter, for eksempel 30 til 40 minutter, slik som 40 til 50 minutter, for eksempel 50 til 60 minutter, slik som 60 til 90 minutter, for eksempel 90 til 120 minutter, slik som 2 timer til 3 timer, for eksempel 3 til 4 timer, slik som 4 til 5 timer, for eksempel 5 til 6 timer, slik som 6 til 7 timer, for eksempel 7 til 8 timer.

- 20 I en spesifikk utførelsesform blir parenteral administrering av et bioaktivt middel ifølge foreliggende oppfinnelse utført ved transmukosal levering. Nevnte transmukosale levering er i én utførelsesform sublingval levering, i en annen utførelsesform er nevnte transmukosale levering buccal levering, og i nok en annen utførelsesform er nevnte transmukosale levering innsufflering eller intranasal
- 25 levering.

Doseringsformer inkluderer tabletter, pastiller, dispersjoner, suspensjoner, løsninger, kapsler, kremer, salver, emulsjoner, geler, lotions, pastaer, aerosoler, eller andre former som er kjent på fagområdet.

- 30 Den effektive doseringen av aktiv ingrediens som benyttes kan variere avhengig av det spesifikke preparatet som benyttes, administreringsmåten, tilstanden som behandles og alvorligheten av tilstanden som behandles. Slik dosering kan bli enkelt funnet av fagfolk på området.

- 35 I én utførelsesform blir det bioaktive middelet ifølge foreliggende oppfinnelse administrert ved en daglig dosering på fra omtrent 1 mikrogram til omtrent 100 milligram per kilogram dyrekroppsvekt, gitt som en daglig dose eller i oppdelte doser, eller i vedvarende frigjøringsform. Doseringsregimet kan bli justert innenfor dette området eller til og med på utsiden av dette området for å tilveiebringe den optimale terapeutiske responsen.

I én utførelsesform blir det bioaktive middelet ifølge foreliggende oppfinnelse administrert ved en dosering på fra omtrent 1 µg til omtrent 10 µg per kg kroppsvekt, slik som fra omtrent 10 µg til omtrent 50 µg per kg kroppsvekt, for eksempel fra omtrent 50 µg til omtrent 100 µg per kilo kroppsvekt, slik som fra omtrent 100 til omtrent 250 µg per kg kroppsvekt, for eksempel fra omtrent 250 µg til omtrent 500 µg per kg kroppsvekt, slik som fra omtrent 500 µg til omtrent 750 µg per kilo kroppsvekt, for eksempel fra omtrent 750 µg til omtrent 1000 µg per kilo kroppsvekt, slik som fra omtrent 1 mg til omtrent 10 mg per kilo kroppsvekt, for eksempel fra omtrent 10 mg til omtrent 50 mg per kg kroppsvekt, slik som fra omtrent 50 mg til omtrent 100 mg per kg kroppsvekt.

Nevnte dosering kan bli administrert i visse tidsintervaller, og kan bli uttrykt som mg per kg kroppsvekt per tidsenhet. Nevnte tidsenhet kan i én utførelsesform være per minutt, slik som per time, for eksempel per dag, slik som per uke.

15

#### Kombinasjonsbehandling

Det er et aspekt av foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe et bioaktivt middel som er i stand til å øke den intracellulære konsentrasjonen og/eller aktiviteten av Hsp70 for anvendelse i behandling av lysosomale lagringsforstyrrelser, i kombinasjon med andre behandlingsmodaliteter.

20

Foreliggende oppfinnelse vedrører i ett aspekt en fremgangsmåte for behandling av en lysosomal lagringssykdom som omfatter administrering av det bioaktive middelet ifølge foreliggende oppfinnelse i kombinasjon med minst én annen behandlingsmodalitet.

I én utførelsesform blir slik det bioaktive middelet ifølge foreliggende oppfinnelse administrert til et individ med behov derav i kombinasjon med minst én annen behandlingsmodalitet, slik som konvensjonelle eller kjente behandlingsmodaliteter for LSD'er.

Det er forstått at det bioaktive middelet ifølge foreliggende oppfinnelse er en Hsp70-induserer eller ko-induserer.

30

Administrering av mer enn én behandlingsmodalitet i kombinasjon kan foregå enten samtidig, eller sekvensielt. Samtidig administrering kan være to forbindelser omfattet i det samme preparatet eller omfattet i separate preparater, eller kan være ett preparat og én annen behandlingsmodalitet utført essensielt samtidig.

Sekvensiell administrering betyr at den mer enn ene behandlingsmodaliteten blir administrert ved ulike tidspunkter, slik som administrering av én behandlingsmodalitet først, og administrering av den andre behandlingsmodaliteten deretter. Tidsrammen for administrering av mer enn én behandlingsmodalitet

35

sekvensielt kan bli bestemt av en fagmann på området for å oppnå den optimale effekten, og kan i én utførelsesform være mellom 30 minutter til 72 timer.

5 Behandlingsmodalitetene i formen av kjemiske forbindelser kan bli administrert sammen eller separat, hver ved sin mest effektive dosering. Administrering av mer enn én forbindelse kan ha synergistisk effekt, for slik effektivt å redusere den nødvendige doseringen av hvert legemiddel.

10 I én utførelsesform blir det bioaktive middelet ifølge foreliggende oppfinnelse administrert til et individ med behov derav i kombinasjon med enzymerstatningsterapi (ERT). Nevnte ERT kan i én utførelsesform bli valgt fra gruppen som består av Cerezyme (imiglucerase for injeksjon), Miglustat, Fabrazyme (agalsidase beta) og Replagal (Agalsidase alfa).

I én utførelsesform blir det bioaktive middelet ifølge foreliggende oppfinnelse administrert til et individ med Gaucher-sykdom i kombinasjon med Cerezyme (imiglucerase for injeksjon) eller Miglustat.

15 I en annen utførelsesform blir det bioaktive middelet ifølge foreliggende oppfinnelse administrert til et individ med Fabry-sykdom i kombinasjon med Fabrazyme (agalsidase beta) eller Replagal (Agalsidase alfa).

20 I en annen utførelsesform blir det bioaktive middelet ifølge foreliggende oppfinnelse administrert til et individ med behov derav i kombinasjon med smertestillende midler.

I nok en annen utførelsesform blir det bioaktive middelet ifølge foreliggende oppfinnelse administrert til et individ med behov derav i kombinasjon med kortikosteroider.

25 Det bioaktive middelet ifølge foreliggende oppfinnelse kan i én utførelsesform bli administrert til et individ med behov derav i kombinasjon med en transplantasjon, slik som benmargtransplantasjon, navlestrengblodtransplantasjon eller stamcelletransplantasjon.

30 Det bioaktive middelet ifølge foreliggende oppfinnelse kan i en annen utførelsesform bli administrert til et individ med behov derav i kombinasjon med substratreduksjonsterapi.

I en annen utførelsesform blir det bioaktive middelet ifølge foreliggende oppfinnelse administrert til et individ med behov derav i kombinasjon med symptomatisk og støttende terapi, slik som fysioterapi.



### *Hsp70 øker opptaket av forbindelser*

Foreliggende oppfinnere har ytterligere vist at Hsp70 øker det endocytiske opptaket av andre molekyler (figur 16). Dette økte opptaket kan foregå uavhengig av Hsp70 på grunn av en passiv mekanisme som tillater en forbindelse å bli raskere tatt opp av cellen i nærvær av Hsp70, eller den kan foregå avhengig av Hsp70 på grunn av en direkte assosiasjon med Hsp70.

Hsp70 sin evne til å øke det cellulære opptaket av forbindelser er et fortrinn ved at det tillater Hsp70, eller et funksjonelt fragment eller variant derav, å bli administrert til celler for raskt opptak i celler.

Hsp70 sin evne til å øke det cellulære opptaket av forbindelser er videre et fortrinn i kombinasjonsbehandlingsregimer fordi tilstedeværelsen av Hsp70 kan øke opptaket av både Hsp70 og forbindelsen gitt i kombinasjon med Hsp70.

Med hensyn på kombinasjonsterapi der én forbindelse er et enzym for ERT og det andre er Hsp70, eller et funksjonelt fragment eller variant derav, så kan dette hjelpe til å effektivt redusere mengden av enzym for ERT som er nødvendig for å oppnå en effektiv intracellulær dose. Dette er relevant fordi ERT er svært dyrt.

I situasjonen der det bioaktive middelet ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter en kombinasjon av Hsp70, eller et funksjonelt fragment eller variant derav, og en Hsp70-induserer eller-koinduserer, så kan tilstedeværelsen av Hsp70 derfor øke opptaket av nevnte Hsp70-induserer eller –koinduserer.

### Fremgangsmåte for modulering av enzymatiske aktiviteten til et enzym

Foreliggende oppfinnelse vedrører i ett aspekt moduleringen av enzymatisk aktivitet. Nevnte enzym kan være et enzym som er involvert i katabolismen av lysosomale stoffer. Og nevnte modulering kan være avledet fra en interaksjon mellom Hsp70 og BMP.

Foreliggende oppfinnere har slik beskrevet en interaksjon mellom Hsp70 og BMP, der Hsp70 interagerer med eller binder til BMP med en viss affinitet. At et molekyl har en "affinitet" for molekyl X betyr her at et molekyl med affinitet for molekyl X vil binde til molekyl X i en viss påvisbar mengde ved visse betingelser men vil ikke (eventuelt påvisbart) binde andre, ulike molekyler (for hvilke det ikke har affinitet) i samme omfang under identiske betingelser. Ett mål for å beskrive et molekyls affinitet for et annet molekyl er en dissosiasjonskonstant  $K_d$ . Jo mindre  $K_d$  er jo sterkere er affiniteten. Dissosiasjonskonstanter kan bli bestemt ved å benytte fremgangsmåter som er velkjente på fagområdet, slik som overflate-plasmon-resonansanalyse. Her er det foretrukket at et molekyl med "affinitet" for et annet molekyl X har en  $K_d$  for nevnte molekyl X som er mindre enn 100 mM, for eksempel mindre enn 5 mM, slik som mindre enn 1 mM, for eksempel mindre enn

0,1 mM, slik som mindre enn 0,01 mM, for eksempel mindre enn 1  $\mu$ M, slik som mindre enn 100 nM, for eksempel mindre enn 10 nM, slik som mindre enn 1 nM, for eksempel mindre enn 100 pM, slik som mindre enn 10 pM, for eksempel mindre enn 1 pM. Videre er det her foretrukket at et molekyl som "ikke har en affinitet" for molekyl X har en dissosiasjonskonstant  $K_d$  med hensyn på binding av molekyl X som er minst 10 ganger høyere, slik som minst 20 ganger høyere, for eksempel minst 30 ganger høyere, slik som minst 40 ganger høyere, for eksempel minst 50 ganger høyere, slik som minst 60 ganger høyere, for eksempel minst 70 ganger høyere, slik som minst 80 ganger høyere, for eksempel minst 90 ganger høyere, slik som minst 100 ganger høyere enn  $K_d$ -verdien for bindingen (til molekyl X) av et molekyl som har affinitet for molekyl X. Mest foretrukket er det minst en ti gangers forskjell i  $K_d$ -verdi mellom de molekylene som er ansett å ha en affinitet og de som er ansett for ikke å ha en affinitet for et molekyl X.

Også tilkjennegit er en fremgangsmåte for modulering av den enzymatiske aktiviteten til et enzym, der nevnte enzym interagerer med BMP (bis(monoacylglysero)fodfat), der nevnte fremgangsmåte omfatter trinnene

- i) Administrere det bioaktive middelet ifølge foreliggende oppfinnelse,
- ii) Tillate interaksjon mellom BMP og Hsp70, og
- iii) Modulere den enzymatiske aktiviteten til et enzym som interagerer med BMP.

Nevnte Hsp70 kan danne et kovalent eller ikke-kovalent kompleks med BMP.

BMP kan interagere med et saposin. I en ytterligere utførelsesform kan nevnte saposin være valgt fra gruppen som består av saposin-A, saposin-B, saposin-C og saposin-D.

Nevnte enzym kan være valgt fra gruppen som består av sfingomyelinase, sur sfingomyelinase (aSMase), sur ceramidase, beta-galaktosylceramidase, alfa-galaktosidase, beta-galaktosidase, glukosylceramidase, sialidase og arylsulfatase.

Moduleringen av den enzymatiske aktiviteten kan være en økning i den enzymatiske aktiviteten.

Nevnte økning i den enzymatiske aktiviteten kan være en økning i området på 1 til 5 %, slik som i området 5 til 10 %, for eksempel i området 10 til 15 %, slik som i området 15 til 20 %, for eksempel i området 20 til 25 %, slik som i området 25 til 30 %, for eksempel i området 30 til 35 %, slik som i området 35 til 40 %, for eksempel i området 40 til 45 %, slik som i området 45 til 50 %, for eksempel i området 50 til 60 %, slik som i området 60 til 70 %, for eksempel i området 70 til 80 %, slik som i området 80 til 90 %, for eksempel i området 90 til 100 %, slik som i området 100 til 120 %, for eksempel i området 120 til 140 %, slik som i området 140 til 160 %, for eksempel i området 160 til 180 %, slik som i området 180 til 200

%, for eksempel i området 200 til 250 %, slik som i området 250 til 300 %, for eksempel i området 300 til 400 %, slik som i området 400 til 500 %, for eksempel i området 500 til 750 %, slik som i området 750 til 1000 %, for eksempel i området 1000 til 1500 %, slik som i området 1500 til 2000 %, for eksempel i området 2000 til 5000 %.

Også tilkjennegett er en fremgangsmåte for identifisering av bindingspartnere for Hsp70-BMP-komplekset, der nevnte fremgangsmåte omfatter trinnene med å ekstrahere nevnte Hsp70-BMP-kompleks og isolere nevnte bindingspartnere. Nevnte bindingspartner kan være en agonist. Nevnte bindingspartner kan være en antagonist.

Også tilkjennegett er et Hsp70-BMP-kompleks, og dets anvendelse som et medikament, slik som for eksempel til behandlingen av en lysosomal lagringsforstyrrelse.

Også tilkjennegett er et antistoff som spesifikt gjenkjenner Hsp70-BMP-komplekset.

#### Fremgangsmåte for behandling

Foreliggende oppfinnelse vedrører i ett aspekt en fremgangsmåte for behandling av et individ med behov derav.

Det er slik et aspekt av foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe en fremgangsmåte for behandling av en lysosomal lagringsforstyrrelse som omfatter administrering av det bioaktive middelet ifølge foreliggende oppfinnelse til et individ med behov derav.

Det følger at i én utførelsesform så kan nevnte behandling være profylaktisk, kurerende eller lindrende. I én spesifikk utførelsesform er nevnte behandling profylaktisk. I en annen utførelsesform er nevnte behandling kurerende. I en ytterligere utførelsesform er nevnte behandling lindrende.

Det bioaktive middelet benyttet ifølge foreliggende oppfinnelse kan i én utførelsesform være formulert som et farmasøytisk preparat.

I én utførelsesform er nevnte lysosomale lagringsforstyrrelse valgt fra gruppen som består av Niemann-Pick-sykdom, Farber-sykdom, Krabbe-sykdom, Fabry-sykdom, Gaucher-sykdom, metakromatisk leukodystrofi, sialidose og saposinmangel.

I en spesifikk utførelsesform er nevnte lysosomale lagringsforstyrrelse Niemann-Pick sykdom type A eller B. I en annen spesifikk utførelsesform er nevnte lysosomale lagringsforstyrrelse Farber-sykdom. I en annen spesifikk utførelsesform er nevnte lysosomale lagringsforstyrrelse Krabbe-sykdom. I en annen spesifikk utførelsesform er nevnte lysosomale lagringsforstyrrelse metakromatisk leukodystrofi. I en annen spesifikk utførelsesform er nevnte lysosomale lagringsforstyrrelse sialidose. I en annen spesifikk utførelsesform er nevnte

lysosomale lagringsforstyrrelse Fabry-sykdom. I nok en annen spesifikk utførelsesform er nevnte lysosomale lagringsforstyrrelse Gaucher-sykdom. I nok en annen spesifikk utførelsesform er nevnte lysosomale lagringsforstyrrelse saposinmangel.

5 I én utførelsesform er nevnte lysosomale lagringsforstyrrelse kjennetegnet ved en økt intracellulær akkumulering av sfingolipid.

I én utførelsesform kan nevnte behandling redusere den intracellulære akkumuleringen av stoffer hos et individ med behov derav. Nevnte stoff kan være et stoff som normalt nedbrytes i lysosomene. I én utførelsesform kan nevnte stoff kan  
10 være et sfingolipid.

I én utførelsesform reduserer behandlingen ifølge foreliggende oppfinnelse den intracellulære akkumuleringen av et lysosomalt nedbrytbart stoff slik som et sfingolipid til mindre enn 100 % av den akkumulerte mengden, slik som mindre enn 90 % av den akkumulerte mengden, for eksempel mindre enn 80 % av den  
15 akkumulerte mengden, slik som mindre enn 70 % av den akkumulerte mengden, for eksempel mindre enn 60 % av den akkumulerte mengden, slik som mindre enn 50 % av den akkumulerte mengden, for eksempel mindre enn 40 % av den akkumulerte mengden, slik som mindre enn 30 % av den akkumulerte mengden, for eksempel mindre enn 20 % av den akkumulerte mengden, slik som mindre enn 10 % av den  
20 akkumulerte mengden, for eksempel mindre enn 5 % av den akkumulerte mengden.

I én utførelsesform reduserer behandlingen ifølge foreliggende oppfinnelse den intracellulære akkumuleringen av et sfingolipid med minst 5 %, slik som minst 10 %, for eksempel minst 15 %, slik som minst 20 %, for eksempel minst 25 %, slik som minst 30 %, for eksempel minst 35 %, slik som minst 40 %, for eksempel minst  
25 45 %, slik som minst 50 %, for eksempel minst 55 %, slik som minst 60 %, for eksempel minst 65 %, slik som minst 70 %, for eksempel minst 75 %, slik som minst 80 %, for eksempel minst 85, slik som minst 90 %, for eksempel minst 95 %, slik som minst 100 %.

I én utførelsesform er nevnte akkumulerte sfingolipid valgt fra gruppen som består  
30 av sfingomyelin, ceramid, galaktosylceramid, globotriaosylceramid, glykosylceramid, GM3 og sulfatid.

Reduksjonsraten av den intracellulære konsentrasjonen av et lysosomalt nedbrytbart stoff slik som et sfingolipid kan være avhengig av faktorer slik som administreringsform, doseringsregimer og liknende.

35 I én utførelsesform forlenger nevnte behandling forventet levetid for nevnte individ med behov derav.

Det følger at forventet levetid i én utførelsesform kan bli økt med mellom 6 måneder til 1 år, slik som fra 1 år til 2 år, for eksempel fra 2 til 3 år, slik som fra 3 til 4 år, for eksempel fra 4 til 5 år, slik som fra 5 til 6 år, for eksempel fra 6 til 7 år,

slik som fra 7 til 8 år, for eksempel fra 8 til 9 år, slik som fra 9 til 10 år, for eksempel fra 10 til 12 år, slik som fra 12 til 14 år, for eksempel fra 14 til 16 år, slik som fra 16 til 18 år, for eksempel fra 18 til 20 år, slik som fra 20 til 25 år, for eksempel fra 25 til 30 år, slik som fra 30 til 40 år, for eksempel fra 40 til 50 år, slik som fra 50 til 60 år, for eksempel fra 60 til 70 år, slik som fra 70 til 80 år, for eksempel fra 80 til 90 år, slik som fra 90 til 100 år.

I én utførelsesform blir forventet livslengde økt med minst 6 måneder, slik som minst 1 år, slik som minst 2 år, for eksempel 3 år, slik som minst 4 år, for eksempel 5 år, slik som minst 6 år, for eksempel 7 år, slik som minst 8 år, for eksempel 9 år, slik som minst 10 år, for eksempel 12 år, slik som minst 14 år, for eksempel 16 år, slik som minst 18 år, for eksempel 20 år, slik som minst 25 år, for eksempel 30 år, slik som minst 40 år, for eksempel 50 år, slik som minst 60 år, for eksempel 70 år, slik som minst 80 år, for eksempel 90 år, slik som minst 100 år.

Det er også et aspekt av foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe en fremgangsmåte for å forlenge forventet levetid for en pasient med en lysosomal lagringsforstyrrelse, der nevnte fremgangsmåte omfatter administrering av det bioaktive middelet ifølge foreliggende oppfinnelse til et individ med behov derav.

I én utførelsesform vedrører foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte er tilkjennegjort for å forlenge forventet levetid for en pasient med en lysosomal lagringsforstyrrelse, der nevnte fremgangsmåte omfatter administrering av det bioaktive middelet ifølge foreliggende oppfinnelse til et individ med behov derav, der nevnte forventede livslengde blir økt med mellom 6 måneder til 1 år, slik som fra 1 år til 2 år, for eksempel fra 2 til 3 år, slik som fra 3 til 4 år, for eksempel fra 4 til 5 år, slik som fra 5 til 6 år, for eksempel fra 6 til 7 år, slik som fra 7 til 8 år, for eksempel fra 8 til 9 år, slik som fra 9 til 10 år, for eksempel fra 10 til 12 år, slik som fra 12 til 14 år, for eksempel fra 14 til 16 år, slik som fra 16 til 18 år, for eksempel fra 18 til 20 år, slik som fra 20 til 25 år, for eksempel fra 25 til 30 år, slik som fra 30 til 40 år, for eksempel fra 40 til 50 år, slik som fra 50 til 60 år, for eksempel fra 60 til 70 år, slik som fra 70 til 80 år, for eksempel fra 80 til 90 år, slik som fra 90 til 100 år.

I én utførelsesform vedrører foreliggende oppfinnelse en fremgangsmåte er tilkjennegjort for å forlenge forventet levetid for en pasient med en lysosomal lagringsforstyrrelse, der nevnte fremgangsmåte omfatter administrering av det bioaktive middelet ifølge foreliggende oppfinnelse til et individ med behov derav, der nevnte forventede livslengde blir økt med minst 6 måneder, slik som minst 1 år, slik som minst 2 år, for eksempel 3 år, slik som minst 4 år, for eksempel 5 år, slik som minst 6 år, for eksempel 7 år, slik som minst 8 år, for eksempel 9 år, slik som minst 10 år, for eksempel 12 år, slik som minst 14 år, for eksempel 16 år, slik som minst 18 år, for eksempel 20 år, slik som minst 25 år, for eksempel 30 år, slik som

minst 40 år, for eksempel 50 år, slik som minst 60 år, for eksempel 70 år, slik som minst 80 år, for eksempel 90 år, slik som minst 100 år.

## Eksempler

### 5 ***Eksempel 1: Interaksjon mellom Hsp70 og bis(monoacylglysero)fosfat stabiliserer lysosomer og fremmer celleoverlevelse***

#### Sammendrag

Permeabilisering av lysosommembran er et evolusjonært konserverte kjennemerke på stressindusert celledød. Her viser oppfinnerne at det viktige stressinduserbare  
 10 varmesjokkproteinet 70 (Hsp70) forbedrer celleoverlevelse ved å stabilisere lysosomer via en pH-avhengig høyaffinitetsbinding til et endolysosomal anionisk fosfolipid bis(monoacylglysero)fosfat (BMP, også referert til som lysobisfosfatidinsyre). Det positivt ladde ATPase-domenet på Hsp70 er ansvarlig for bindingen men det substratbindende domenet er også nødvendig for effektiv  
 15 stabilisering av lysosomer. Viktig er det at den cytobeskyttende effekten kan bli oppnådd ved endocytisk levering av rekombinant Hsp70 og spesifikt reversert ved ekstracellulær administrering av BMP-antistoffer eller Hsp70-inhibitorer. Denne interaksjonen mellom lipid og protein åpner slik spennende muligheter for utviklingen av cytobeskyttende og cytotoxiske lysosomspesifikke terapier for  
 20 behandlingen av henholdsvis degenerative sykdommer og kreft.

#### Introduksjon

Lysosomer er svært dynamiske organeller i cytosol som mottar membrantrafikkinput fra de biosyntetiske (trans-Golgi nettverk), endocytiske,  
 25 fagocytiske og autofage veiene. De inneholder over 50 sure hydrolaser som kan prosessere alle de viktigste makromolekylene i cellen til nedbrytningsprodukter som er tilgjengelige for metabolsk gjenbruk. I tillegg til deres katabolske husholdningsfunksjoner har lysosomale proteaser, katepsiner, nylig blitt identifisert som viktige effektorer i evolusjonært konserverte celledødsprogrammer som for eksempel induseres ved dødsreseptorer i tumornekrosefaktor-reseptorfamilien,  
 30 hypoksi, oksidativt stress, osmotisk stress, varme og antikreftlegemidler. Katepsinavhengig celledød er kjennetegnet ved en permeabilisering av tidlig lysosomalmembran og den påfølgende translokeringen av katepsiner inn i cytosol, der de kan sette i gang både kaspaseavhengige og -uavhengige celledødsveier. Slik fremstår lysosomalmembranintegritet som en viktig regulator av celleoverlevelse  
 35 ved ulike stressbetingelser. Mens cysteinproteaseinhibitorer i cytosol har blitt rapportert å overføre beskyttelse mot katepsinindusert cellulær skade både i pattedyrceller i tillegg til i nematoden *Caenorhabditis elegans*, så har mekanismene ved hvilke celler regulerer lysosomalmembranstabilitet i stor grad forblitt uklare. Likevel tyder nyere indirekte beviser på at den sterke cytobeskyttende effekten til

den viktige stressinduserbare Hsp70 skyldes lysosomal membranstabilisering. Fjerningen av Hsp70 utløser en tidlig permeabilisering av lysosomale membraner og katepsinmediert celledød i kreftceller, og eksogent Hsp70 inhiberer effektivt lysosomal destabilisering induisert ved ulike typer stress. Videre lider mus som mangler Hsp70 av pankreatitt forårsaket av lekkasjen av lysosomale proteaser inn i cytosol.

Den molekylære mekanismen som ligger under det lysosombeskyttende potensialet til Hsp70 har forblitt uklart, men ledetråder til dens virkningsmekanisme kan ligge i den stress- og kreftassosierte translokeringen av en liten andel av Hsp70 til den endo-lysosomale avdelingen. Hovedmålet med denne undersøkelsen var å definere hvorvidt den lysosomale lokaliseringen faktisk er avgjørende for den cytobeskyttende effekten av Hsp70. Oppsiktsvekkende nok viser dataene som blir presentert her at Hsp70 binder med høy affinitet til et lysosoms spesifikt lipid BMP og at denne protein-lipid-interaksjonen stabiliserer lysosomer. Viktig er at denne nye cytobeskyttende mekanismen kan bli utnyttet ved ekstracellulær administrering av enten cytobeskyttende Hsp70 selv eller forbindelser som påvirker Hsp70-BMP bindingen eller Hsp70-funksjon spesifikt i den lysosomale avdelingen.

### Resultater og diskusjon

For å kunne teste hvorvidt den lysosomale lokaliseringen er avgjørende for den cytobeskyttende effekten av Hsp70 produserte foreliggende oppfinnere rekombinant Hsp70 (rHsp70) og benyttet det endocytiske maskineriet i celler for å styre rHsp70 inn i den lysosomale lumen. Immuncytokjemisk analyse av U-2-OS-osteosarkomceller inkubert med Alexa Fluor 488-merket rHsp70 avslørte en klar kolokalisering av det endocytoserte rHsp70 med sene endosomale og lysosomale markørproteiner (lysosomasosiert membranprotein-1 og -2 og lysosomalintegrale membranprotein-1 (LIMP-1)) og et endo-lysosoms spesifikt lipid (BMP), mens ingen kolokalisering ble sett med markører for det endoplasmatiske retikulum (endoplasmatisk retikulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA)), golgiapparat (golgin-97) eller mitokondrier (cytokrom-c (cyt c)). Den lysosomale lokaliseringen ble også observert i levende celler, der det endocytoserte rHsp70 var kolokalisert med LysoTracker Red men ikke med Mitotracker Red. For å bestemme mengden av endocytosert Hsp70 ble fluorescenssignalet fra de rHsp70\*-ladde cellene kvantifisert, noe som avslørte at et gjennomsnitt på 70 ng rHsp70\* ble tatt opp per  $1 \cdot 10^5$  celler. For å bestemme hvorvidt endocytosert rHsp70\* kun var lokalisert til lumen eller hvorvidt den ville ha en direkte kobling til de endo-lysosomale membranene ble de rHsp70\*-ladde U-2-OS-cellene subfraksjonert og mengden rHsp70\* til stede i den lette membranfraksjonen (LMF) ble målt (cellulære organeller inkludert tidlige og sene endosomer og lysosomer). Frysefrakturering av organellene i LMF via repeterte fryse/tine-sykluser i flytende nitrogen førte til den totale frigjøringen av katepsin-B inn i supernatanten mens det lysosomale membranproteinet LAMP-2 ble tilbakeholdt i den pelleterte, frakturerte

membranfraksjonen. Kvantifisering av det endocytoserte rHsp70\* avslørte at omtrent 1/3 av det totale rHsp70\* forble i pelleten, noe som sterkt tyder på at det var bundet til de endo-lysosomale membranene. For å undersøke hvorvidt det endocytoserte rHsp70 kunne stabilisere de lysosomale membranene ble celler mettet med akridinorange, som er en metakromatisk svak base som akkumuleres i den sure avdelingen av cellene, dvs. sene endosomer og lysosomer, og sensitiviserer dem overfor foto-oksidasjon ved eksponering overfor blått lys (Brunk et al., 1997, Nylandsted et al., 2004). Foto-oksidasjonen fører til tapet av den lysosomale pH-gradienten og lekkasje av akridinorange til cytosol. Dette kan enkelt bli visualisert og kvantifisert fordi akridinorange oppviser rød fluorescens når det konsentreres i den sure avdelingen av cellen og grønn fluorescens når det foreligger ved en lavere konsentrasjon i cytosol. Bemerkelsesverdig nok beskyttet det endocytoserte rHsp70 lysosomene mot blålysindusert foto-oksidasjon, mens ingen beskyttelse ble observert i celler mettet med rekombinant Hsc70 og Hsp70-2, som henholdsvis deler 86 % og 84 % aminosyresekvenshomologi med Hsp70. Videre sensitiviserte et kort interfererende RNA (siRNA) spesifikt for Hsp70 lysosomer i U-2-OS-celler overfor foto-oksidasjon, og denne effekten ble helt reversert ved endocytosert rHsp70 noe som treffende viser at den beskyttende effekten av endogent Hsp70 blir mediert ved den lille fraksjonen av proteinet som er lokalisert til den lysosomale lumen heller enn den store mengden som finnes i cytosol. Ovenfor er det vist effektivt endocytisk opptak av Hsp70 og lysosomal stabilisering kan forklare de nylig rapporterte overraskende nervebeskyttende effektene av ekstracellulært Hsp70 administrert til stedene for skade etter en mengde behandlinger som er kjent for å utløse den lysosomale celledødsveien, dvs. retinalysskade og isjanserve-axotomi.

For å teste hvorvidt den beskyttende effekten av Hsp70 kunne være en konsekvens av en direkte assosiasjon av Hsp70 med de lysosomale membranene undersøkte oppfinnerne dens interaksjon med palmitoyl-oleoyl-forfatidylkolin (POPC) store unilamellære vesikler (LUV'er) inneholdende en mengde membranassosierte anioniske lipider, dvs. palmitoyl-oleoyl-forfatidylserin (POPS, primært i indre del av plasmamembranen), kardiolipin (primært mitokondrier) og BMP (primært i sene endosomer og lysosomer). Ved å ta hensyn til det økende sure miljøet i den endo-lysosomale avdelingen ved modning til lysosomer ble protein-lipid interaksjonene ved nøytrale (pH 7,4) og sure (pH 6,0) betingelser sammenlignet. Ved pH 7,4 forårsaket rHsp70 en liten relativ endring i 90 ° lysspredning i POPC-liposomer, noe som tyder på en svært svak binding til POPC-bilaget. Som rapportert tideligere for POPS forsterket alle negativt ladde lipider bindingen av rHsp70 til liposomene ved nøytral pH. Denne forsterkningen var på omtrent 4 ganger uavhengig av tettheten av det negative lipidet eller ladningen på liposomoverflaten (POPS har en netto ladning på -1, og kardiolipin og BMP har en netto ladning på -2). Oppsiktsvekkende endret senkning av pH fra 7,4 til 6,0 dramatisk lipidassosiasjonsprofilen til rHsp70. Mens bindingen til POPS økte kun litt ved forsurening var bindingen til BMP nesten 20



ganger sterkere i den sure pH sammenlignet med den nøytrale pH. Den pH-avhengige høyaffinitetsbindingen av Hsp70 til BMP ble bekreftet i et uavhengig sett med BIAcore-eksperimenter.

5 For å teste hvorvidt den pH-avhengige høyaffinitetsinteraksjonen mellom Hsp70 og BMP som ble observert in vitro var nødvendig for den Hsp70-medierte stabiliseringen av lysosomer i levende celler målsøkte oppfinnerne det cellulære BMP ved å mette den endo-lysosomale avdelingen i U-2-OS-celler med BMP-antistoffer som vist tidligere (Kobayashi et al., 1988). Bemerkelsesverdig nok  
10 inhiberte BMP-antistoffene effektivt rHsp70 sin evne til å overføre beskyttelse mot foto-oksidasjonsindusert lysosomal lekkasje. Viktigere er det at BMP-antistoffer signifikant sensitiviserte U-2-OS-osteorarkomceller overfor cisplatin, som induserer en tidlig lysosomal membranpermeabilisering i U-2-OS-celler i tillegg til andre cisplatin-sensitive cellelinjer benyttet i denne undersøkelsen. Dermed ble også PC-3- og DU-145-prostatakarsinomceller signifikant sensitivisert overfor cisplatinindusert  
15 celledød ved behandling med anti-BMP-antistoffer.

Etter å ha bekreftet at den lysosomale Hsp70-BMP interaksjonen er essensiell for den cytobeskyttende effekten til Hsp70 undersøkte oppfinnerne deretter hvilken del av Hsp70-proteinet som er ansvarlig for lipidbinding. For å bestemme dette ble  
20 fluorescensforskyvningen for tryptofanene (W90 og W580) ved dokking av rHsp70 på BMP-inneholdende liposomer ved pH 6,0 målt. Oppfinnerne produserte rHsp70-mutantproteiner med delesjoner av de to funksjonelle hoveddomenene på proteinet, dvs. det aminoterminal ATPase-domenet (rHsp70- $\Delta$ ATP, delesjon av aminosyrene 119-426) og det karboksyterminale peptidbindende domenet (rHsp70- $\Delta$ PBD, delesjon av aminosyrene 437-617). Tapet av signal i relativ  
25 toppfluorescensintensitet for Hsp70- $\Delta$ ATP indikerte at ATPase-domenet er nødvendig for høyaffinitetsbindingen av Hsp70 til POPC/BMP-bilaget. Deretter ble de to tryptofanene i Hsp70 substituert med fenylalaniner (W90F og W580F) for å undersøke hvilken tryptofan som er ansvarlig for lipidbindingen og fluorescensforskyvningen. Reduksjonen i signalet med rHsp70-W90F som mangler  
30 tryptofan i ATPase-domenet (rHsp70-W90F) og det uendrede signalet med rHsp70-W580F som mangler tryptofan i det peptidbindende domenet indikerte at tryptofanet på posisjon 90 dokket inn i lipidlaget. Fordi fremgangsmåten benyttet ovenfor kun målte den relative forskyvningen i fluorescens når tryptofan innesluttet i det lipofile miljøet så analyserte oppfinnerne også lipidassosieringen av rHsp70 og dens  
35 mutanter på en mer kvantitativ måte ved å benytte et BIAcore 2000-system med immobiliserte BMP-inneholdende LUV'er på overflaten av en L1-sensorbrikke ved pH 4,5. Både rHsp70 og rHsp70- $\Delta$ PBD viste en sterk interaksjon med BMP, mens bindingen av rHsp70- $\Delta$ ATP var markert redusert og bekrefter dermed at Hsp70 interagerer med BMP i hovedsak via sitt ATPase-domene. Overraskende viste  
40 tryptofanmutantene en slående forskjell i deres evne til å interagere med BMP. Mens rHsp70-W580F-mutanten essensielt hadde den samme interaksjonsprofilen

som rHsp70 var bindingen av rHsp70-W90F-mutanten dramatisk minsket. Fordi rHsp70-W90F var riktig foldet som analysert ved fjern og nær UV-sirkulær dikroisme og i stand til å folde luciferase og hydrolysere ATP så opphevet spesifikt W90F-mutasjonen interaksjonen mellom Hsp70 og BMP mens den opprettholdt de strukturelle og funksjonelle aspektene til Hsp70-chaperonet. rHsp70-W90F-mutanten ga oss uventet slik et uvurderlig redskap for ytterligere å teste hvorvidt den direkte interaksjonen mellom Hsp70 og BMP gir Hsp70 sine lysosombeskyttende attributter. Faktisk hadde rHsp70-W90F-mutanten fullstendig mistet sin evne til å beskytte de lysosomale membranene mot foto-oksidasjon og celler mot cisplatinindusert lysosomal celledød, mens rHsp70-W580F-mutanten viste den samme effektiviteten som villtypeproteinet. Også rHsp70- $\Delta$ PBD-mutanten som viste en uendret kapasitet for binding til BMP-rike membraner hadde mistet sin evne til å beskytte mot foto-oksidasjon og cisplatin. Disse funnene viser at bindingen av Hsp70 til BMP er nødvendig men ikke tilstrekkelig for å gi de lysosomale membranene beskyttelse. I tillegg er et intakt karboksyterminalt peptidbindende domene nødvendig for stabiliseringen av lysosomalmembraner i levende celler.

Hsp70-inhibitorer har lenge blitt ansett som interessante antitumorlegemidler. Likevel har fokus vært konsentrert på inhiberingen av Hsp70 som foreligger i cytosol, og problemer som gjelder legemiddellevering og mangel på spesifisitet blant Hsp70-familiemedlemmene har medført uoverstigelige barrierer for utviklingen av passende Hsp70-antagonister. Etter å ha etablert at både bindingen til BMP og et intakt peptidbindende domene er nødvendig for den cytobeskyttende effekten til Hsp70, og etter å ha bekreftet potensialet i å målsøke Hsp70-BMP-interaksjonen, såp testet oppfinnerne deretter hvorvidt den beskyttende effekten til den endo-lysosomale Hsp70 også kunne bli motvirket med inhibitorer av Hsp70-chaperonaktivitet. Dette ble oppnådd ved å inkubere cellene med et apoptosinduserende faktoravledet peptid (ADD70), som inhiberer chaperonfunksjonen til Hsp70 ved å binde til dens peptidbindingsdomene. Det bør bemerkes at dette store peptidet (388 aminosyrer) ikke krysser plasmamembranen, og dermed ga det oss et annet redskap for spesifikt å målsøke det endo-lysosomale Hsp70. Verd å bemerke er at inkubering av celler med ADD70-peptid fullstendig blokkerte den lysosombeskyttende effekten til endocytosert rHsp70 i U-2-OS-celler. Or å teste hvorvidt ADD70 også kunne motvirke den cytobeskyttende effekten av cellers eget Hsp70 undersøkte oppfinnerne dens effekt på cisplatinindusert cytotoxicitet i Hsp70-transgene udødeliggjorte murine embryonale fibroblaster (iMEF'er), der det transgene Hsp70 overfører nesten fullstendig resistens mot cisplatinindusert celledød. Oppsiktsvekkende opphevet ADD70-behandling av Hsp70-transgene iMEF'er effektivt den Hsp70-medierte beskyttende effekten og så sensitive overfor cisplatin som villtype-iMEF'er. Villtype-iMEF'ene uttrykker svært lave nivåer av Hsp70, og slik underbygger den manglende evnen for ADD70 til

ytterligere å sensitivisere dem overfor cisplatin ideen om at ADD70-mediert sensitivisering faktisk skyldes inhiberingen av Hsp70. Beslektet med anti-BMP-behandling sensitiviserer også ADD70-behandling PC-3- og DU145-prostatakarsinomceller overfor cisplatinindusert cytotoxisitet.

- 5 Dataene som er vist her viser at Hsp70 interagerer direkte med det endo-lysosomale anioniske fosfolipidet BMP og at denne interaksjonen stabiliserer endo-lysosomale membraner. Fordi konsentrasjonen av BMP øker i endocytiske vesikler ettersom endosomene modnes for å danne multivesikulære legemer, sene endosomer og lysosomer så kan pH-regulering være måten som Hsp70 styres på til BMP og
- 10 lysosomer. Hsp70-underdomener har svært forskjellige pI-verdier, der ATPase-domenet har 1,72 enheter høyere pI enn det peptidbindende domenet. Dette karakteristikumet tyder på at ved sur pH så er ATPase-domenet fortrinnsvis positivt ladd, noe som kan fremme dets interaksjon med anioniske lipider. Ettersom pH
- 15 senkes i løpet av den endocytiske modningen vil den positive ladningen bygges opp og enhver anionisk interaksjon vil bli ytterligere forsterket. Dataene presentert her som viser avhengigheten av Hsp70-BMP-interaksjonen på sur pH og ATPase-domenet støtter denne teorien. Molekylær modellering av den elektrostatiske overflaten av ATPase-domenet på Hsp70 avslørte videre at den danner en nesten
- 20 kileformet struktur med en i hovedsak positiv ladning på bunnen av kilen til og med ved pH 7,0. Interessant nok ligger W90 innenfor dette positivt ladde domenet. Noe som kan gi ledetråder til hvorfor Hsp70-W90F-mutasjonen har slik en inngående innvirkning på Hsp70 sin evne til å interagere med BMP og stabilisere lysosomer. BMP er utelukkende lokalisert i de indre membranene i den endo-lysosomale
- 25 avdelingen, der den støtter oppløsning og lipidekstrahering fra lipidvesikler ved sur sfingomyelinase og sfingolipidaktivatorproteiner og gir opphav til metabolitter slik som ceramid og sfingosin-1-fosfat, som har blitt implisert i destabilisering av membraner og celledød. Det bør bli påpekt at lysosomale indre membraner kan bli nådd ved invaginering av perimentermembranene på nivået for tidlige og sene
- 30 endosomer, og derfor inneholder de respektive vesiklene sannsynligvis også Hsp70. Dermed kan Hsp70 interferere med BMP sin rolle som en kofaktor for sfingolipidhydrolyse og dermed endre lipidsammensetningen i lysosomene. For å teste denne hypotesen holder oppfinnerne per i dag på å utvikle massespektroskopibasert teknologi for kvantifisering av lysosomale sfingolipidmetabolitter.
- 35 Akkumulerende data tyder på at økt uttrykking og endret trafikkering av lysosomale proteaser kan utgjøre en "Akkilleshæl" for tumorceller ved å sensitivisere dem overfor lysosomal membranpermeabilisering. Derfor tilveiebringer BMP-Hsp70-interaksjonen på de endo-lysosomale membranene og den resulterende stabiliseringen av den endo-lysosomale avdelingen kreftcellene med beskyttelse mot
- 40 den ellers direkte ruten mot celledød. Den molekylære mekanismen som ligger under denne cytobeskyttende effekten åpner nå nye og spennende muligheter for

sensitivering av kreftceller overfor midler som induserer lysosomale celledødsveier via spesifikk inhibering av den lysosomstabiliserende funksjonen til Hsp70. Vice versa kan interaksjonen mellom Hsp70 og BMP tilveiebringe nye behandlingsstrategier som støtter seg på cytobeskyttelsen gitt ved den

5 lysosomstabiliserende funksjonen til eksogent administrert Hsp70 for krenkelser så forskjellige som pankreatitt, motor- og sensoriske nervelesjoner og lysindusert retinaskade.

### Materialer og fremgangsmåter

#### 10 *Celledyrkning og reagenser*

Humane U-2-OS-osteosarkomcellelinjer ble dyrket i RPMI 1640 (Invitrogen) tilsatt 6 % varmeinaktivert kalveserum og penicillin-streptomycin. Hsp70-transgene og passende kontroll-iMEF'er ble generert og opprettholdt som tidligere beskrevet (Nylandsted et al., 2004). Alle celler ble dyrket ved 37 °C i en fuktet luftatmosfære

15 med 5 % CO<sub>2</sub> og gjentatt testet og funnet negativ for mykoplasma.

Dersom ikke annet er gitt ble alle kjemikalier kjøpt fra Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Danmark AS).

#### *Rekombinante proteiner*

Rekombinant Hsp70 og dens mutanter ble generert ved å benytte pET-16b-vektorsystemet (Novagen) med induksjon av proteinuttrykking og påfølgende Ni<sup>2+</sup>-affinitetsrensing optimalisert i overensstemmelse med produsentens protokoll.

20

Merking av rHsp70 med Alexa Fluor 488 ble utført ifølge produsentens protokoll (Molecular Probes).

*Cellulært opptak av rekombinante proteiner og antistoffer*

Sub-konfluente celler ble dyrket i RPMI 1640 (Invitrogen) tilsatt 6 % varmeinaktivert kalveserum og penicillin-streptomycin. Rekombinante proteiner eller retikulocytlysater ble tilsatt direkte til mediet for å oppnå  
 5 sluttkonsentrasjonen. Cellene ble deretter dyrket i nye 20 timer i nærvær av proteinet/lysate.

Metning av cellene med et antistoff mot BMP (LPBA) (6C4) ble utført ifølge teknikker på fagområdet.

Kvantifisering av endocytosert rHsp70\* ble utført ved å dyrke celler 20 timer i  
 10 nærvær av rHsp70\* og etter dette ble cellene høstet, vasket 3 ganger i PBS og telt. Til helcelleopptak ble  $1 \cdot 10^5$  celler benyttet. Cellene ble lysert med inkubering 30 min på is i 100  $\mu$ l digitonin-PBS (200  $\mu$ g/ml). Fluorescens ble målt på en Spectramax Gemini plateavleser (Molecular Devices). For lette membranfraksjoner (LMF) ble totalt  $1 \cdot 10^6$  celler høstet, vasket 3 ganger i PBS og Dounce-  
 15 homogenisert inntil membranoppbrytning nådde 90 % som bestemt ved trypanblåfarging. Cellene ble deretter utsatt for membranfraksjonering ved først å fjerne plasmamembranen, kjernen og tunge membranfraksjoner og etter dette ble LMF høstet ved sentrifugering ved  $17000 \cdot g$  i 20 min. LMF ble deretter delt opp i to, der den første ble beholdt som den "fulle" LMF. Den andre fraksjonen ble  
 20 fryse/tørket i 5 sykluser i flytende nitrogen for å bryte opp membranene og deretter sentrifugert ved  $20000 \cdot g$  i 20 min for å separere membranene fra lumen-innhold. Alt celledarbeid etter høsting ble utført ved maksimalt 4 °C.

*Analyser for lysosomal integritet og celleviabilitet*

Sub-konfluente U-2-OS-celler inkubert med 2  $\mu$ g/ml akridinorange i 15 min ved 37  
 25 °C ble vasket, bestrålt og analysert i Hanks balanserte saltløsning tilsatt 3 % FCS. Celler for enkeltcellesynliggjøring ble valgt fra 8 forhåndsdefinerte for hver brønn i sendt lysmodus og etter dette ble de samme cellene straks visualisert og eksponert overfor blått lys fra USH102 100W mercury arc burner (Ushio electric) installert i et U-ULS100HG-hus (Olympus) i 20 sek. Fluorescensmikroskopi ble utført på  
 30 Olympus IX-70 invertert mikroskop med et LCPlanF1 x20 objektiv med NA=0,40. Tap av lysosomal pH-gradient ble kvantifisert ved å telle tapet av intens rød farging.

Apoptoseliknende celledød ble undersøkt ved farging av cellene med 0,05  $\mu$ g/ml Hoechst 33342 (Molecular Probes) og ved å telle celler med kondenserte kjerner i et  
 35 invertert Olympus IX-70 fluorescensmikroskop (Filter U-MWU 330-385 nm). For hvert eksperiment ble minimum åtte tilfeldig valgte områder telt. Viabiliteten til celler ble analysert med 3-(4,5-dimetylthiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid (MTT) reduksjonsanalysen som tidligere beskrevet<sup>67</sup>. Nekrotiske celler ble kvantifisert med flowcytometri ved å farge cellene i 10 min ved 37 °C med 2,5  $\mu$ M

SYTOX Green (Molecular Probes) og deretter måle positivt fargede celler ved deres fluorescensintensitet i FL1-kanalen på et flowcytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson).

- 5 Celler ble behandlet med cisplatin som indikert, cytosolfraksjoner ble oppnådd ved digitoninbehandling og cytosolforeliggende cysteinkatepsin (zFRase) og kaspase-3-liknende aktiviteter ble bestemt.

#### *RNA-interferens*

- 10 siRNA som ble benyttet inkluderte ett som er rettet på de to genene som koder mot Hsp70 (HSPA1A og HSPA1B), 5'-GCCAUGACGAAAGACAACAAUCUGU-3' (Invitrogen) og et kontroll-Hsp70-siRNA som tidligere er beskrevet. Oligofektamin (Invitrogen) ble benyttet som et transfeksjonsmiddel.

#### *Immunpåvisning*

- 15 Primære antistoffer benyttet inkluderte monoklonale museantistoffer mot Hsp70 (2H9, tilveiebrakt av Boris Margulis, Russian Academy of Sciences, St.Petersburg, Russland), glyseraldehyd-3-fosfatdehydrogenase (GAPDH, Biogenesis), BMP (6C4, (Kobayashi et al., 1998)), LIMP-1 (H5C6, utviklet av J.Thomas August og James E.K. Hildreth og fremskaffet fra the Developmental Studies Hybridoma Bank utviklet under overoppsyn av NICHD og opprettholdt av The University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, USA), cyt c (klon 6H2.B4, BD  
20 Pharmingen), SERCA (IID8, Calbiochem) og golgin-97 (CDF4, Molecular Probes). Proteiner separert ved 10 % SDS-PAGE og overført til en nitrocellulosemembran ble påvist ved å benytte primære antistoffer, passende peroksidasekonjugerte sekundære antistoffer fra Dako, ECL Western blotting reagents (Amersham) og Luminiscent Image Reader (LAS-1000Plus, Fujifilm).

- 25 *Tryptofanfluorescensspektra og liposom 90 ° lysspredning*

- Tryptofanfluorescensspektra (RFI) og liposom 90 ° lysspredning (RSI) ble analysert i en HEPES-buffer (20 mM HEPES, 0,1 mM EDTA, pH 7,4 eller 6,0 som indikert) ved å benytte LUV'er bestående av indikerte lipider essensielt som beskrevet tidligere. For RFI ble LUV'er tilsatt i 10 µM volumer og spektra ble registrert etter  
30 20 min stabiliseringsperiode. For RSI ble rekombinante proteiner tilsatt i 0,12 nmol volumer.

#### *Surface-Plasmon Resonans(BIAcore)*

- 35 For klargjøring av LUV'er ble en lipidblanding bestående av 10 mol% sfingomyelin, 50 mol% fosfatidylkolin, 20 mol% kolesterol og 20 mol% BMP løst i organiske løsningsmidler tørket under en strøm av argon og hydrert på nytt i Tris/HCl-buffer (pH 7,4) (Kolzer et al., 2004).Blandingen ble fryse-tint ni ganger i flytende nitrogen og deretter i en inkubator ved 37 °C. Etter ultralydbad i 15 min ble blandingen passert 21 ganger gjennom en polykarbonatmembran med en

porediameter på 100 nm. Surface-plasmon resonansmålinger ble utført ved å benytte et BIAcore 2000-system ved 25 °C. LUV'er (total lipidkonsentrasjon 0,1 mM) ble immobilisert på overflaten av en L1-sensorbrikke (BIAcore) i PBS (påføringsbuffer). Kjørebufferen som ble benyttet var natriumacetatbuffer (50 mM, pH 4,5). Som kontroll ble sur sfingomyelinase (0,2 µM, 60 µl i kjørebuffer) injisert direkte på liposomoverflaten. Responsenheter mellom 4100 RU – 5250 RU ble oppnådd. Proteinet av interesse ble injisert i kjørebuffer ved en strømningshastighet på 20 µl/min ved konsentrasjonene som er indikert. Etter injeksjon ble en dissosiasjonsfase på 10 min lagt til.

## 10 *Molekylær modellering*

Primær strukturanalyse i tillegg til molekylær modellering ble utført med programvare tilgjengelig fra Expert Protein Analysis System (EXPaSY) proteomics-serveren hos the Swiss Institute of Bioinformatics (<http://expasy.org/>). Molekylær modellering ble utført på basis av krystallstrukturen til det humane Hsp70-ATPase-  
 15 domenet (pdb code: 1S3X) og det humane Hsc70-substratbindingsdomenet (pdb code: 7HSC) med DeepView-Swiss PDB Viewer. Overflatemodeller ble basert på columb-interaksjon ved pH 7,0 ved å benytte en dielektrisk konstant i løsningsmiddel på 80 (H<sub>2</sub>O).

### *Statistisk analyse*

20 Statistisk analyse ble utført ved å benytte en to-halet, paret Students T-test for å evaluere null-hypotesen. Grensenivået for statistisk signifikans ble satt til 5 % og alle grupper av data ble testet for sammenlignbarhet for deres varianser ved å benytte en F-test. Alle statistiske beregninger ble utført på et maksimum av n=3 uavhengige eksperimenter.

## 25 Diskusjon

Litteraturen har tilveiebrakt bevis på at Hsp70 kan være til stede på plasmamembraner i tumorceller, i tillegg til i det endolysosomale systemet. Det var videre kjent at Hsp70 kunne bli frigjort til blodstrømmen under ulike stressinduserende hendelser, der de mest typiske er feber, traume og tung trening,  
 30 der den mest intrigerende sannsynligvis er fra psykologisk stress, selv om dette arbeidet i hovedsak ble utført på fagområdet for immunologi. Tilstedeværelsen av Hsp70-enheter på innsiden av den endolysosomale avdelingen hadde også blitt beskrevet for et annet medlem av Hsp70-familien, nemlig den konstitutivt uttrykte Hsc70. Funksjonen til Hsc70 på dette stedet hadde faktisk gitt navn til prosessen  
 35 som er kjent som chaperon-mediert autofagi.

Fra litteraturen var likevel ingenting kjent om den molekylære basisen for assosieringen av Hsp70 med plasmamembraner og endolysosomale membraner, noe som ledet oppfinnerne til dannelsen av dette prosjektet.

Dataene som er presentert i eksempel 1 viser at Hsp70 er i stand til å interagere med negativt ladde membranlipider slik som fosfatidylserin (PS), kardiolipin og bis(monoacylglysero)fosfat (BMP) ved nøytral pH. Ved herming av surheten som kan bli forventet i det tidlige endolysosomale systemet (pH 6.0) endres likevel

5 interaksjonsprofilen dramatisk, og affiniteten til Hsp70 for BMP blir 20 ganger høyere enn ved nøytral pH og nesten 9 ganger høyere for PS. Denne Hsp70-BMP interaksjonen ble verifisert i et mer gjennomarbeidet BIAcore-system, der pH nå var satt til den som er forventet i sene endosomer og lysosomer (pH 4,5), som er hovedområdet for det meste av cellulært BMP. Interessant nok viser det kjente

10 BMP-interagerende proteinet, sur svingomyelinase (aSMase), som er avhengig av BMP som en kofaktor, kun halvparten av affiniteten for BMP sammenlignet med den for Hsp70, noe som illustrerer den høye relative affiniteten til Hsp70 for BMP.

Interaksjonen til Hsp70 for BMP har også blitt rapportert av andre, og det har også en interaksjon mellom muse-Hsp70 og sure glykoceramider, der interaksjonen var

15 avhengig av det N-terminale ATPase-domenet og i noen tilfeller også av det peptidbindende domenet (PBD). I motsetning til systemene som er benyttet her så ble disse funnene gjort i systemer bestående i hovedsak av kun ett lipid (henholdsvis 90-100 % og 100 % rent lipid), som ikke sannsynlig ligner noe marginalt komplekst lipidmiljø som man vil forvente i den eukaryote cellen. Likevel

20 er viktigheten til den N-terminale regionen til Hsp70 for sure lipidassosiasjoner som vist av Harada et al, i overensstemmelse med oppfinnernes funn om at interaksjonen for Hsp70 med BMP er avhengig av dens N-terminale ATPase-domene.

Oppfinnerne viser ytterligere at tryptofan 90 (W90) på Hsp70 er en avgjørende aminosyre fordi dens mutasjon signifikant reduserer Hsp70-BMP interaksjonen. En

25 hypotetisk modell argumenterer med at Hsp70 inneholder spesifikke bindings seter for de hydrofile og hydrofobe delene av sure glykolipider både på ATPase- i tillegg til på det peptidbindende domenet (PBD).

Selv om denne modellen kan være anvendbar for Hsp70-binding til sure glykolipider så vil oppfinnerne heller foreslå en annen modell for Hsp70-BMP-

30 interaksjonen. Basert på dataene som er presentert her om at, I) PBD er kun i stand til mye svakere interaksjoner med BMP, II) viktigheten av W90, III) bindingsegenskapene til ATPase-domenet og IV) den molekylære modelleringen av overflate-elektrostatisk potensial for Hsp70, så foreslår oppfinnerne at Hsp70 interagerer med BMP via et elektrostatisk positivt ladd, kileformet sub-domene på

35 bunnen av ATPase-kløften. Ettersom konservativ mutasjon av W90 til fenylalanin signifikant reduserer Hsp70-BMP interaksjonen uten å påvirke refoldings- eller ATPase-aktivitetene til Hsp70, og fordi denne enkle aminosyresubstitusjonen ikke endrer den elektrostatiske profilen, så er det likevel mulig at en mellomting mellom disse to modellene er mer hensiktsmessig for å forklare interaksjonen av Hsp70 med

40 et mer vanlig anionisk lipidmotiv. I en slik modell kan den positive overflateladningen fremme elektrostatiske interaksjoner og spesielt kan rester slik



som W90 være involvert i bestemmelse av bindingsspesifisitet for anioniske lipidbindingspartnere – i dette tilfellet BMP. Interessant nok kan dette potensielt implisere Hsp70 som en mer generell regulator av lipid-homeostase i cellen. Dette underbygges av data som viser at lipidmembranene for celler kan virke som de primære sensorene for stress slik som feber og oksidativt stress og dermed som de første indusererne av stressresponsen. I møte med stress kan man argumentere med at lipidmembranene i cellen vil være avgjørende avdelinger å opprettholde ved homøostase eller faktisk modifisere for å utløse spesifikke signaliseringshendelser som en respons på den cellulære utfordringen. Bindingen av Hsp70 til lipider slik som BMP og den følgende økte stabiliteten til lysosomale membraner og kanskje andre cellulære lipidhendelser kan slik representere en del av en generell cellulær stressrespons. I tilfellet med kreft kan en slik respons ha blitt kapret for å tjene kreftens egne formål, men også fra et bredere evolusjonært perspektiv så vil en koordinert protein-lipid respons som svar på cellulært stress være logisk.

Dataene som er presentert her som viser at kun Hsp70, og ikke Hsc70 og Hsp70-2, er i stand til å direkte beskytte lysosomale membraner antyder at en potensiell lipidstressrespons kan være spesifikt regulert av den viktige stressinduserte Hsp70 selv og ikke av andre Hsp70-enheter. Slik det også er vist fører likevel også fjerning av Hsp70-2 til lysosomal membranpermeabilisering og celledød, selv om veien i dette tilfellet er indirekte fordi den er avhengig av LEDGF. Mekanismen for hvordan LEDGF påvirker de lysosomale membranene er likevel fremdeles uløst.

For å kunne validere in vivo-relevansen av Hsp70-BMP interaksjonen målsøkte oppfinnerne BMP med endocytoserte antistoffer og lysosomalt Hsp70 ved endocytose av det ellers celle-ugjennomtrengelige AIF-avledede polypeptidet ADD70. Dette verifiserte at interaksjonen mellom Hsp70 og BMP virker for å stabilisere lysosomale membraner fordi celler deretter ble signifikant sensitivisert overfor effektene av direkte lysosomale membranødeleggende stimuli i tillegg til det LMP-induserende kjemoterapeutiske middelet cisplatin, der den programmerte celledødsprofilen for dette var kjennetegnet som en del av dette prosjektet.

Uttrykking av ADD70 har tidligere blitt vist å sensitivisere kreftceller overfor en mengde dødsstimuli og minske tumorigeniteten til rotte-kolonkarsinomceller og muse-melanomceller hos syngeneiske dyr. Hovedforskjellen mellom denne tilnærmingen og tilnærmingen presentert her er at foreliggende oppfinnere søkte å spesifikt målsøke det lysosomale Hsp70 via endocytose av ADD70, mens de tidligere undersøkelsene benyttet cytosoluttrykking av ADD70 for å målsøke det mer rikelig forekommende Hsp70 i cytosol. Suksessen ved å målsøke den endolysosomale Hsp70-BMP interaksjonen tilveiebrakte også et visst proof-of-concept for ideen med å målsøke lysosomale komponenter via endocytose av terapeutiske årsaker, som er et konsept som kan ha brede terapeutiske implikasjoner, fordi man kan tenke seg å sensitivisere for eksempel kreftceller overfor midler som induserer lysosomale celledødsveier via spesifikk inhibering av

den lysosomstabiliserende funksjonen til Hsp70. Vice versa kan kanskje interaksjonen mellom Hsp70 og BMP tilveiebringe nye behandlingsstrategier som er avhengige av cytobeskyttelsen som gis ved den lysosomstabiliserende funksjonen til eksogent administrert Hsp70 for angrep så ulike som pankreatitt, motor og sensoriske nervelesjoner og lysindusert retinaskade. Faktisk har konseptet med å benytte det endocytiske maskineriet for introduksjon av spesifikke cytotoxiske forbindelser allerede blitt utforsket, fordi endocytisk levering av en hydrokarbonheftet BH3-heliks basert på den pro-apoptotiske BH3-interagerende domenedødsagonisten Bid vist å indusere apoptose i leukemiceller. Denne prosessen var avhengig av at BH3-heliksen forlater den endocytiske avdelingen intakt og aktiverer Bax og Bak for å indusere frigjøring av cytokrom-c og aktivere et mitokondrieprogram for apoptose. Dessverre var likevel ikke mekanismen for unnslipping fra det endocytiske systemet adressert i denne artikkelen.

Som vist her er interaksjonen mellom Hsp70 og BMP avhengig av ATPase-domenet på Hsp70. Interessant nok kan nyere rapporter på Hsp70-chaperonet Hsp70-bindingsprotein-1 (HspBP1) understreke viktigheten av dette positivt ladde området på Hsp70. En undersøkelse av krystallstrukturen til HspBP1 i kompleks med en del av ATPase-domenet til Hsp70 har avslørt at interaksjonen mellom disse to ble mediert en krummet, totalt  $\alpha$ -helisk fold i HspBP1 inneholdende fire armadilloliknende repetisjoner. Den konkave flaten på denne krummede folden omfavner flik II på ATPase-domenet, den samme fliken som danner hoveddelen av det elektrostatiske positivt ladde volumet til Hsp70 sitt ATPase-domene, som oppfinnerne argumenterer for å mediere interaksjonen mellom Hsp70 og BMP. Et ytterligere perspektiv på dette tilveiebrakt i en annen undersøkelse der 14 kreftcellelinjer ble karakterisert med hensyn på deres relative Hsp70/HspBP1-nivåer. Denne andre undersøkelsen fant at cellelinjer med et høyt molart forhold for HspBP1/Hsp70 var mer mottagelige for antikreftlegemidler enn de med lavt forhold og at overuttrykking av HspBP1 fremmet lysosomal membranpermeabilisering. Basert på disse rapportene og dataene som er presentert i dette eksempelet kan man argumentere for en modell der HspBP1 ved binding til det positivt ladde området på ATPase-domenet til Hsp70 forstyrrer dens interaksjon med BMP og dermed dens stabiliserende effekt på endo-lysosomale membraner, noe som fører til økt sensitivitet overfor LMP-induserende stimuli. Som et slikt kan armadillo-repetisjonsdomenet på HspBP1 potensielt danne basisen for et intelligent legemiddeldesign, omtrent som i tilfellet med ADD70. Effektiviteten til slike HspBP1-avledede molekyler ville være enkle å teste i systemene som er beskrevet her og representerer en interessant vei mot ytterligere anvendelser av den molekylære mekanismen som er beskrevet her.

Slik som oppfinnerne viser her binder Hsp70 med høy affinitet til BMP ved sur pH 4,5, til og med nesten 2 ganger høyere enn det som er tilfellet for den ”klassiske” BMP-bindingspartneren sur sfingomyelinase (aSMase). Interessant nok virker BMP

som en stimulatorisk kofaktor for enzymatisk hydrolyse av ikke bare sfingomyelin via aSMase, men av de fleste membranbundne sfingolipider fordi den også virker som en kofaktor for sfingolipidaktivatorproteiner (SAP'er/saposiner) A-D. Et åpenbart spørsmål vil slik være hvorvidt Hsp70 ved sin binding til BMP på noen

5 måte endrer bindingsegenskapene for aSMase og saposinene, for derved å modifisere katabolismen til membransfingolipider og glykosfingolipider og genereringen av nedstrøms-effektormolekyler slik som ceramid og dens metabolitter, ceramid-1-fosfat, sfingosin og sfingosin-1-fosfat, der alle disse har blitt implisert i både celleoverlevelse og -død. Faktisk har oppfinnerne funnet at

10 Hsp70 er i stand til å modulere bindingen av aSMase til BMP-inneholdende liposomer ved pH 4,5, avhengig av konsentrasjonen av Hsp70. Slik det fremgår kan lave konsentrasjoner (3-150 nM) med Hsp70 fremme interaksjonen for aSMase med BMP-Hsp70-liposomer, mens høyere konsentrasjoner av Hsp70 (300-1500 nM) har den motsatte effekten. Selv om vår arbeidskonsentrasjon i mediet når Hsp70 blir

15 tilsatt for endocytose er 300 nM så vil det være vanskelig å beregne en gitt intralysosomal konsentrasjon på basis av dette og enhver konklusjon vedrørende hvilken effekt Hsp70 kan ha på aSMase-aktivitet in vivo vil forbli spekulativ. Farging av de Hsp70-transgene (Hsp70-TG) og villtype (WT) iMEF'ene med et monoklonalt antistoff mot ceramid avslørte likevel at de Hsp70-transgene musene

20 viser en klar oppregulering av ceramid, som foreligger i et karakteristisk perler-på-en-snor mønster i periferien til cellene i tillegg til nær kjernen. Ytterligere analyse av ceramidprofilen til iMEF'ene via lipidekstrahering og påfølgende lipid-massespektroskopi har bekreftet disse funnene, fordi de kumulative nivåene av ceramid ble økt fra et gjennomsnitt på 10,2 ng ceramid/mg protein for iMEF-WT til

25 14,9 ng/mg for de Hsp70-transgene iMEF'ene. Oppfinnerne har ytterligere underbygget at denne effekten kan bli tilskrevet virkningen av Hsp70, fordi oppfinnerne også har laget profil på våre U-2-OS-celler tilført rHsp70 (dvs. 300 nM rHSP70 i fulle medier i 24 timer, analogt med alle andre Hsp70-

30 endocytoseeksperimenter som er presentert her). Kvantifiseringen av ceramid i Hsp70-tilsatte U-2-OS-celler viste en økning i kumulative nivåer av ceramid fra 2,99 ng ceramid/mg protein for kontrollcellene til 5,10 ng/mg for de Hsp70-tilsatte cellene (eksperimentet har kun blitt utført én gang når dette skrives). Sammenholdt støtter likevel alle en rolle for Hsp70 i modulering av ceramidnivåer i celler, selv om ytterligere validering selvfølgelig er nødvendig. Allikevel, dersom disse dataene

35 kan bli verifisert, så utløser dette en serie spørsmål, slik som kompartmentaliseringen av ceramidenheter, kvantifisering av spesifikke ceramidenheter (som det er minst 50 ulike molekylære enheter av), profilering av ceramidnivåer ved ulike typer stress, transformasjonsstatus for celler osv.

Interessant nok har en tidligere undersøkelse adressert ett av disse spørsmålene, som

40 viser at varmesjokk (42,5 °C i 2 timer) forårsaker akkumuleringen av ceramid i Molt-4 akutte leukemiske lymfocytter. Denne akkumuleringen kan bli blokkert med

de farmakologiske inhibitorene Fumonisin B1 og myriocin, der den siste av disse er ansett som en spesifikk inhibitor av de novo-synteseveien for ceramid fordi den blokkerer virkningen av serinpalmitoyltransferase, som er enzymet som setter i gang de novo-syntesen av nye sfingolipider fra serin- og palmitoyl-CoA. En partiell mekanisme for denne økningen i de novo-syntese av ceramid har blitt beskrevet i 5 gjær, der varmessstress inducerer en akutt influks av serin inn i ER som driver de novo-syntesen. Det vil være interessant å teste om økningen i ceramidnivåer som blir observert ved endocytose av rHsp70 kan bli modulert ved disse farmakologiske inhibitorene eller hvorvidt de observerte økningene stammer fra de katabolske 10 veiene for sfingolipidnedbrytning og stimuleringen av disse ved Hsp70-binding til BMP. Selvfølgelig kan også en hypotese for en forbindelsesmodell lages. I denne modellen kan et initielt varmessstress føre til membranfluidisering, serininfluks og rask igangsettelse av de novo-sfingolipidsyntese. Deretter vil induksjonen av Hsp70, som en konsekvens av varmessstresset, føre til økte Hsp70-nivåer i cellen, 15 Hsp70-interaksjon med BMP, økning i aSMase-aktivitet – og muligens også SAP-aktivitet – noe som fører til genereringen av ceramid ved de katabolske veiene. Denne sekundære responsen kan enten komplementere den opprinnelige de novo-induksjonen eller kanskje ta over for denne fordi den kontinuerlige de novo-responsen vil være avhengig av en kontinuerlig tilførsel av serin og palmitoyl-CoA. 20 Det er fremdeles ikke testet om den cellulære beskyttelsen er en konsekvens av økningen i ceramid selv eller kanskje bør tilskrives endrede nivåer av dens metabolitter oppstrøms eller nedstrøms.

På det tidspunktet mangler noen hovedspørsmål svar – Hvordan ender Hsp70 opp i det ekstracellulære miljøet og på innsiden av den endolysosomale avdelingen? Blir 25 Hsp70 utskilt og deretter tatt opp ved endocytose? – eller er den til stede på innsiden av lysosomer eller mer spesialiserte sekretoriske lysosomer, og venter på et frigjøringsignal i form av stress? Og kanskje enda viktigere – hva er den biologiske signifikansen av tilstedeværelsen av Hsp70 i det ekstracellulære miljøet?

Selv om arbeidet som er presentert i dette arbeidet ikke er i stand til å besvare disse 30 komplekse spørsmålene kan enkelte utledninger likevel bli gjort. For det første kunne Hsp70 bli endocytosert i alle cellelinjer som ble testet i dette prosjektet, noe som argumenterer for en felles vei for gjenkjenning av ekstracellulært Hsp70 (eHsp70). Dette er i overensstemmelse med data som viser at eHsp70 kan binde til et antall reseptorer på ulike underpopulasjoner av leukocytter. Reseptorene som er 35 involvert i ekstracellulær Hsp70 (eHsp70) – gjenkjenning inkluderer i hovedsak mønstergjenkjenningsreseptorer (PRR'er) og består av en mengde reseptorer fra ulike reseptorfamilier slik som de toll-liknende reseptorene (TLR), scavengerreseptorene og c-type lektiner. Fordi arbeidet i dette prosjektet ikke har adressert ved hvilken initiell mekanisme Hsp70 blir endocytosert (reseptormediert, 40 flåteavhengig, klatrinavhengig osv.) kan det ikke sies hvorvidt PRR'er er ansvarlige for endocytosen av eHsp70 som kan observeres i vårt system. Likevel kunne ikke 10

ganger overskudd av umerket Hsp70 konkurrere med AF488-merket Hsp70-opptak i verken U-2\_OS-celler eller iMEF'er – tvert imot var endocytose signifikant forsterket i nærvær av overskudd av umerket Hsp70, noe som i noen grad argumenterer mot en metningsbar opptaksmechanisme.

- 5 Fokus på det immunologiske fagområdet har i hovedsak vært på cytokinresponsen og aktiveringen av det iboende immunforsvaret utløst ved eHsp70-binding til PRR'ene og dermed har ikke mye fokus vært satt på effekten av eHsp70 etter reseptorbinding og igangsettelse av signalisering.
- 10 Frigjøringsmekanismene for Hsp70 inn i det ekstracellulære miljøet og effektene av Hsp70 når det havner her har i noen grad blitt adressert, selv om en tilfredsstillende molekylær innsikt i disse spennende mekanismene fremdeles mangler. Likevel eksisterer masse bevis på tilstedeværelsen av Hsp70 i det sirkulatoriske systemet etter stress og akkumulerende data underbygger en rolle for eHsp70, uansett om det er stressindusert eller eksogent levert, i nevrobeskyttelse i tillegg til i priming av det
- 15 primære immunsystemet. Med hensyn på frigjøring av Hsp70 kom det første beviset på overføringen av Hsp70 fra én celle til en annen fra undersøkelser i det store blekksprutaksonet, og under reproduksjonen av disse resultatene i dyrkede rotte-embryoceller ble bevis presentert på at en ikke-klassisk vei med eksocytose kunne være ansvarlig for frigjøringen av Hsp70.
- 20 Det har blitt foreslått at Hsp70 sammen med andre varmesjokkproteiner kun blir frigjort ved patologiske omstendigheter ledende til nekrotisk død og ikke under programmert celledød. Nyere undersøkelser har likevel vist at Hsp70 kan bli frigjort fra intakte celler ved aktive mekanismer og at graden av stimulus bestemmer frigjøringsmåten. Viktig er det at ingen undersøkelser har rapportert en direkte
- 25 korrelasjon mellom Hsp70 og markører for muskelskade selv om store økninger i eHsp70 kan bli påvist i den perifere blodstrømmen ved fysisk trening. Mest overbevisende, og kanskje også mest spennende, er oppdagelsene som viser at psykologisk stress slik so predatorfrykt og elektrisk sjokk kan fremprovosere en stressindusert eHsp70-frigjøring, en prosess som ble foreslått å være avhengig av
- 30 katekolaminsignalisering. Dette er spesielt interessant fordi katekolaminer via den  $\alpha_1$ -adrenerge reseptoren kan føre til intracellulære kalsiuminflukser, og kalsiumflukser kan forårsake eksocytose av eksosomer, multivesikulære legemer og lysosomer. Som en slik, under stress, så kan økninger i noradrenalin som virker på  $\alpha_1$ -adrenerge reseptorer føre til en kalsiumfluks inne i cellen med den påfølgende
- 35 frigjøringen av Hsp70 innenfor eksosomer. Bevis for denne hypotesen kommer fra demonstrasjoner av at eHsp70 kan bli frigjort i vesikler karakterisert som eksosomer, men bevis har også blitt presentert for at eHsp70 kan bli frigjort som fritt eHsp70, både i cellulære systemer i tillegg til in vivo. Det har også blitt
- 40 foreslått at lipidflåter er nødvendige for eHsp70-frigjøring selv om dette også er omstridt. Videre har det blitt vist at en funksjonell lysosomal avdeling er nødvendig for frigjøring av eHsp70 og at denne frigjøringen blir fulgt av tilstedeværelsen av

markørproteiner på overflaten av cellene, noe som tyder på en utskilling avhengig av plasma- og lysosomal membranfunksjon.

Uavhengig av hvorvidt det frigjorte Hsp70 foreligger i eksosomer eller som fritt eHsp70 er det interessant å bemerke at en eller annen form for sekretorisk MVB/sen endosomal/lysosomal avdeling øyensynlig er involvert i alle frigjøringsmåter. Basert på disse dataene og resultatene som er oppnådd her så kan en mer kompleks hypotese for hvordan Hsp70 unnslipper fra cytosol til det ekstracellulære miljøet bli formulert. Frigjøringen av Hsp70 vil fremdeles være avhengig av økninger i intracellulært kalsium, fordi dette vil være signalet for eksocytose av endo-lysosomer. Tilstedeværelsen av Hsp70 inne i denne avdelingen vil likevel være avhengig av interaksjonen av Hsp70 og BMP som beskrevet her, fordi Hsp70 effektivt vil bli aggregert på BMP-inneholdende indre membraner i sene endosomer/MVB'er/lysosomer. Hsp70 kan enten ankomme i sene endosomer og lysosomer fra ekstracellulært opptak slik som endocytose som beskrevet her, eller via invagineringer av perimetermembranene på tidlige og sene endosomer i tillegg til lysosomer, noe som vil bringe Hsp70 og BMP nært hverandre. Surheten i avdelingen vil opprettholde en sterk preferanse for Hsp70 sin lokalisering til BMP-inneholdende membraner. Ved eksocytose vil noe Hsp70 fremdeles være bundet til BMP-inneholdende eksosomer, men den nøytrale pH som eksisterer i det ekstracellulære miljøet vil ikke favorisere en Hsp70-BMP-likevekt forskjøvet signifikant mot mer ikke-bundet Hsp70, noe som fører til både fritt i tillegg til eksosombundet Hsp70, som da kan uttøve deres ekstracellulære funksjoner.

Oppsummert viser dataene som er vist her at Hsp70 interagerer direkte og pH-avhengig med det endo-lysosomale anioniske fosfolipidet BMP. Oppfinnerne viste at bindingen av Hsp70 til BMP er mediert via Hsp70 sitt ATPase-domene, og involverer tryptofan 90, og at denne interaksjonen fører til stabiliseringen av endo-lysosomale membraner, muligens ved å påvirke aktiviteten til andre BMP-bindende proteiner. Oppfinnerne viser også at utledningen av denne molekylære mekanismen åpner nye spennende muligheter for sensitivisering av kreftceller overfor midler som induserer lysosomale celledødsveier via spesifikk inhibering av den lysosomstabiliserende funksjonen til Hsp70. Vice versa kan interaksjonen mellom Hsp70 og BMP tilveiebringe nye behandlingsstrategier som støtter seg på cytobeskyttelsen som gis av den lysosomstabiliserende funksjonen til eksogent administrert Hsp70.

35

***Eksempel 2: Interaksjon mellom Hsp70 og bis(monoacylglysero)fosfat aktiverer sur sfingomyelinase, stabiliserer lysosomale membraner og fremmer celleoverlevelse***

40 Varmesjokkprotein 70 (Hsp70) et evolusjonært svært konservert molekylært chaperon som fremmer overlevelsen av stressede celler ved å inhibere lysosomal

membranpermeabilisering, som er et kjennetegn på stressindusert celledød. Pekepinner på dens molekylære virkningsmekanisme kan ligge i den nylig rapporterte stress- og kreftassosierte translokeringen av en liten andel av Hsp70 til den lysosomale avdelingen. Her viser vi at Hsp70 stabiliserer lysosomer ved å

5 forsterke aktiviteten til sur sfingomyelinase (ASM), som er en lysosomal lipase som hydrolyserer sfingomyelin til ceramid og fosforylkolin. I surt miljø binder Hsp70 med høy affinitet og spesifisitet til et endo-lysosomalt anionisk fosfolipid bis(monoacylglysero)fosfat (BMP), som er en essensiell kofaktor for ASM, for derved å fremme bindingen av ASM til BMP og stimulere ASM-aktivitet.

10 Inhiberingen av Hsp70-BMP interaksjonen ved BMP-antistoffer eller en punktmutasjon (W90A) i Hsp70 i tillegg til inhiberingen av ASM-aktivitet ved desipramin reverserer effektivt den Hsp70-medierte stabiliseringen av lysosomer. Verd å bemerke er at den reduserte ASM-aktiviteten i celler fra pasienter med Niemann-Pick-sykdom A (NPDA), som er en alvorlig lysosomal lagringsforstyrrelse

15 forårsaket av mutasjoner i ASM-genet, er også assosiert med en dramatisk minskning i lysosomal stabilitet, og denne fenotypen kan effektivt bli rettet opp ved å gjenopprette den lysosomale ASM-aktiviteten ved behandling med rekombinant Hsp70 eller ASM. Sammenholdt åpner disse dataene for spennende muligheter for behandlingen av lysosomale lagringsforstyrrelser og kreft med ikke-cellepermeable

20 forbindelser som trenger inn i den lysosomale lumen via den endocytiske leveringsveien.

Lysosomale proteaser, katepsiner, er viktige effektorer i evolusjonært konserverte celledødsprogrammer indusert ved en mengde ulike typer stress. Katepsinavhengig celledød er kjennetegnet ved en permeabilisering av tidlig lysosomalmembran og

25 påfølgende translokering av katepsiner inn i cytosol, der de kan sette i gang kaspaseavhengige og kaspaseuavhengige celledødsveier. For å kunne teste hvorvidt den lysosomale lokaliseringen er avgjørende for Hsp70 sin rapporterte evne til å stabilisere lysosomalmembraner og beskytte celler mot stressindusert celledød utnytte vi det endocytiske maskineriet i celler for å målrette rekombinant Hsp70

30 (rHsp70) inn i lysosomene. Immuncytokjemisk og biokjemisk analyse av U-2-OS-osteosarkomceller inkubert med fluorokrommerket rHsp70 avslørte effektivt opptak av rHsp70, dens spesifikke ko-lokalisering med sene endosomale og lysosomale markører og binding til lysosomalmembraner (figur 5a,b og figur 9). Ved å benytte en sanntids-synliggjøring for å overvåke lysosomal membranintegritet (figur 5c)

35 viste vi at det endocytoserte rHsp70 beskyttet lysosomer mot foto-oksidasjon (figur 5d). Videre sensitiviserte et kort interfererende RNA (siRNA) spesifikt for Hsp70 lysosomene overfor foto-oksidasjon, og denne effekten ble helt reversert ved endocytosert rHsp70, noe som treffende viser at den beskyttende effekten av endogent Hsp70 blir mediert av den lille fraksjonen av proteinet i den lysosomale

40 lumen (figur 5e). På tross av liknende opptak (data ikke vist) ble ingen lysosomal

stabilisering observert med rekombinant Hsc70 og Hsp70-2, som deler henholdsvis 86 % og 84 % aminosyresekvenshomologi med Hsp70 (figur 5d).

Tilstedeværelsen av Hsp70 i de lysosomale membranene og dens evne til å overleve i det hydrolytiske lysosomale miljøet tyder på at den binder til de lysosomale membranlipidene. Slik undersøkte vi interaksjonen av Hsp70 med palmitoyl-oleyl-fosfatidylkolin (POPC) store unilamellære vesikler (LUV'er) inneholdende ulike membranassosierte anioniske lipider, dvs. palmitoyl-oleyl-fosfatidylserin (POPS, primært i plasmamembran), kardiolipin (primært mitokondrielt) og BMP (primært i sene endosomer/lysosomer). Ved å ta hensyn til det økende sure miljøet i den endo-lysosomale avdelingen ved modning til lysosomer sammenlignet vi protein-lipid interaksjonene ved nøytrale (pH 7,4) og sure (pH 6,0) betingelser (figur 6a). Ved pH 7,4 forårsaker rHsp70 en liten relativ endring i 90 ° lysspredning i POPC-liposomer, noe som tyder på en svært svak binding. Som rapportert tidligere for POPS forsterket alle negativt ladde lipider bindingen av rHsp70 til liposomene ved nøytral pH omtrent 4 ganger uavhengig av ladningstettheten på liposomoverflaten (i området fra -1 til -2) (figur 6a). Bemerkelsesverdig nok var bindingen til BMP nesten 20 ganger sterkere ved den sure pH-verdien sammenlignet med den nøytrale pH-verdien, mens bindingen av POPS kun var litt økt ved surgjøring (figur 6a). Høyaffinitetsbindingen av Hsp70 til BMP ved sur pH ble bekreftet i et uavhengig sett med BIAcore-eksperimenter (figur 6e og 7a). Viktig å bemerke er at BMP-antistoffer som ble levert til den endo-lysosomale avdelingen ved endocytose inhiberte rHsp70 sin evne til å stabilisere lysosomene i levende celler (figur 6b), og sensitiviserte cellene overfor cisplatin (figur 6c), som er et anti-kreftmiddel som induserer lysosomal lekkasje.

For å undersøke hvilken del av Hsp70-proteinet som er ansvarlig for BMP-bindingen målte vi fluorescensforskyvningen for tryptofanene ved dokking av rHsp70 og dens mutanter på BMP-inneholdende liposomer. Tapet av signal i relativ toppfluorescensintensitet for Hsp70-mutanten som mangler aminosyrene 119-426 i det aminoternale ATPase-domenet (rHsp70- $\Delta$ ATP), men ikke for den som manglet aminosyrene 437-617 på det karboksyterminale peptidbindende domenet (rHsp70- $\Delta$ PBD) tydet på at ATPase-domenet var nødvendig for høyaffinitetsbindingen av Hsp70 til BMP (figur 6d). Deretter substituerte vi de to tryptofanene i Hsp70 med fenyilalaniner (W90F og W580F) og undersøkte hvilken tryptofan som var ansvarlig for fluorescensforskyvningen som ble indusert ved lipidbinding. Reduksjonen av signalet kun ved rHsp70-W90F tydet på at NH<sub>2</sub>-terminalen på proteinet dokket inn i lipidlaget (figur 6d). En mer kvantitativ BIAcore-analyse av BMP-rHsp70-interaksjonen bekreftet at Hsp70 interagerer med BMP i hovedsak via sitt ATPase-domene (figur 6e). Overraskende nok avbrøt W90F-mutasjonen spesifikt interaksjonen mellom rHsp70 og BMP mens de strukturelle (folding som analysert ved fjern og nær UV-sirkulær dikroisme) og funksjonelle (luciferasefolding og ATP-hydrolyse) aspektene ble opprettholdt for



Hsp70-chaperonet (figur 6e og data ikke vist). Slik ga rHsp70-W90F-mutanten oss et uvurderlig redskap for ytterligere å teste hvorvidt den direkte interaksjonen mellom Hsp70 og BMP gir Hsp70 dens lysosombeskyttende attributter. Faktisk hadde rHsp70-W90F-mutanten fullstendig mistet sin evne til å beskytte de lysosomale membranene mot foto-oksidasjon og celler mot cisplatinindusert lysosomal celledød, mens rHsp70-W580F-mutanten viste samme beskyttende effekt som villtypeproteinet (figur 6f og g). Viktig å bemerke er at mutante Hsp70-proteiner ble endocytosert essensielt like effektivt som villtype-Hsp70 (data ikke vist). Slik konkluderte vi med at bindingen av Hsp70 til BMP er essensiell for den lysosomstabiliserende effekten av Hsp70.

Fordi konsentrasjonen av BMP øker i endocytiske vesikler ettersom endosomene modnes for å danne lysosomer kan pH-reguleringen være måten ved hvilken Hsp70 blir styrt mot lysosomer. Beregninger (PROTOPARAM, EXPaSy proteomics server, Swiss Institute of Bioinformatics) avslørte at ATPase-domenet til Hsp70 har 1,72 enheter høyere teoretisk pI enn peptidbindingsdomenet (6,62 versus 4,9). Dette karakteristikumet tyder på at ATPase-domenet ved sur pH fortrinnsvis er positivt ladd, noe som kan fremme dets interaksjon med anioniske lipider. Våre data viser avhengigheten av Hsp70-BMP interaksjonen for sur pH og at ATPase-domenet støtter denne teorien. Videre avslørte molekylær modellering av den elektrostatiske overflaten av ATPase-domenet til Hsp70 at den danner en nesten kileformet struktur med en i hovedsak positiv ladning på bunnen av kilen som inneholder W90 og som muligens forklarer den inngående virkningen W90F-mutasjonen har på Hsp70 sin evne til å interagere med BMP og stabilisere lysosomer (figur 6h).

BMP binder ASM med høy affinitet og stimulerer dens evne til å hydrolysere svingomyelin til ceramid og fosforylkolin. BIAcore-analysen avslørte at forhåndsbehandling av de BMP-inneholdende LUV'ene med rHsp70 ved sub-ekvimolare konsentrasjoner fremmet den påfølgende bindingen av ASM, mens høyere rHsp70-konsentrasjoner viste en inhibitorisk effekt (figur 7a og 10). Bemerkelsesverdig nok oppviste Hsp70-transgene murine embryonale fibroblaster (Hsp70-iMEF'er), som er beskyttet mot stressindusert lysosomal skade (figur 7e), signifikant høyere ASM-aktivitet enn villtype-MEF'er (WT-MEF'er), og behandlingen av WT-MEF'er med rHsp70 ved en cytobeskyttende konsentrasjon (300 nM) økte ASM-aktiviteten til nivået sammenlignbart med det i Hsp70-MEF'er (figur 7b). For å teste hvorvidt ASM er ansvarlig for den lysosomstabiliserende effekten behandlet vi celler med desipramin, som er en godt karakterisert farmakologisk ASM-inhibitor. Desipramin reduserte viabiliteten for MEF'ene på en doseavhengig måte og celledøden var assosiert med en massiv permeabilisering av lysosomer som vist ved lekkasjen av lysosomale katepsiner inn i cytosol (figur 7c og d). Verdt å bemerke er at desipraminindusert celledød og lysosomal lekkasje var signifikant redusert i Hsp70-MEF'er sammenlignet med WT-MEF'er. Videre reverserte inhibering av ASM med sub-toksisk konsentrasjon av desipramin den

lysosomale stressmotstandsdyktigheten for Hsp70-MEF'ene til nivået for WT-MEF'er som vist ved akselererende tap av lysosomal membranintegritet ved foto-oksidasjon (figur 7e). Den lysosombeskyttende rollen til ASM ble ytterligere underbygget ved data som viser at lysosomer i fibroblaster fra pasienter med NPDA, som er en dødelig lysosomal lagringsforstyrrelse forårsaket av mutasjoner i ASM-genet, oppviste ekstrem sensitivitet overfor foto-oksidasjonsindusert skade (figur 8a). Bemerkelsesverdig nok var også rHsp70 i stand til å forsterke den enzymatiske aktiviteten til det endogent muterte ASM i tillegg til det samtidig påførte rASM i pasientceller (figur 8b). Den økte ASM-aktiviteten oppnådd ved å innføre rHsp70, rASM eller kombinasjonen av de to i lysosomene korrelerte med deres evne til å stabilisere lysosomene og normalisere volumet av den dramatisk forstørrede lysosomale avdelingen i NPDA-celler (figur 8b-d). Det bør bemerkes at i likhet med rHsp70 så lokaliseres også rASM til lysosomene (figur 8b).

Sammenholdt tyder våre data på at Hsp70-BMP interaksjonen stabiliserer lysosomer via en mekanisme som involverer reguleringen av svingomyelinmetabolisme heller enn direkte fysisk stabilisering av membranen. En slik indirekte effekt blir underbygget av det faktumet at BMP kun er lokalisert i de indre membranene i den endo-lysosomale avdelingen der dens hovedfunksjon er å støtte oppløsningen og lipidekstraheringen fra lipidvesikler ved ASM og svingolipidaktivatorproteiner. Interessant nok modifierer ASM-mediert økning i lysosomal ceramidkonsentrasjon den steriske konformasjonen av lysosomale membraner og fremmer derved deres fusjon med andre intracellulære vesikler og plasmamembran. Endringene i sammensetningen og volumet av den lysosomale membranen som et resultat av ceramidindusert forsterket fusjonskapasitet kan slik bidra til den Hsp70-medierte økningen i lysosomal stabilitet. På den annen side induserer ulike apoptotiske stimuli translokaliseringen av ASM til den ytre delen av plasmamembranen, der ceramid kan danne lipidmikrodomener som virker som seter for aktivering av membranassosierte signaliseringsmolekyler involvert i apoptotisk signalisering. Slik kan ceramid ha motsatte effekter på celleoverlevelse avhengig av hvorvidt det blir produsert inne i lysosomet eller på plasmamembranen. Den ovenfor beskrevne molekylære mekanismen som ligger under den cytobeskyttende effekten til Hsp70 åpner nye spennende muligheter for sensitivisering av kreftceller overfor midler som induserer lysosomale celledødsveier via spesifikk inhibering av den lysosomstabiliserende funksjonen til Hsp70. Vice versa kan evnen til det eksogent administrerte rHsp70 alene eller i kombinasjon med rASM direkte bli utfordret som en ny behandling for NPD-pasienter, hvis terapeutiske valgmuligheter per i dag er begrenset til gen- og stamcelleterapier.

### Fremgangsmåteoppsummering

WT- og Hsp70-MEF'er ble generert, udødeliggjort og opprettholdt som beskrevet på fagområdet. Humane NPDA-fibroblaster (83/82) stammer fra en hudbiopsi fra en 5 måneder gammel pasient med hepatosplenomegali. Rekombinante proteiner ble generert ved å benytte pET-16b-vektorsystemet og Ni<sup>2+</sup>-affinitetsrensing (Novagen), og merket med AlexaFluor 488 i overensstemmelse med produsentens protokoll (Molecular Probes). For å analysere den lysosomale integriteten utviklet vi en sanntids-synliggjøringsfremgangsmåte for celler farget med akridinorange, en metakromatisk svak base som akkumulerer i den sure avdelingen i cellene og farger dem røde og sensitiviserer dem overfor foto-oksidasjon. Det foto-oksidasjonsinduserte tapet av den lysosomale pH-gradienten og lekkasje av akridinorange til cytosol fra individuelle lysosomer ble kvantifisert visuelt som "tap av røde flekker" i U-2-OS-celler og som en minskning i rød og økning av grønn fluorescens med Zeiss LSM DUO-programvare i fibroblaster. De totale og de cytoplasmiske (digitoninekstraherte) katepsinaktivitetene ble målt i digitoninbehandlede prøver ved å benytte zFR-AFC (Enzyme System Products) – probe som beskrevet på fagområdet. Tryptofan-fluorescensspektra og liposom 90° lysspredning ble analysert i HEPES-buffer (20 mM HEPES, 0,1 mM EDTA, pH som vist) essensielt som beskrevet på fagområdet. Surface-plasmon-resonansmålinger ble utført med immobiliserte LUV'er ved å benytte et BIAcore 2000-system som beskrevet på fagområdet. Hsp70-siRNA (5'-GCCAUGACGAAAGACAACAAUCUGU-3') og et kontroll Hsp70-siRNA ble transfektert med oligofektamin (Invitrogen). Immunpåvisning ble utført med standardprotokoller. Apoptoseliknende celledød og lysosomal membranpermeabilisering ble analysert essensielt som beskrevet på fagområdet. ASM-aktivitet ble analysert med Amplex Red Sphingomyelinase Assay Kit (A12220) fra Molecular Probes med modifiseringer beskrevet på fagområdet. Statistisk analyse ble utført ved å benytte en to-halet, paret Students T-test og alle grupper med data ble testet for sammenlignbarheten for deres varianser ved å benytte en F-test.

### Fremgangsmåter

*Celledyrking og reagenser.* Humane U-2-OS-osteosarkomceller ble dyrket i RPMI 1640 (Invitrogen) tilsatt 6 % varmeinaktivert kalveserum og penicillin-streptomycin. Hsp70-transgene og passende kontroll-MEF'er ble generert og opprettholdt som beskrevet på fagområdet. Humane primære NPDA-fibroblaster ble dyrket i MEF-medium ytterligere tilsatt 1 % Na-Pyruvat, 1 % HEPES, 1 % L-glutamin. Alle celler ble dyrket ved 37 °C i en fuktet luftatmosfære med 5 % CO<sub>2</sub> og gjentatte ganger testet og funnet negativ for mykoplasma. Dersom ikke annet er opplyst ble alle kjemikalier kjøpt fra Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Danmark AS).

*Analyser for lysosomal integritet.* Sub-konfluente celler inkubert med 2 µg/ml akridinorange i 15 min ved 37 °C ble vasket, bestrålt og analysert i Hanks balanserte saltløsning tilsatt 3 % føtalt kalveserum. Celler for enkeltcellesynliggjøring ble valgt fra 8 forhåndsdefinerte områder i hver brønn i lyssende-modus og etter dette ble de samme cellene straks visualisert og eksponert for blått lys fra USH102 100W kvikksølvbuebrenner (Ushio electric) installert i et U-ULS100HG-hus (Olympus) i 20 sek. Fluorescensmikroskopi ble utført på Olympus IX-70 invertert mikroskop med et LCPlanF1 x20-objektiv med NA=0,40. Tap av lysosomal pH-gradient ble kvantifisert ved å telle tapet av intens rød farging. En mer utarbeidet fremgangsmåte for analyse av lysosomal integritet ble utviklet for å håndtere den større lysosomale avdelingen i de ulike fibroblastene som ble benyttet i denne undersøkelsen. Celler for enkeltcellesynliggjøring ble valgt fra 8 forhåndsdefinerte områder i hver brønn i lyssende-modus og etter dette ble de samme cellene straks og kontinuerlig eksponert for 489 nm lys fra en 100 mW diodelaser mens laserskanningsmikrografer ble registrert hvert 330 ms på et Zeiss LSM LIVE DUO-konfokalsystem i to kanaler definert med båndpasseringsfiltre for 495-555 nm (grønt) og LP650 nm (rødt) lys. De resulterende tidsintervallfilmene ble deretter analysert med den integrerte Zeiss LSM DUO-programvaren. De totale og cytoplasmiske (digitoninekstrahert) katepsinaktivitetene ble målt i digitoninbehandlede prøver ved å benytte zFR-AFC (Enzyme System Products) –probe som beskrevet på fagområdet.

*Analyser for celleviabilitet.* Celletetthet ble undersøkt med 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenyltetranatriumbromid (MTT, Sigma-Aldric) reduksjonsanalysen som beskrevet på fagområdet. Apoptoseliknende celledød ble undersøkt ved å farge cellene med 0,05 µg/ml Hoechst 33342 (Molecular Probes) og telle celler med kondenserte kjerner i et invertert Olympus IX-70 fluorescensmikroskop (Filter U-MWU 330-385 nm). For hvert eksperiment ble et minimum av åtte tilfeldig valgte områder telt.

*Immunpåvisning og mikroskopi.* Primære antistoffer som ble benyttet inkluderer monoklonale museantistoffer mot Hsp70 (2H9, tilveiebrakt fra Boris Margulis, Russian Academy of Sciences, St.Petersburg, Russland), glyseraldehyd-3-fosfatdehydrogenase (GAPDH, Biogenesis), BMP (6C4), lysosomalt integralmembranprotein-1 (H5C6, utviklet av J.Thomas August og James E.K.Hildreth og fremskaffet fra the Developmental Studies Hybridoma Bank utviklet under overvåkning av NICHD og opprettholdt av The University of Iowa, Department of Biological Sciences, Iowa City, USA). Proteiner separert med 10 % SDS-PAGE og overført til en nitrocellulosemembran ble påvist ved å benytte indikerte primære antistoffer, passende peroksidasekonjugerte sekundære antistoffer fra Dako, ECL Western blotting reagents (Amersham) og Luminescent Image Reader (LAS-1000Plus, Fujifilm). For immuncytokjemi ble Alexa Fluor-576- eller Alexa Fluor-488-konjugerte sekundære antistoffer benyttet. Lysotracker Red ble benyttet for direkte visualisering av den lysosomale avdelingen. Fluorescensbilder

ble tatt ved å benytte et Zeiss Axiovert 100M laserskanningsmikroskop. Lysotracker-kvantifisering og tidsintervallfilmer for lysosomal integritet ble utført på et Zeiss LSM LIVE DUO-system.

*Tryptofanfluorescensspektra og liposom 90 ° lysspredning.*

5 Tryptofanfluorescensspektra (RFI) og liposom 90 ° lysspredning (RSI) ble analysert i en HEPES-buffer (20 mM HEPES, 0,1 mM EDTA, pH 7,4 eller 6,0 som indikert) ved å benytte LUV'er bestående av indikerte lipider essensielt som beskrevet på fagområdet. For RFI ble LUV'er tilsatt i volumer med 10 µM og spektra ble registrert etter stabiliseringsperiode på 20 min. For RSI ble rekombinante proteiner  
10 tilsatt i volumer med 0,12 nmol.

*Surface-plasmon-resonans (BIAcore).* For klargjøring av LUV'er ble en lipidblanding bestående av 10 mol% sfingomyelin, 50 mol% fosfatidylkolin, 20 mol% kolesterol og 20 mol% BMP løst i organiske løsningsmidler tørket under en strøm av argon og rehydrert i Tris/HCl-buffer (pH 7,4). Blandingen ble fryst-tørket  
15 ni ganger i flytende nitrogen og deretter i en inkubator ved 37 °C. Etter ultralydbad i 15 min ble blandingen passert 21 ganger gjennom en polykarbonatmembran med en porediameter på 100nm. Surface-plasmon-resonansmålinger ble utført ved å benytte et BIAcore 2000-system ved 25 °C. LUV'er (total lipidkonsentrasjon 0,1 mM) ble immobilisert på overflaten av en L1-sensorbrikke (BIAcore) i PBS  
20 (påføringsbuffer). Kjørebufferen som ble benyttet var natriumacetatbuffer (50 mM, pH 4,5). Som en kontroll ble sur sfingomyelinase (0,2 µM, 60 µl i kjørebuffer) injisert direkte på liposomoverflaten. Responsenheter mellom 4100 RU – 5250 RU ble oppnådd. Proteinet av interesse ble injisert i kjørebuffer ved en  
25 strømningshastighet på 20 µl/min ved konsentrasjonen som er indikert. Etter injeksjon ble en dissosiasjonsfase på 10 min benyttet. I tilfellet der rASM etterfulgte rHsp70 ble rASM tilsatt i 180 sek etter den 10 min lange rHsp70-dissosieringsfasen etterfulgt av nye 10 minutters dissosiasjonsfase.

*Molekylær modellering*

30 Primær strukturanalyse i tillegg til molekylær modellering ble utført med programvare tilgjengelig fra proteomics-serveren fra the Expert Protein Analysis System (EXPaSy) hos the Swiss Institute of Bioinformatics (<http://expasy.org/>). Molekylær modellering ble utført på basis av krystallstrukturen til det humane Hsp70-ATPase-domenet (pdb code: 1S3X) og det humane Hsc70-substratbindingsdomenet (pdb code: 7HSC) med DeepView-Swiss PDB Viewer.  
35 Overflatemodeller ble basert på coulominteraksjon ved pH 7,0 ved å benytte en løsningsmiddel-dielektrisk konstant på 80 (H<sub>2</sub>O).

*Statistisk analyse.* Statistisk analyse ble utført ved å benytte en to-halet, paret Students T-test for å evaluere null-hypotesen. Grensenivået for statistisk signifikans ble satt til 5 % og alle grupper med data ble testet for sammenlignbarheten til deres

varianser ved å benytte en F-test. All statistikk ble utført på et minimum av n=3 uavhengige eksperimenter.

### **Eksempel 3: Effekt av benzylalkohol på lysosomal lagrings sykdom**

5 Det er i eksempel 2 og 3 vist at Hsp70 har en lysosomstabiliserende effekt via en interaksjon med BMP. For å evaluere om denne effekten også blir observert når celler eksponeres for en kjemisk Hsp70-induserer ble Niemann-Pick type-A (NPDA) pasientfibroblaster behandlet med Hsp70-indusereren benzylalkohol (BA). Resultater er vist i figur 11. Først ble NPDA-celler behandlet med økende doser av  
10 BA (0, 20, 30, 35, 40, 45 mM), lysert og analysert ved Western-blotting. Den samme mengden protein ble avsatt i hver brønn. Hsp70-proteinuttrykking ble evaluert for hver tilstand, og viser at BA induserte Hsp70-uttrykking på en doseavhengig måte (primært antistoff: Stressgen SPA-810, spesifikt for Hsp70). Deretter ble stabiliteten for NPDA-Göz-lysosomer etter behandling med 40 mM BA  
15 evaluert ved å benytte de samme fremgangsmåtene som beskrevet i eksempel 2. En økt lysosomal stabilitet ble observert som respons på BA. Til slutt ble det lysosomale tverrsnittsområdet i NPDA-Göz-lysosomer etter behandling med 40 mM BA evaluert ved å benytte de samme fremgangsmåtene som beskrevet i eksempel 2. En minsket patologi blir observert.

20

### **Punkter**

1. Fremgangsmåte for modulering av den enzymatiske aktiviteten til et enzym, der nevnte enzym interagerer med BMP, der nevnte fremgangsmåte omfatter trinnet med administrering av Hsp70, eller et funksjonelt fragment derav, i en form som er  
25 hensiktsmessig for å tillate interaksjon mellom BMP og Hsp70, eller nevnte funksjonelle fragment derav, og derved å modulere den enzymatiske aktiviteten til et enzym som interagerer med BMP.
2. Fremgangsmåte ifølge punkt 1, der Hsp70 eller nevnte funksjonelle fragment derav danner et kovalent eller ikke-kovalent kompleks med BMP.
- 30 3. Fremgangsmåte ifølge ett av de foregående punkter, der BMP interagerer med et saposin.
4. Fremgangsmåte ifølge punkt 3, der nevnte saposin er valgt fra gruppen som består av saposin A, saposin B, saposin C og saposin D.
- 35 5. Fremgangsmåte ifølge ethvert av de foregående punkter, der nevnte enzym er valgt fra gruppen som består av svingomyelinase, sur svingomyelinase, sialidase, alfa-galaktosidase, beta-galaktosidase, beta-galaktosylceramidase, glukosylceramidase og sur ceramidase.. Hsp70, eller et funksjonelt fragment derav, for anvendelse som et medikament.

7. Hsp70, eller et funksjonelt fragment derav, for anvendelse i behandlingen, lindringen eller profylaksen av en lysosomal lagringsforstyrrelse.
8. Anvendelse ifølge punkt 7, der nevnte lysosomale lagringsforstyrrelse er valgt fra gruppen som består av forstyrrelsene Niemann-Pick, Gaucher, Farber, Krabbe, Fabry og sialidose.
9. Fremgangsmåte for økning av opptaket av en forbindelse, der nevnte fremgangsmåte omfatter trinnet med administrering av nevnte forbindelse sammen med Hsp70 eller et funksjonelt fragment derav.
10. Fremgangsmåte ifølge punkt 9, der nevnte Hsp70 eller et funksjonelt fragment derav er kovalent bundet til nevnte forbindelse.

### Punkter

1. Bioaktivt middel som er i stand til å øke den intracellulære konsentrasjonen og/eller aktiviteten til Hsp70 for anvendelse som et medikament i behandlingen av en lysosomal lagringsforstyrrelse.
2. Bioaktivt middel ifølge punkt 1, der nevnte bioaktive middel er Hsp70, eller et funksjonelt fragment eller variant derav.
3. Bioaktivt middel ifølge punkt 2, der nevnte Hsp70, eller et funksjonelt fragment eller variant derav, har 100 % homologi med villtype-Hsp70-proteinet.
4. Bioaktivt middel ifølge punkt 2, der nevnte Hsp70, eller et funksjonelt fragment eller variant derav, har mellom 99,9 til 95 % homologi, f.eks. 95 til 90 % homologi, slik som 90 til 85 % homologi, f.eks. 85 til 80 % homologi, slik som 80 til 75 % homologi, f.eks. 75 til 60 % homologi med villtypeproteinet.
5. Bioaktivt middel ifølge punkt 2, der nevnte bioaktive middel er Hsp70.
6. Bioaktivt middel ifølge punkt 2, der nevnte Hsp70 er fullengde-Hsp70.
7. Bioaktivt middel ifølge punkt 2, der nevnte bioaktive middel er et funksjonelt fragment eller variant av Hsp70.
8. Bioaktivt middel ifølge punkt 7, der nevnte funksjonelle fragment eller variant av Hsp70 har en total lengde på mindre enn 641 aminosyrer, slik som mindre enn 625 aminosyrer, f.eks. mindre enn 600 aminosyrer, slik som mindre enn 575 aminosyrer, f.eks. mindre enn 550 aminosyrer, slik som mindre enn 525 aminosyrer, f.eks. mindre enn 500 aminosyrer, slik som mindre enn 475 aminosyrer, f.eks. mindre enn 450 aminosyrer, slik som mindre enn 425 aminosyrer, f.eks. mindre enn 400 aminosyrer, slik som mindre enn 375 aminosyrer, f.eks. mindre enn 350 aminosyrer, slik som mindre enn 325 aminosyrer. F.eks. mindre enn 300 aminosyrer, slik som mindre enn 275 aminosyrer, f.eks. mindre enn 250 aminosyrer, slik som mindre enn 225 aminosyrer, f.eks. mindre enn 200 aminosyrer, slik som mindre enn 175

aminosyrer, f.eks. mindre enn 150 aminosyrer, slik som mindre enn 125 aminosyrer, f.eks. mindre enn 100 aminosyrer, slik som mindre enn 75 aminosyrer, f.eks. mindre enn 50 aminosyrer, slik som mindre enn 25 aminosyrer.

5 9. . Bioaktivt middel ifølge punkt 7, der nevnte funksjonelle fragment eller variant av Hsp70 har en total lengde på mer enn 10 aminosyrer, slik som mer enn 25 aminosyrer, f.eks. mer enn 50 aminosyrer, slik som mer enn 75 aminosyrer, f.eks. mer enn 100 aminosyrer, slik som mer enn 125 aminosyrer, f.eks. mer enn 150 aminosyrer, slik som mer enn 175 aminosyrer, f.eks. mer enn 200 aminosyrer, slik som mer enn 225 aminosyrer, f.eks. mer enn 250 aminosyrer, slik som mer enn 275 aminosyrer, f.eks. mer enn 300 aminosyrer, slik som mer enn 325 aminosyrer, f.eks. mer enn 350 aminosyrer, slik som mer enn 375 aminosyrer, f.eks. mer enn 400 aminosyrer, slik som mer enn 425 aminosyrer, f.eks. mer enn 450 aminosyrer, slik som mer enn 475 aminosyrer, f.eks. mer enn 500 aminosyrer, slik som mer enn 525 aminosyrer, f.eks. mer enn 550 aminosyrer, slik som mer enn 575 aminosyrer, f.eks. mer enn 600 aminosyrer, slik som mer enn 625 aminosyrer.

10. Bioaktivt middel ifølge punkt 7, der nevnte funksjonelle fragment eller variant av Hsp70 har aminosyresubstitusjoner på mellom 0,1 til 1 % av aminosyrerestene i Hsp70, slik som mellom 1 til 2 % aminosyrerester, f.eks. mellom 2 til 3 % aminosyrerester, slik som mellom 3 til 4 % aminosyrerester, f.eks. mellom 4 til 5 % aminosyrerester, slik som mellom 5 til 10 % aminosyrerester, f.eks. mellom 10 til 15 % aminosyrerester, slik som mellom 15 til 20 % aminosyrerester, f.eks. mellom 20 til 30 % aminosyrerester, slik som mellom 30 til 40 % aminosyrerester, f.eks. mellom 40 til 50 % aminosyrerester, slik som mellom 50 til 60 % aminosyrerester, f.eks. mellom 60 til 70 % aminosyrerester, slik som mellom 70 til 80 % aminosyrerester, f.eks. mellom 80 til 90 % aminosyrerester, slik som mellom 90 til 100 % aminosyrerester.

11. Bioaktivt middel ifølge punkt 7, der nevnte funksjonelle fragment eller variant av Hsp70 har en total lengde i området på 5 til 25 aminosyrer, slik som 25 til 50 aminosyrer, f.eks. 50 til 75 aminosyrer, slik som 75 til 100 aminosyrer, f.eks. 100 til 125 aminosyrer, slik som 125 til 150 aminosyrer, f.eks. 150 til 175 aminosyrer, slik som 175 til 200 aminosyrer, f.eks. 200 til 225 aminosyrer, slik som 225 til 250 aminosyrer, f.eks. 250 til 275 aminosyrer, slik som 275 til 300 aminosyrer, f.eks. 300 til 325 aminosyrer, slik som 325 til 350 aminosyrer, f.eks. 375 til 400 aminosyrer, slik som 400 til 425 aminosyrer, f.eks. 425 til 450 aminosyrer, slik som 450 til 475 aminosyrer, f.eks. 475 til 500 aminosyrer, slik som 500 til 525 aminosyrer, f.eks. 525 til 550 aminosyrer, slik som 550 til 575 aminosyrer, f.eks. 575 til 600 aminosyrer, slik som 600 til 625 aminosyrer, f.eks. 625 til 640 aminosyrer.

12. Bioaktivt middel ifølge punkt 7, der nevnte funksjonelle fragment eller variant av Hsp70 omfatter hele eller deler av ATPase-domenet til Hsp70.



13. Bioaktivt middel ifølge punkt 7, der nevnte funksjonelle fragment eller variant av Hsp70 omfatter tryptofan på aminosyreposisjon 90 på Hsp70-ATPase-omenet.
14. Bioaktivt middel ifølge punkt 2, der nevnte Hsp70, eller et funksjonelt fragment eller variant derav, er rekombinant Hsp70 (rHsp70).
- 5 15. Bioaktivt middel ifølge punkt 2, der nevnte Hsp70 er avledet fra et pattedyr valgt fra gruppen som består av menneske (*Homo sapiens*), mus (*Mus musculus*), storfe, hund, rotte, ilder, svin, sau og ape.
16. Bioaktivt middel ifølge punkt 1, der nevnte bioaktive middel er en Hsp70-induserer.
- 10 18. Bioaktivt middel ifølge punkt 16, der nevnte bioaktive middel er en Hsp70-ko-induserer.
19. Bioaktivt middel ifølge punkt 18, der nevnte Hsp70-ko-induserer er et hydroksylaminderivat.
- 15 20. Bioaktivt middel ifølge punkt 19, der nevnte hydroksylaminderivat er valgt fra gruppen som består av Bimoclomol (BRLP-42), Arimoclomol (BRX-220), BRX-345 og BGP-15.
21. Bioaktivt middel ifølge punkt 19, der nevnte hydroksylaminderivat er Arimoclomol (BRX-220).
- 20 22. Bioaktivt middel ifølge punkt 17, der nevnte Hsp70-induserer er en membranfluidiserer.
23. Bioaktivt middel ifølge punkt 22, der nevnte membranfluidiserer er valgt fra gruppen som består av benzylalkohol, heptanol, AL721, docosaheksansyre, alifatiske alkoholer, eyleylalkohol, dimetylaminoetanol, A<sub>2</sub>C, farnesol, lidokain, ropivacain, bupivacain og mepivacain.
- 25 24. Bioaktivt middel ifølge punkt 16, der nevnte Hsp70-induserer eller ko-induserer er valgt fra gruppen som består av Edelfosin (ET-18-OCH<sub>3</sub> eller 1-oktadecyl-2-metyl-rac-glysero-3-fosfokoloin), celecoxib, rofecoxib, acetylsalisylsyre, natriumsalisylat, indometacin, PGA1, PGj2, 2-syklopenten-1-on, peroksidaseprolifatoraktivert reseptor-gamma-agonister, vincristin, paclitaxel,
- 30 pioglitazon, carboplatin, doxorubicin, fludarabin, ifosfamid, cytarabin, geldanamycin, 17-AAG, 17-DMAG, radicilol, herbimycin-A, arakidonsyre, MG132, laktacystin, DCIC, TLCK, TPCK, geranylgeranylacetone (GGA), rebamipid, karbenoxolon, polaprezinc (sink L-carnosin), deksametason, kokain, nikotin, alkohol, alfa-adrenerge agonister, syklopentenon-prostanoider, paeoniflorin,
- 35 glycyrrhizin, celastrol, dihydrocelastrol, dihydrocelastrol-diacetat og curcumin.
25. Bioaktivt middel ifølge punkt 1, der nevnte bioaktive middel er ikke-dødelig varmeterapi.

26. Bioaktivt middel ifølge punkt 25, der nevnte ikke-dødelige varmeterapi omfatter å øke temperaturen i et individ til en kjernetemperatur på omtrent 38 °C, slik som omtrent 39 °C, f.eks. omtrent 40 °C, slik som omtrent 41 °C, f.eks. omtrent 42 °C, slik som omtrent 43 °C.
- 5 27. Bioaktivt middel ifølge punkt 1, der nevnte bioaktive middel omfatter en kombinasjon av Hsp70, elelr et funksjonelt fragment eller variant derav, og en Hsp70-induserer eller ko-induserer.
28. Bioaktivt middel ifølge punkt 1, der nevnte bioaktive middel omfatter en kombinasjon av Hsp70, elelr et funksjonelt fragment eller variant derav, og et stoff  
10 som øker interaksjonen mellom Hsp70 og BMP.
29. Bioaktivt middel ifølge punkt 1, dr nevnte behandling er profylaktisk, kurerende eller lindrende.
30. Bioaktivt middel ifølge punkt 1, der nevnte lysosomale lagringsforstyrrelse er valgt fra gruppen som ebstår av forstyrrelsene Niemann-Pick, Farber, Krabbe,  
15 Gaucher, Fabry, sialidose, metakromatisk leukodystrofi og saposin-mangel.
31. Bioaktivt middel ifølge punkt 1, der nevnte bioaktive middel blir administrert til et individ med behov derav parenteralt.
32. Bioaktivt middel ifølge punkt 31, der nevnte patenterale administrering er en intravenøs, subkutan, intramuskulær, intraarteriell, subkutan eller intraperitoneal  
20 injeksjon.
33. Bioaktivt middel ifølge punkt 31, der nevnte parenterale administrering er en intravenøs infusjon.
34. Bioaktivt middel ifølge punkt 33, der nevnte intravenøse infusjon forekommer over en tidsperiode på fra 10 minutter til 20 minutter, slik som 20 til 30 minutter,  
25 f.eks. 30 til 40 minutter, slik som 40 til 50 minutter, f.eks. 50 til 60 minutter, slik som 60 til 90 minutter, f.eks. 90 til 120 minutter, slik som 2 timer til 3 timer, f.eks. 3 til 4 timer, slik som 4 til 5 timer, f.eks. 5 til 6 timer, slik som 6 til 7 timer, f.eks. 7 til 8 timer.
35. Bioaktivt middel ifølge punkt 31, der nevnte parenterale administrering er en  
30 transmukosal levering.
36. Bioaktivt middel ifølge punkt 35, der nevnte transmukosale levering er en sublingual levering.
37. Bioaktivt middel ifølge punkt 35, der nevnte transmukosale levering er en buccal levering.
- 35 38. Bioaktivt middel ifølge punkt 35, der nevnte transmukosale levering er insuflering.

39. Bioaktivt middel ifølge punkt 35, der nevnte transmukosale levering er en intranasal levering.
40. Hsp70, eller et funksjonelt fragment eller variant derav, for anvendelse som et medikament.
- 5 41. Fremgangsmåte for modulering av den enzymatiske aktiviteten til et enzym, der nevnte enzym interagerer med BMP (bis(monoacylglysero)fosfat), der nevnte fremgangsmåte omfatter trinnene
- i) administrere det bioaktive middelet ifølge punkt 1 til 39,
  - ii) tillate interaksjon mellom BMP og Hsp70, og
  - 10 iii) moduler den enzymatiske aktiviteten til et enzym som interagerer med BMP.
42. Fremgangsmåte ifølge punkt 41, der nevnte Hsp70 danner et kovalent eller ikke-kovalent kompleks med BMP.
43. Fremgangsmåte ifølge punkt 41, der BMP interagerer med saposin.
- 15 44. Fremgangsmåte ifølge punkt 43, der nevnte saposin er valgt fra gruppen som består av saposin A, saposin B, saposin C og saposin D.
45. Fremgangsmåte ifølge punkt 41, der nevnte enzym er valgt fra gruppen som består av sfingomyelinase, sur sfingomyelinase (aSMase), sur ceremidase, beta-galaktosylceremidase, alfa-galaktosidase, beta-galaktosidase, glukosylceremidase, 20 sialidase og arylsulfatase.
46. Fremgangsmåte ifølge punkt 41, der moduleringen av den enzymatiske aktiviteten er en økning i den enzymatiske aktiviteten.
47. Fremgangsmåte ifølge punkt 46, der nevnte økning i den enzymatiske aktiviteten er en økning i området på 1 til 5 %, slik som i området på 5 til 10 %, 25 f.eks. i området på 10 til 15 %, slik som i området 15 til 20 %, f.eks. i området 20 til 25 %, slik som i området 25 til 30 %, f.eks. i området 30 til 35 %, slik som i området 35 til 40 %, f.eks. i området 40 til 45 %, slik som i området 45 til 50 %, f.eks. i området 50 til 60 %, slik som i området 60 til 70 %, f.eks. i området 70 til 80 %, slik som i området 80 til 90 %, f.eks. i området 90 til 100 %, slik som i 30 området 100 til 120 %, f.eks. i området 120 til 140 %, slik som i området 140 til 160 %, f.eks. i området 160 til 180 %, slik som i området 180 til 200 %, f.eks. i området 200 til 250 %, slik som i området 250 til 300 %, f.eks. i området 300 til 400 %, slik som i området 400 til 500 %, f.eks. i området 500 til 750 %, slik som i området 750 til 1000 %, f.eks. i området 1000 til 1500 %, slik som i området 1500 35 til 2000 %, f.eks. i området 2000 til 5000 %.

48. Fremgangsmåte for behandling av en lysosomal lagringssykdom omfattende administrering av det bioaktive middelet ifølge ethvert av punktene 1 til 39 til et individ med behov derav.
- 5 49. Fremgangsmåte ifølge punkt 48, der nevnte behandling er profylaktisk, kurerende eller lindrende.
50. Fremgangsmåte ifølge punkt 48, der nevnte behandling forlenger levetidsforventningen til nevnte individ med behov derav.
- 10 51. Fremgangsmåte ifølge punkt 48, der nevnte levetidsforventning blir økt med mellom 6 måneder til 1 år, slik som fra 1 til 2 år, f.eks. fra 2 til 3 år, slik som fra 3 til 4 år, f.eks. fra 4 til 5 år, slik som fra 5 til 6 år, f.eks. fra 6 til 7 år, slik som fra 7 til 8 år, f.eks. fra 8 til 9 år, slik som fra 9 til 10 år, f.eks. fra 10 til 12 år, slik som fra 12 til 14 år, f.eks. fra 14 til 16 år, slik som fra 16 til 18 år, f.eks. fra 18 til 20 år, slik som fra 20 til 25 år, f.eks. fra 25 til 30 år, slik som fra 30 til 40 år, f.eks. fra 40 til 50 år, slik som fra 50 til 60 år, f.eks. fra 60 til 70 år, slik som fra 70 til 80 år, f.eks. fra 80 til 90 år, slik som fra 90 til 100 år.
- 15 52. Fremgangsmåte ifølge punkt 48, der nevnte lysosomale lagringssykdom er valgt fra gruppen som består av Niemann-Pick, Farber, Krabbe, Gaucher, Fabry, sialidose, metakromatisk leukodystrofi og saposin-mangel.
- 20 53. Fremgangsmåte ifølge punkt 48, der nevnte lysosomale sykdom er kjennetegnet ved en økt intracellulær akkumulering av et sfingolipid.
- 25 54. Fremgangsmåte ifølge punkt 53, der behandling reduserer den intracellulære akkumuleringen av et sfingolipid med minst 5 %, slik som minst 10 %, f.eks. minst 15 %, slik som minst 20 %, f.eks. minst 25 %, slik som minst 30 %, f.eks. minst 35 %, slik som minst 40 %, f.eks. minst 45 %, slik som minst 50 %, f.eks. minst 55 %, slik som minst 60 %, f.eks. minst 65 %, slik som minst 70 %, f.eks. minst 75 %, slik som minst 80 %, f.eks. minst 85 %, slik som minst 90 %, f.eks. minst 95 %, slik som minst 100 %.
- 30 55. Fremgangsmåte ifølge punkt 54, der nevnte sfingolipid er valgt fra gruppen bestående av sfingomyelin, veramid, galaktosylceramid, globotriaosylceramid, glykosylceramid, GM3 og sulfatid.
56. Fremgangsmåte ifølge punkt 48, der nevnte bioaktive middel er formulert som en farmasøytisk sammensetning.
- 35 57. Bioaktivt middel ifølge punkt 1 eller fremgangsmåte ifølge punkt 48, der nevnte lysosomale lagringsforstyrrelse er Niemann-Pick sykdom type A eller type B,
58. Bioaktivt middel ifølge punkt 1 eller fremgangsmåte ifølge punkt 48, der nevnte lysosomale lagringsforstyrrelse er Farber-sykdom.
59. Bioaktivt middel ifølge punkt 1 eller fremgangsmåte ifølge punkt 48, der nevnte lysosomale lagringsforstyrrelse er Krabbe-sykdom.

60. Bioaktivt middel ifølge punkt 1 eller fremgangsmåte ifølge punkt 48, der nevnte lysosomale lagringsforstyrrelse er sialidose.
61. Bioaktivt middel ifølge punkt 1 eller fremgangsmåte ifølge punkt 48, der nevnte lysosomale lagringsforstyrrelse er metakromatisk leukodystrofi.
- 5 62. Bioaktivt middel ifølge punkt 1 eller fremgangsmåte ifølge punkt 48, der nevnte lysosomale lagringsforstyrrelse er Gaucher-sykdom.
63. Bioaktivt middel ifølge punkt 1 eller fremgangsmåte ifølge punkt 48, der nevnte lysosomale lagringsforstyrrelse er Fabry-sykdom.
64. Bioaktivt middel ifølge punkt 1 eller fremgangsmåte ifølge punkt 48, der nevnte lysosomale lagringsforstyrrelse er saposin-mangel.
- 10
65. Bioaktivt middel ifølge punkt 1 eller fremgangsmåte ifølge punkt 48, der nevnte lysosomale lagringsforstyrrelse er kjennetegnet ved å ha enzymatisk restaktivitet av det defekte enzymet involvert i sykdomspatologien.
66. Bioaktivt middel ifølge punkt 1 eller fremgangsmåte ifølge punkt 48, der nevnte enzymatiske restaktivitet er i området fra 0,1 % til 50 %, slik som 0,1 til 1 %, slik som 1 til 2 %, slik som 2 til 3 %, f.eks. 3 til 4 %, slik som 4 til 5 %, f.eks. 5 til 6 %, slik som 6 til 7 %, f.eks. 7 til 8 %, slik som 8 til 9 %, f.eks. 9 til 10 %, slik som 10 til 11 %, f.eks. 11 til 12 %, slik som 12 til 13 %, f.eks. 13 til 14 %, slik som 14 til 15 %, f.eks. 15 til 20 %, slik som 20 til 25 %, f.eks. 25 til 30 %, slik som 30 til 35 %, f.eks. 35 til 40 %, slik som 40 til 45 %, f.eks. i området 45 til 50 % enzymatisk restaktivitet.
- 15
- 20
67. Fremgangsmåte for behandling av en lysosomal lagringssykdom omfattende administrering av det bioaktive middelet ifølge ethvert av punktene 1 til 39 i kombinasjon med minst én annen behandlingsmodalitet.
- 25
68. Fremgangsmåte ifølge punkt 67, der nevnte minst ene andre behandlingsmodalitet er en konvensjonell eller kjent behandlingsmodalitet for en lysosomal lagringssykdom.
69. Fremgangsmåte ifølge punkt 67, der nevnte minst ene andre behandlingsmodalitet blir administrert samtidig eller sekvensielt.
- 30
70. Fremgangsmåte ifølge punkt 67, der nevnte minst ene andre behandlingsmodalitet er enzymerstatningsterapi (ERT).
71. Fremgangsmåte ifølge punkt 70, der nevnte ERT er valgt fra gruppen som består av Cerezyme® (imiglucerase for injeksjon), Miglustat, Fabrazyme® (agalsidase-beta) og Replagal (Agalsidase-alfa).
- 35
72. Fremgangsmåte ifølge punkt 67, der nevnte bioaktive middel blir administrert til et individ med Gaucher-sykdom i kombinasjon med Cerezyme® (imiglucerase for injeksjon) eller Miglustat.

73. Fremgangsmåte ifølge punkt 67, der nevnte bioaktive middel blir administrert til et individ med Fabry-sykdom i kombinasjon med Fabrazyme® (agalsidase-beta) eller Replagal (Agalsidase-alfa).
- 5 74. Fremgangsmåte ifølge punkt 67, der nevnte minste ene andre behandlingsmodalitet er smertestillende midler.
75. Fremgangsmåte ifølge punkt 67, der nevnte minste ene andre behandlingsmodalitet er kortikosteroider.
76. Fremgangsmåte ifølge punkt 67, der nevnte minste ene andre behandlingsmodalitet er transplantasjon.
- 10 77. Fremgangsmåte ifølge punkt 67, der nevnte transplantasjon er valgt fra gruppen bestående av benmargtransplantasjon, navlestrengblodtransplantasjon og stamcelletransplantasjon.
78. Fremgangsmåte ifølge punkt 67, der nevnte minste ene andre behandlingsmodalitet er substratreduksjonsterapi.
- 15 79. Fremgangsmåte ifølge punkt 67, der nevnte minste ene andre behandlingsmodalitet er symptomatisk og støttende terapi, slik som fysisk terapi.

20

25

30

## Sekvensliste:

<110> Jensen, Thomas Kirkegaard  
Jaattela, Marja Helena

<120> Use of Hsp70 as a regulator of enzymatic activity

<130> P2146 PC00

<150> PA 2008 00885

<151> 2008-06-26

<160> 4

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 641

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 1

Met	Ala	Lys	Ala	Ala	Ala	Ile	Gly	Ile	Asp	Leu	Gly	Thr	Thr	Tyr	Ser
1				5					10					15	
Cys	Val	Gly	Val	Phe	Gln	His	Gly	Lys	Val	Glu	Ile	Ile	Ala	Asn	Asp
			20					25					30		
Gln	Gly	Asn	Arg	Thr	Thr	Pro	Ser	Tyr	Val	Ala	Phe	Thr	Asp	Thr	Glu
		35					40					45			
Arg	Leu	Ile	Gly	Asp	Ala	Ala	Lys	Asn	Gln	Val	Ala	Leu	Asn	Pro	Gln
	50					55					60				
Asn	Thr	Val	Phe	Asp	Ala	Lys	Arg	Leu	Ile	Gly	Arg	Lys	Phe	Gly	Asp
65					70					75					80
Pro	Val	Val	Gln	Ser	Asp	Met	Lys	His	Trp	Pro	Phe	Gln	Val	Ile	Asn
				85					90					95	
Asp	Gly	Asp	Lys	Pro	Lys	Val	Gln	Val	Ser	Tyr	Lys	Gly	Glu	Thr	Lys
			100				105						110		
Ala	Phe	Tyr	Pro	Glu	Glu	Ile	Ser	Ser	Met	Val	Leu	Thr	Lys	Met	Lys
		115					120					125			
Glu	Ile	Ala	Glu	Ala	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Pro	Val	Thr	Asn	Ala	Val	Ile
	130					135					140				
Thr	Val	Pro	Ala	Tyr	Phe	Asn	Asp	Ser	Gln	Arg	Gln	Ala	Thr	Lys	Asp
145					150					155					160
Ala	Gly	Val	Ile	Ala	Gly	Leu	Asn	Val	Leu	Arg	Ile	Ile	Asn	Glu	Pro
				165					170					175	
Thr	Ala	Ala	Ala	Ile	Ala	Tyr	Gly	Leu	Asp	Arg	Thr	Gly	Lys	Gly	Glu
			180					185					190		
Arg	Asn	Val	Leu	Ile	Phe	Asp	Leu	Gly	Gly	Gly	Thr	Phe	Asp	Val	Ser
	195						200					205			
Ile	Leu	Thr	Ile	Asp	Asp	Gly	Ile	Phe	Glu	Val	Lys	Ala	Thr	Ala	Gly
	210					215					220				
Asp	Thr	His	Leu	Gly	Gly	Glu	Asp	Phe	Asp	Asn	Arg	Leu	Val	Asn	His
225					230				235						240
Phe	Val	Glu	Glu	Phe	Lys	Arg	Lys	His	Lys	Lys	Asp	Ile	Ser	Gln	Asn
				245					250					255	
Lys	Arg	Ala	Val	Arg	Arg	Leu	Arg	Thr	Ala	Cys	Glu	Arg	Ala	Lys	Arg
			260					265					270		
Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Thr	Gln	Ala	Ser	Leu	Glu	Ile	Asp	Ser	Leu	Phe

	275					280					285					
Glu	Gly	Ile	Asp	Phe	Tyr	Thr	Ser	Ile	Thr	Arg	Ala	Arg	Phe	Glu	Glu	
	290					295					300					
Leu	Cys	Ser	Asp	Leu	Phe	Arg	Ser	Thr	Leu	Glu	Pro	Val	Glu	Lys	Ala	
305					310					315					320	
Leu	Arg	Asp	Ala	Lys	Leu	Asp	Lys	Ala	Gln	Ile	His	Asp	Leu	Val	Leu	
				325					330					335		
Val	Gly	Gly	Ser	Thr	Arg	Ile	Pro	Lys	Val	Gln	Lys	Leu	Leu	Gln	Asp	
			340					345						350		
Phe	Phe	Asn	Gly	Arg	Asp	Leu	Asn	Lys	Ser	Ile	Asn	Pro	Asp	Glu	Ala	
		355					360					365				
Val	Ala	Tyr	Gly	Ala	Ala	Val	Gln	Ala	Ala	Ile	Leu	Met	Gly	Asp	Lys	
	370					375					380					
Ser	Glu	Asn	Val	Gln	Asp	Leu	Leu	Leu	Leu	Asp	Val	Ala	Pro	Leu	Ser	
385					390					395					400	
Leu	Gly	Leu	Glu	Thr	Ala	Gly	Gly	Val	Met	Thr	Ala	Leu	Ile	Lys	Arg	
				405					410					415		
Asn	Ser	Thr	Ile	Pro	Thr	Lys	Gln	Thr	Gln	Ile	Phe	Thr	Thr	Tyr	Ser	
			420					425						430		
Asp	Asn	Gln	Pro	Gly	Val	Leu	Ile	Gln	Val	Tyr	Glu	Gly	Glu	Arg	Ala	
		435					440					445				
Met	Thr	Lys	Asp	Asn	Asn	Leu	Leu	Gly	Arg	Phe	Glu	Leu	Ser	Gly	Ile	
	450					455					460					
Pro	Pro	Ala	Pro	Arg	Gly	Val	Pro	Gln	Ile	Glu	Val	Thr	Phe	Asp	Ile	
465					470					475					480	
Asp	Ala	Asn	Gly	Ile	Leu	Asn	Val	Thr	Ala	Thr	Asp	Lys	Ser	Thr	Gly	
				485					490					495		
Lys	Ala	Asn	Lys	Ile	Thr	Ile	Thr	Asn	Asp	Lys	Gly	Arg	Leu	Ser	Lys	
			500					505					510			
Glu	Glu	Ile	Glu	Arg	Met	Val	Gln	Glu	Ala	Glu	Lys	Tyr	Lys	Ala	Glu	
		515					520					525				
Asp	Glu	Val	Gln	Arg	Glu	Arg	Val	Ser	Ala	Lys	Asn	Ala	Leu	Glu	Ser	
	530					535					540					
Tyr	Ala	Phe	Asn	Met	Lys	Ser	Ala	Val	Glu	Asp	Glu	Gly	Leu	Lys	Gly	
545					550					555					560	
Lys	Ile	Ser	Glu	Ala	Asp	Lys	Lys	Lys	Val	Leu	Asp	Lys	Cys	Gln	Glu	
				565					570					575		
Val	Ile	Ser	Trp	Leu	Asp	Ala	Asn	Thr	Leu	Ala	Glu	Lys	Asp	Glu	Phe	
			580					585					590			
Glu	His	Lys	Arg	Lys	Glu	Leu	Glu	Gln	Val	Cys	Asn	Pro	Ile	Ile	Ser	
		595					600					605				
Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Ala	Gly	Gly	Pro	Gly	Pro	Gly	Gly	Phe	Gly	Ala	
	610					615					620					
Gln	Gly	Pro	Lys	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Pro	Thr	Ile	Glu	Glu	Val	
625					630					635					640	
Asp																

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 2445

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo Sapiens

&lt;400&gt; 2

```

ataaaagccc aggggcaagc ggtccggata acggctagcc tgaggagctg ctgcgacagt 60
ccactacctt tttcgagagt gactcccgtt gtcccaagc ttcccagagc gaacctgtgc 120
ggctgcaggc accggcgcgt cgagtttccg gcgtccgaa ggaccgagct cttctcgcgg 180
atccagtgtt ccgtttccag ccccaatct cagagcggag ccgacagaga gcaggaacc 240

```



```

ggcatggcca aagccgcggc gatcggcatc gacctgggca ccacctactc ctgctgtggg 300
gtgttccaac acggcaaggt ggagatcadc gccaacgacc agggcaaccg caccaccccc 360
agctacgtgg ccttcacgga caccgagcgg ctcatcgggg atgctggcaa gaaccaggtg 420
gctgtgaacc cgcagaacac cgtgtttgac gccaagcggc tgattggccg caagtccggc 480
gacccggtgg tgcagtcgga catgaagcac tggcctttcc aggtgatcaa cgacggagac 540
aagcccaagg tgcaggtgag ctacaagggg gagaccaagg cattctaccg cgaggagatc 600
tcgtccatgg tgctgaccaa gatgaaggag atcgccgagg cgtacctggg ctaccgggtg 660
accaacgctg tgatcacctg gccggcctac ttcaacgact cgcagcgcca ggccaccaag 720
gatgctgggt tgatcggggg gctcaacgtg ctgctggatc tcaacgagcc cacggccgcc 780
gccatgcctc acggcctgga cagaacgggc aaggggggag gcaacgtgct catctttgac 840
ctgggctggg gcaccttcga cgtgtccatc ctgacgatcg acgacggcat cttcggaggtg 900
aaggccacgg ccggggacac ccacctgggt ggggaggact ttgacaacag gctgtgtaac 960
cacttcgtgg aggagttcaa gagaaaacac aagaaggaca tcagccagaa caagcgagcc 1020
gtgaggcggc tgcgcaccgc ctgctgaggg gccaaagagg ccctgtcgtc cagcaccag 1080
gccagcctgg agatcgactc cctgtttgag ggcatcgact tctacacgtc catcaccagg 1140
gctgtgctgg aggagctgtg ctccgacctg ttccgaagca ccctggagcc cgtggagaag 1200
gctctgcgag acgccaagct ggacaaggcc cagattcacg acctggtcct ggtcgggggc 1260
tccaccggca tcccccaagg gcagaagctg ctgcaggact tcttcaacgg gcgctgacct 1320
aacaagagca tcaaccccgga cgaggctgtg gcctacgggg cggcgggtga ggccggccat 1380
ctgatggggg acaagtccga gaactgtgag gacctgtgct tgctggagct ggctcccctg 1440
tcgctggggc tggagcggc cggagcgtg atgactgcc tgatcaagcg caactccacc 1500
atccccacca agcagacgca gatcttcacc acctactccg acaaccaacc cggggtgctg 1560
atccagggtg acgagggcga gagggccatg acgaaagaca acaatctgtt gggcgcttc 1620
gagctgagcg gcatccctcc ggccccagg ggcgtgcccc agatcgaggt gaccttcgac 1680
atcgatgcca acggcatcct gaactgcacg gccacggaca agagcaccgg caaggccaac 1740
aagatcacca tcaaccaacga caagggccgc ctgagcaagg aggagatcga gcgcatggtg 1800
caggagggcg agaagtacaa agcggaggac gagggtgcag gcgagagggt gtcagccaag 1860
aacgccctgg agtcctacgc cttcaacatg aagagcggcg tggaggatga ggggtcaag 1920
ggcaagatca gcgagggcga caagaagaag gtgctggaca agtgtcaaga ggtcatctcg 1980
tggctggagc ccaacacctt ggccgagaag gacgagttg agcacaagag gaaggagctg 2040
gagcaggtgt gtaaccccat catcagcggg ctgtaccagg gtgcccgttg tcccgggct 2100
gggggcttcg gggctcaggg tcccaggga gggctctggg caggccccac cattgaggag 2160
gtagattagg ggcctttcca agattgctgt tttgttttg gagcttcaag actttgcatt 2220
tcctagtatt tctgtttgtc agttctcaat ttctgtgtt tgcaatgtt aaatttttg 2280
gtgaagtact gaacttgctt ttttccggg ttctacatgc agagatgaat ttatactgcc 2340
atcttacgac tatttcttct ttttaataca cttaactcag gccattttt aagttggtta 2400
cttcaagta aataaacttt aaaattcaaa aaaaaaaaa aaaaa 2445

```

<210> 3

<211> 641

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 3

```

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

```

		115					120					125			
Glu	Ile	Ala	Glu	Ala	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Pro	Val	Thr	Asn	Ala	Val	Ile
	130						135					140			
Thr	Val	Pro	Ala	Tyr	Phe	Asn	Asp	Ser	Gln	Arg	Gln	Ala	Thr	Lys	Asp
145					150					155					160
Ala	Gly	Val	Ile	Ala	Gly	Leu	Asn	Val	Leu	Arg	Ile	Ile	Asn	Glu	Pro
				165					170					175	
Thr	Ala	Ala	Ala	Ile	Ala	Tyr	Gly	Leu	Asp	Arg	Thr	Gly	Lys	Gly	Glu
			180					185					190		
Arg	Asn	Val	Leu	Ile	Phe	Asp	Leu	Gly	Gly	Gly	Thr	Phe	Asp	Val	Ser
	195						200					205			
Ile	Leu	Thr	Ile	Asp	Asp	Gly	Ile	Phe	Glu	Val	Lys	Ala	Thr	Ala	Gly
	210					215					220				
Asp	Thr	His	Leu	Gly	Gly	Glu	Asp	Phe	Asp	Asn	Arg	Leu	Val	Asn	His
225					230					235					240
Phe	Val	Glu	Glu	Phe	Lys	Arg	Lys	His	Lys	Lys	Asp	Ile	Ser	Gln	Asn
				245					250					255	
Lys	Arg	Ala	Val	Arg	Arg	Leu	Arg	Thr	Ala	Cys	Glu	Arg	Ala	Lys	Arg
		260						265					270		
Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Thr	Gln	Ala	Ser	Leu	Glu	Ile	Asp	Ser	Leu	Phe
		275					280					285			
Glu	Gly	Ile	Asp	Phe	Tyr	Thr	Ser	Ile	Thr	Arg	Ala	Arg	Phe	Glu	Glu
	290					295				300					
Leu	Cys	Ser	Asp	Leu	Phe	Arg	Ser	Thr	Leu	Glu	Pro	Val	Glu	Lys	Ala
305					310					315					320
Leu	Arg	Asp	Ala	Lys	Leu	Asp	Lys	Ala	Gln	Ile	His	Asp	Leu	Val	Leu
				325					330					335	
Val	Gly	Gly	Ser	Thr	Arg	Ile	Pro	Lys	Val	Gln	Lys	Leu	Leu	Gln	Asp
			340					345					350		
Phe	Phe	Asn	Gly	Arg	Asp	Leu	Asn	Lys	Ser	Ile	Asn	Pro	Asp	Glu	Ala
		355					360					365			
Val	Ala	Tyr	Gly	Ala	Ala	Val	Gln	Ala	Ala	Ile	Leu	Met	Gly	Asp	Lys
	370					375					380				
Ser	Glu	Asn	Val	Gln	Asp	Leu	Leu	Leu	Leu	Asp	Val	Ala	Pro	Leu	Ser
385					390					395					400
Leu	Gly	Leu	Glu	Thr	Ala	Gly	Gly	Val	Met	Thr	Ala	Leu	Ile	Lys	Arg
				405					410					415	
Asn	Ser	Thr	Ile	Pro	Thr	Lys	Gln	Thr	Gln	Ile	Phe	Thr	Thr	Tyr	Ser
			420					425					430		
Asp	Asn	Gln	Pro	Gly	Val	Leu	Ile	Gln	Val	Tyr	Glu	Gly	Glu	Arg	Ala
		435					440					445			
Met	Thr	Lys	Asp	Asn	Asn	Leu	Leu	Gly	Arg	Phe	Glu	Leu	Ser	Gly	Ile
	450					455					460				
Pro	Pro	Ala	Pro	Arg	Gly	Val	Pro	Gln	Ile	Glu	Val	Thr	Phe	Asp	Ile
465					470					475					480
Asp	Ala	Asn	Gly	Ile	Leu	Asn	Val	Thr	Ala	Thr	Asp	Lys	Ser	Thr	Gly
				485					490					495	
Lys	Ala	Asn	Lys	Ile	Thr	Ile	Thr	Asn	Asp	Lys	Gly	Arg	Leu	Ser	Lys
		500						505					510		
Glu	Glu	Ile	Glu	Arg	Met	Val	Gln	Glu	Ala	Glu	Lys	Tyr	Lys	Ala	Glu
		515					520					525			
Asp	Glu	Val	Gln	Arg	Glu	Arg	Val	Ser	Ala	Lys	Asn	Ala	Leu	Glu	Ser
	530					535					540				
Tyr	Ala	Phe	Asn	Met	Lys	Ser	Ala	Val	Glu	Asp	Glu	Gly	Leu	Lys	Gly
545					550					555					560
Lys	Ile	Ser	Glu	Ala	Asp	Lys	Lys	Lys	Val	Leu	Asp	Lys	Cys	Gln	Glu
				565					570					575	
Val	Ile	Ser	Trp	Leu	Asp	Ala	Asn	Thr	Leu	Ala	Glu	Lys	Asp	Glu	Phe
			580					585					590		

Glu His Lys Arg Lys Glu Leu Glu Gln Val Cys Asn Pro Ile Ile Ser  
 595 600 605  
 Gly Leu Tyr Gln Gly Ala Gly Gly Pro Gly Pro Gly Gly Phe Gly Ala  
 610 615 620  
 Gln Gly Pro Lys Gly Gly Ser Gly Ser Gly Pro Thr Ile Glu Glu Val  
 625 630 635 640  
 Asp

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 2551

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo Sapiens

&lt;400&gt; 4

```

ggaaaacggc cagcctgagg agctgctgcg agggctccgct tcgtctttcg agagtgactc 60
ccgcgggtccc aaggctttcc agagcgaacc tgtgcggctg caggcaccgg cgtggtgagt 120
ttccggcggtt ccgaaggact gagctcttgt cgcggatccc gtccgccggt tccagcccc 180
agtctcagag cggagcccac agagcagggc accggcatgg ccaaagccgc ggcgatcggc 240
atcgacctgg gcaccaccta ctctgctggt ggggtgttcc aacacggcaa ggtggagatc 300
atcgccaacg accagggcaa ccgcaccacc cccagctacg tggccttcac ggacaccgag 360
cggctcatcg gggatgcggc caagaaccag gtggcgctga acccgcagaa caccgtgttt 420
gcgcggaagc ggctgatcgg ccgcaagttc ggcgaccggc tggtgagtc ggacatgaag 480
cactggcctt tccaggtgat caacgacgga gacaagccca aggtgcaggt gagctacaag 540
ggggagacca aggcattcta ccccgaggag atctcgtcca tggctgtgac caagatgaag 600
gagatcgccg aggcgtacct gggctaccgg gtgaccaacg cggatgatcac cgtgccggcc 660
tacttcaacg actcgcagcg ccaggccacc aaggatgcgg gtgtgatcgc ggggctcaac 720
gtgctgcgga tcatcaacga gccacggcc gccgccatcg cctacggcct ggacagaacg 780
ggcaaggggg agcgcacacgt gctcatcttt gacctgggcg ggggcacctt cgacgtgtcc 840
atcctgacga tcgacgacgg catcttcgag gtgaaggcca cggccgggga caccacactg 900
ggtggggagg actttgacaa caggctggtg aaccacttcg tggaggagt caagagaaaa 960
cacaagaagg acatcagcca gaacaagcga gccgtgaggc ggctgcgcac cgcctgcgag 1020
aggccaaga ggacctgtc gtccagcacc caggccagcc tggagatcga ctccctgttt 1080
gagggcatcg acttctacac gtccatcacc agggcgaggt tcgaggagct gtgctccgac 1140
ctgttccgaa gcaccctgga gcccggtggag aaggctctgc gcgacgcaa gctggacaag 1200
gccagattc acgacctggt cctggctcggg ggctccacc gcatcccaa ggtgcagaag 1260
gtgctgcagg acttcttcaa cgggcgcgac ctgaacaaga gcatcaacc cggcagagct 1320
gtggcctacg gggcggcggg gcaggcgccc atcctgatgg gggacaagtc cgagaacgtg 1380
caggacctgc tgctgctgga cgtggctccc ctgtcgtctg ggctggagac ggccggaggc 1440
gtgatgactg ccctgatcaa gcgcaactcc accatcccca ccaagcagac gcagatcttc 1500
accacctact ccgacaacca acccggggtg ctgatccagg tgtacgaggg cgagagggcc 1560
atgacgaaag acaacaatct gttggggcgc ttcgagctga gcggcatccc tccggcccc 1620
agggcgctgc ccagatcga ggtgacctc gacatcgatg ccaacggcat cctgaacgtc 1680
acggccacgg acaagagcac cggcaaggcc aacaagatca ccatcaccia cgacaagggc 1740
cgctgagca aggaggagat cgagcgcgat gtgcaggagg cggagaagta caaagcggag 1800
gacgaggtgc agcgcgagag ggtgtcagcc aagaacgcc tggagtcta cgccttcaac 1860
atgaagagcg ccgtggagga tgaggggctc aagggaaga tcagcgaggc ggacaagaag 1920
aaggttctgg acaagtgtca agaggtcatc tcgtggctgg acgccaacac cttggccgag 1980
aaggacgagt ttgagcacia gaggaaggag ctggagcagg tgtgtaaccc catcatcagc 2040
ggactgtacc aggtgcggg tggctccggg cctggcggct tcggggctca gggccccaa 2100
ggaggtctg ggtcaggccc taccattgag gaggtgatt agggccttt gttctttagt 2160
atgttctct ctgaggtgga ctgttgggac tcaaggactt tgctgctgtt tctctatgtc 2220
atctctgctt cagctctttg ctgcttcaact tctttgtaaa gttgtaacct gatggttaatt 2280
agctggcttc attatTTTTg tagtacaacc gatatgttca ttagaattct ttgcatttaa 2340
tgttgatact gtaagggtgt ttcgttccct ttaaataaat caacactgcc accttctgta 2400
cgagtttgtt tgTTTTTTTT tTTTTTTTTT tTTTTTgctt ggcgaaaaca ctacaaaggc 2460
tgggaatgta tgTTTTtata atttgtttat ttaaataatga aaaataaaat gttaaacttt 2520
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a
2551

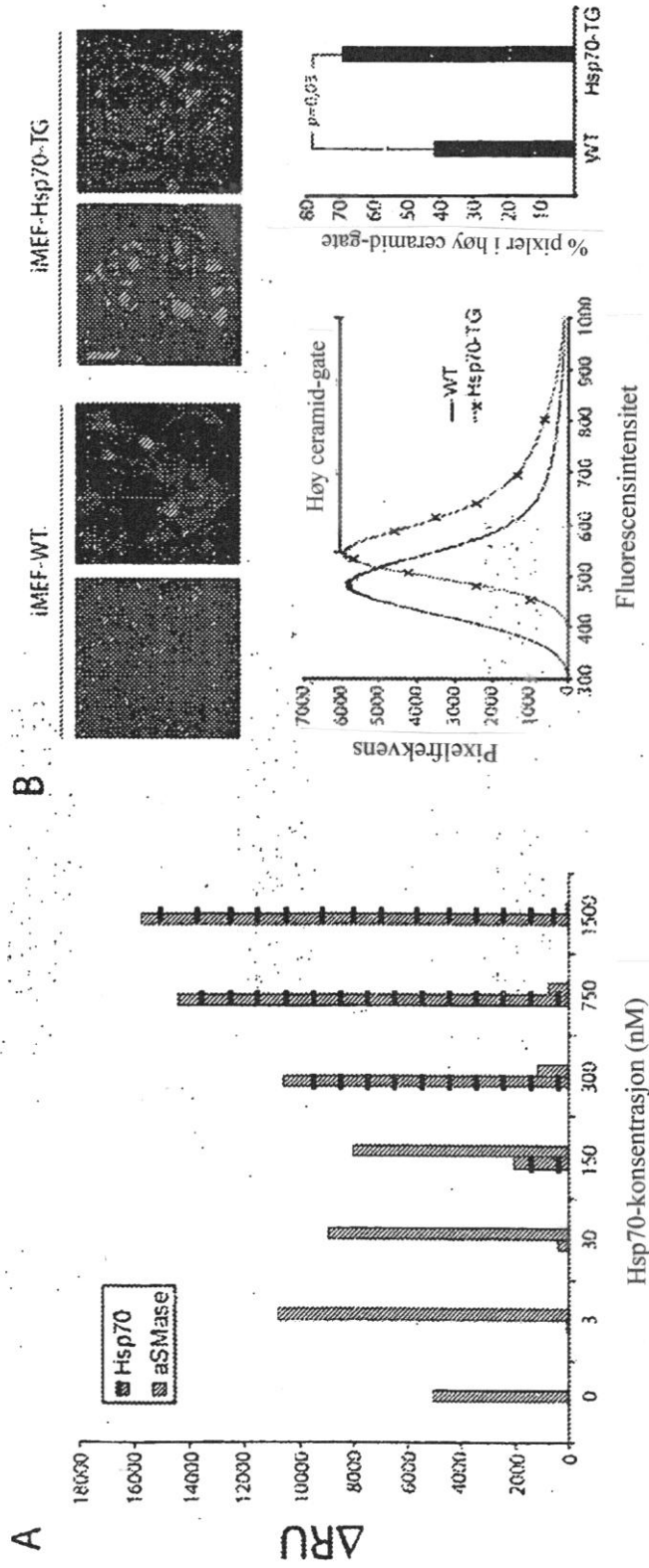
```

## PATENTKRAV

1. Bioaktivt middel som er et hydroksylaminderivat som er i stand til å øke den intracellulære konsentrasjonen av Hsp70 ved å amplifisere Hsp70-genuttrykking, 5  
der nevnte hydroksylaminderivat er bimoclomol (BRLP-42) eller en strukturell analog derav, arimoclomol, BRX-220, BRX-345 eller BGP-15, for anvendelse i behandlingen av en lysosomal lagringsforstyrrelse.
2. Bioaktivt middel ifølge krav 1, der nevnte bioaktive middel er i stand til å 10  
amplifisere Hsp70-genuttrykking med et samtidig stress.
3. Bioaktivt middel for anvendelse ifølge ethvert av de foregående krav, der nevnte hydroksylaminderivat er arimoclomol.
- 15 4. Bioaktivt middel for anvendelse ifølge ethvert av de foregående krav, der nevnte bioaktive middel er formulert som en farmasøytisk sammensetning som ytterligere omfatter en farmasøytisk akseptabel bærer.
- 20 5. Bioaktivt middel for anvendelse ifølge ethvert av de foregående krav, der nevnte behandling er profylaktisk, kurerende eller lindrende.
- 25 6. Bioaktivt middel for anvendelse ifølge ethvert av de foregående krav, der nevnte lysosomale lagringsforstyrrelse er valgt fra gruppen som består av Niemann-Pick sykdom, Farber-sykdom, Krabbe-sykdom, Fabry-sykdom, Gaucher-sykdom, Sialidose, Metakromatisk leukodystrofi og saposin-mangel.
- 30 7. Bioaktivt middel for anvendelse ifølge krav 6, der nevnte Niemann-Pick sykdom er valgt fra gruppen bestående av Niemann-Pick sykdom type A, Niemann-Pick sykdom type B, Niemann-Pick sykdom type C og Niemann-Pick sykdom type D.
8. Bioaktivt middel for anvendelse ifølge ethvert av kravene 1 til 5, der nevnte lysosomale lagringsforstyrrelse er en lipidlagringsforstyrrelse.

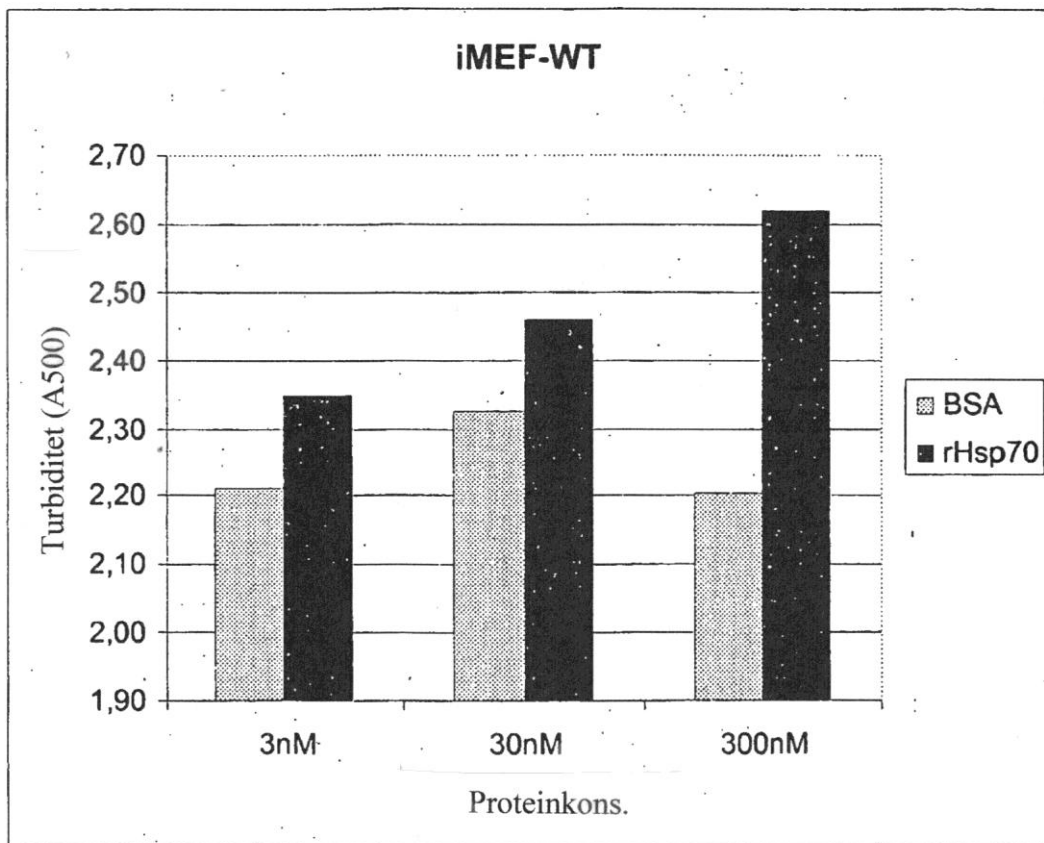
9. Bioaktivt middel for anvendelse ifølge krav 8, der nevnte lipidlagringsforstyrrelse er valgt fra gruppen som består av sfingolipidoser, gangliosidoser og leukodystrofier.
- 5 10. Bioaktivt middel for anvendelse ifølge ethvert av kravene 1 til 5, der nevnte lysosomale lagringsforstyrrelse er valgt fra gruppen som består av mukopolysakkaridoser, glykoproteinlagringsforstyrrelser og mukolipidoser.
- 10 11. Bioaktivt middel for anvendelse ifølge ethvert av de foregående krav, der nevnte bioaktive middel skal bli administrert i kombinasjon med minst én annen behandlingsmodalitet for en lysosomal lagringsforstyrrelse.
- 15 12. Bioaktivt middel for anvendelse ifølge krav 11, der nevnte minst ene andre behandlingsmodalitet for en lysosomal lagringsssykdom er enzymerstatningsterapi (ERT).
- 20 13. Bioaktivt middel for anvendelse ifølge krav 12, der nevnte enzymerstatningsterapi er valgt fra gruppen som består av imgluserase, Miglustat, agalsidase-beta og agalsidase-alfa.
- 25 14. Anvendelse av et bioaktivt middel som er et hydroksylaminderivat som er i stand til å øke den intracellulære konsentrasjonen av Hsp70 ved å amplifisere Hsp70-genuttrykking, der nevnte hydroksylaminderivat er bimoclomol (BRLP-42) eller en strukturell analog derav, arimoclomol, BRX-220, BRX-345 eller BGP-15, i fremstillingen av et medikament for behandlingen av en lysosomal lagringsforstyrrelse.

Figur 1



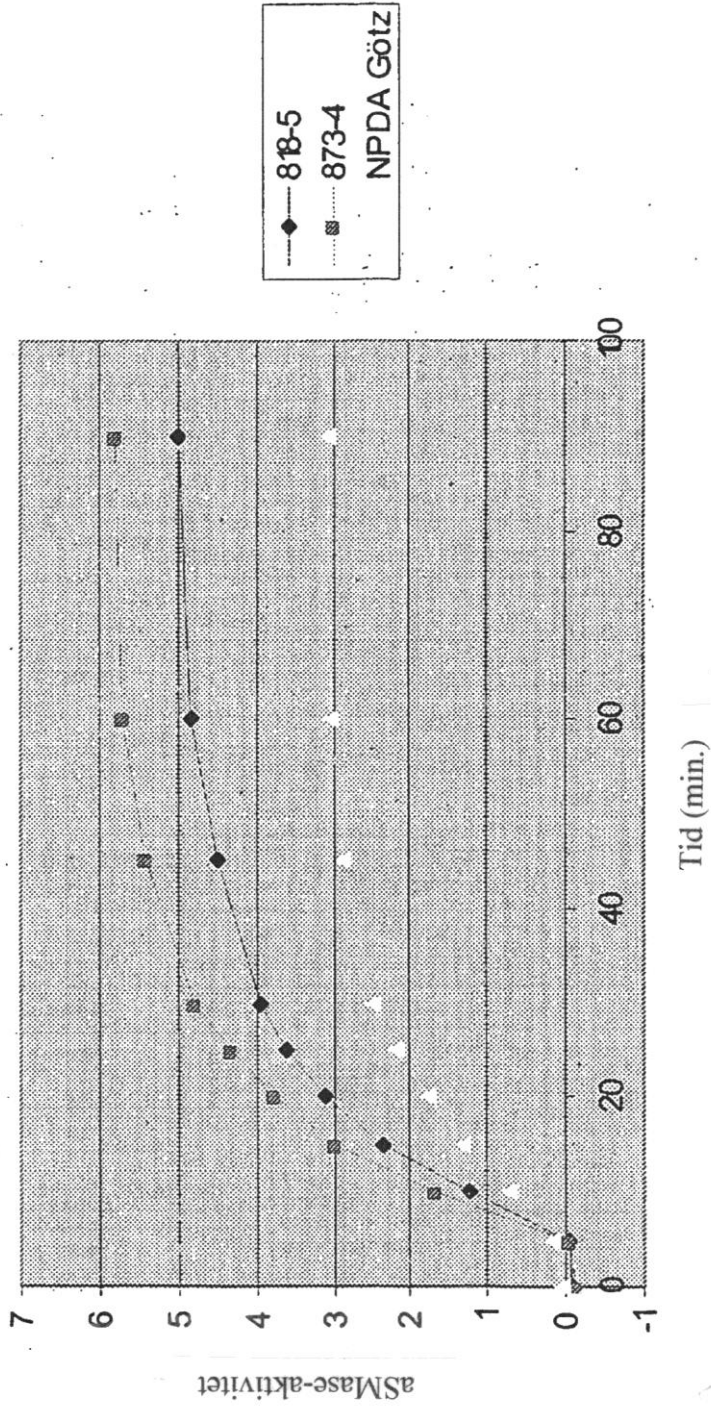
2/16

Figur 2



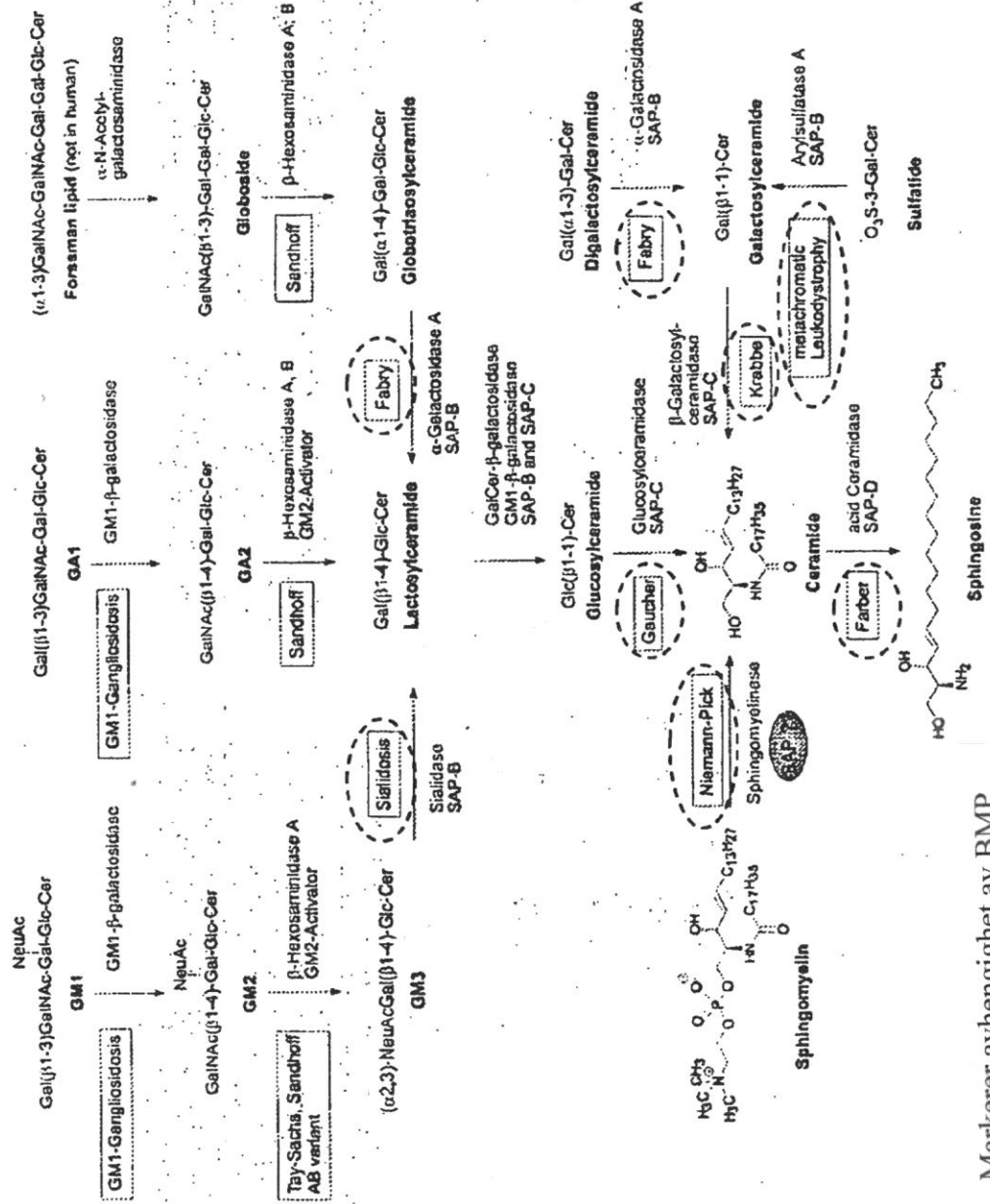
Figur 3

aSMase-aktivitet i ulike fibroblaster

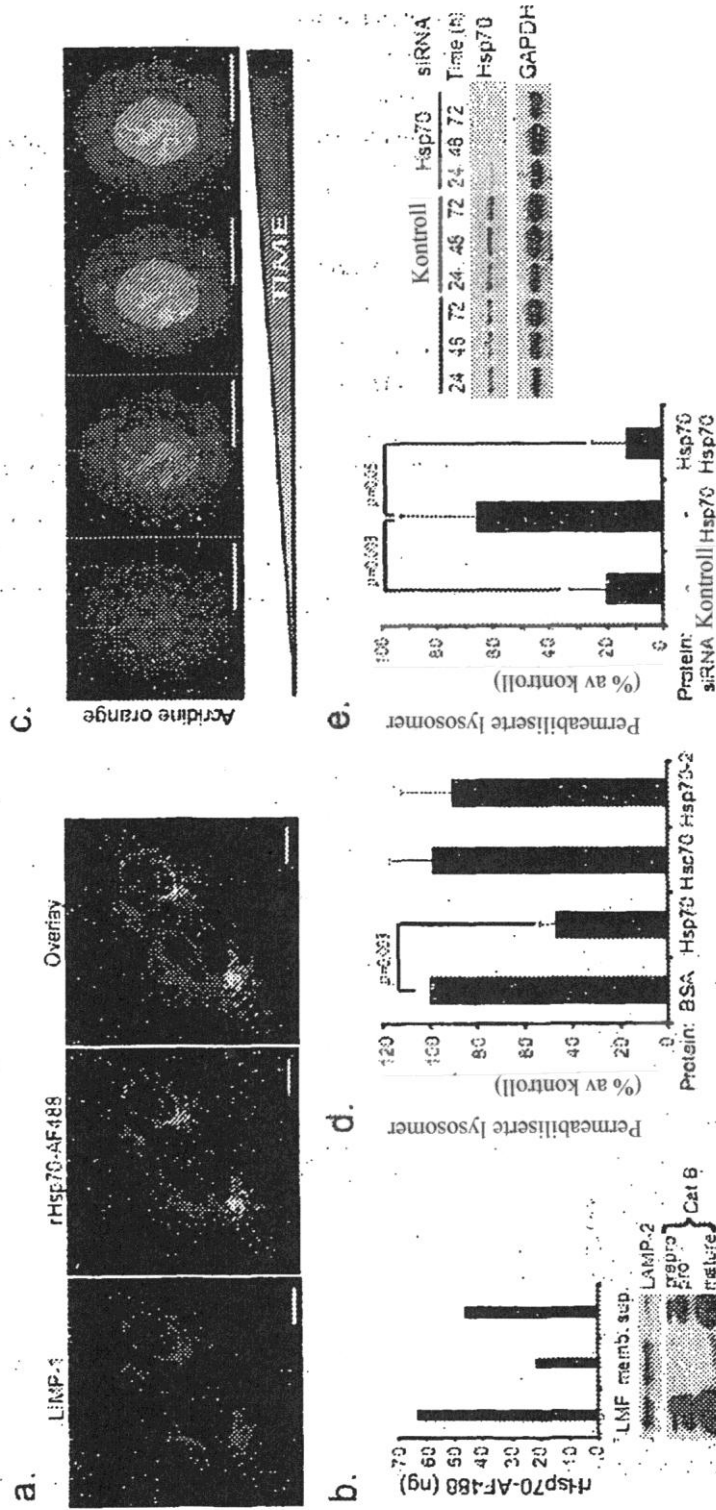




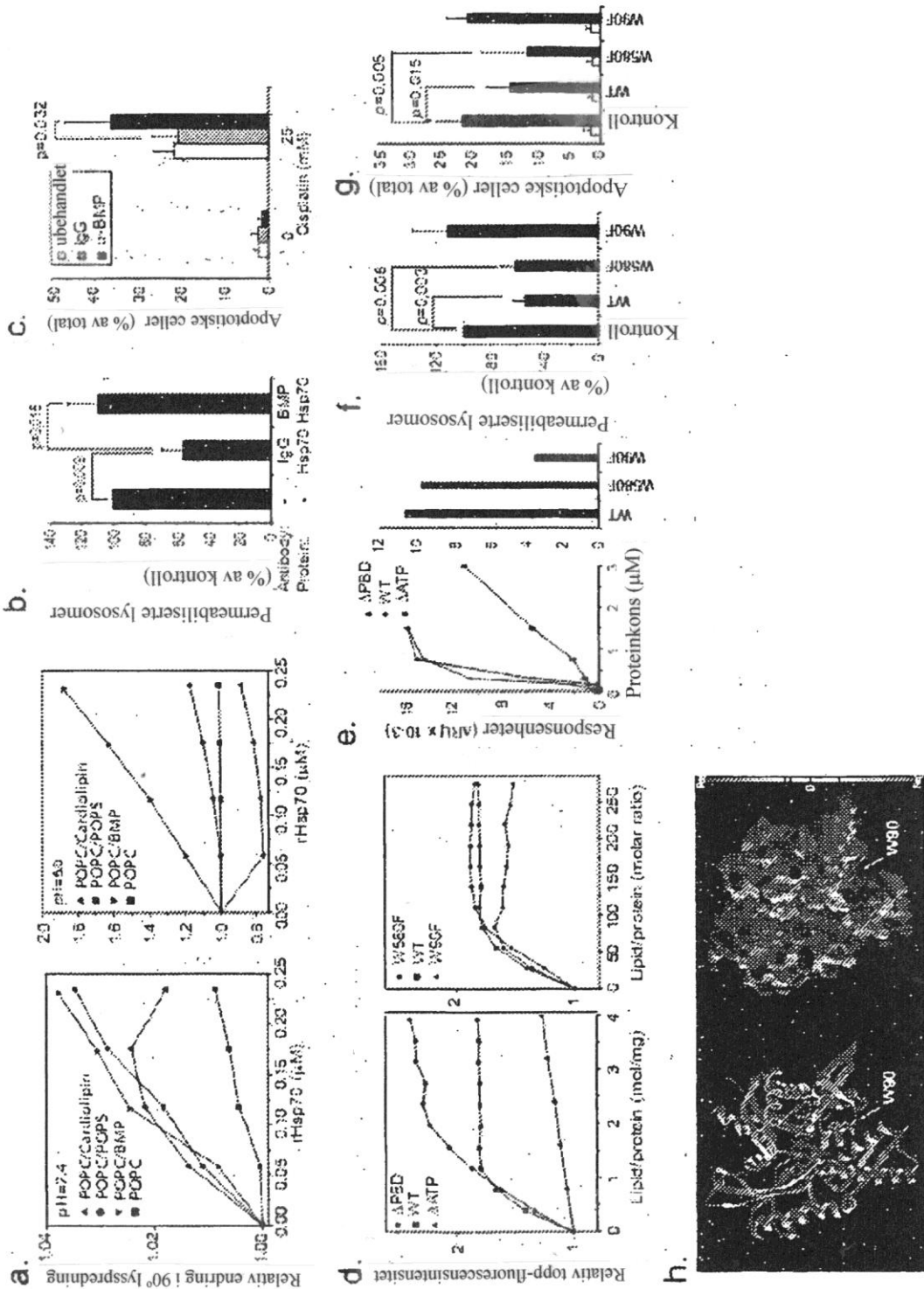
Figur 4



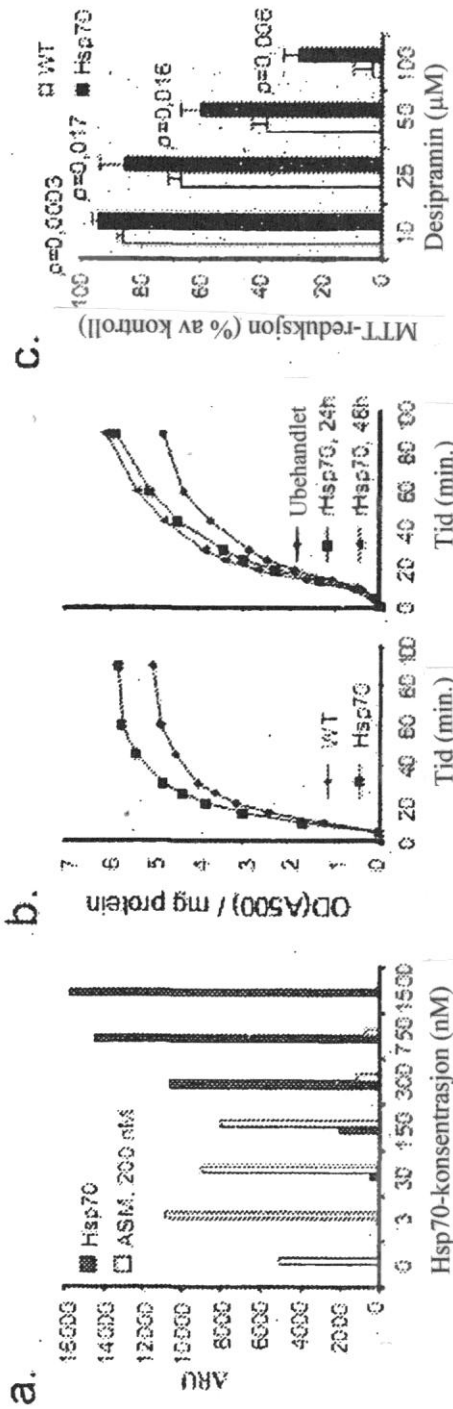
Figur 5



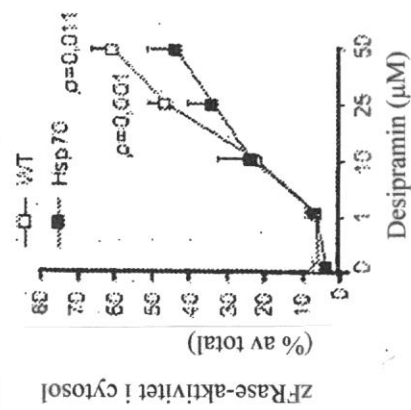
Figur 6



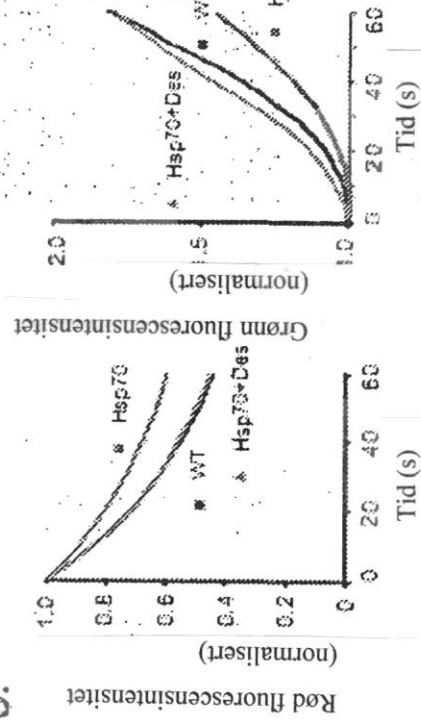
Figur 7



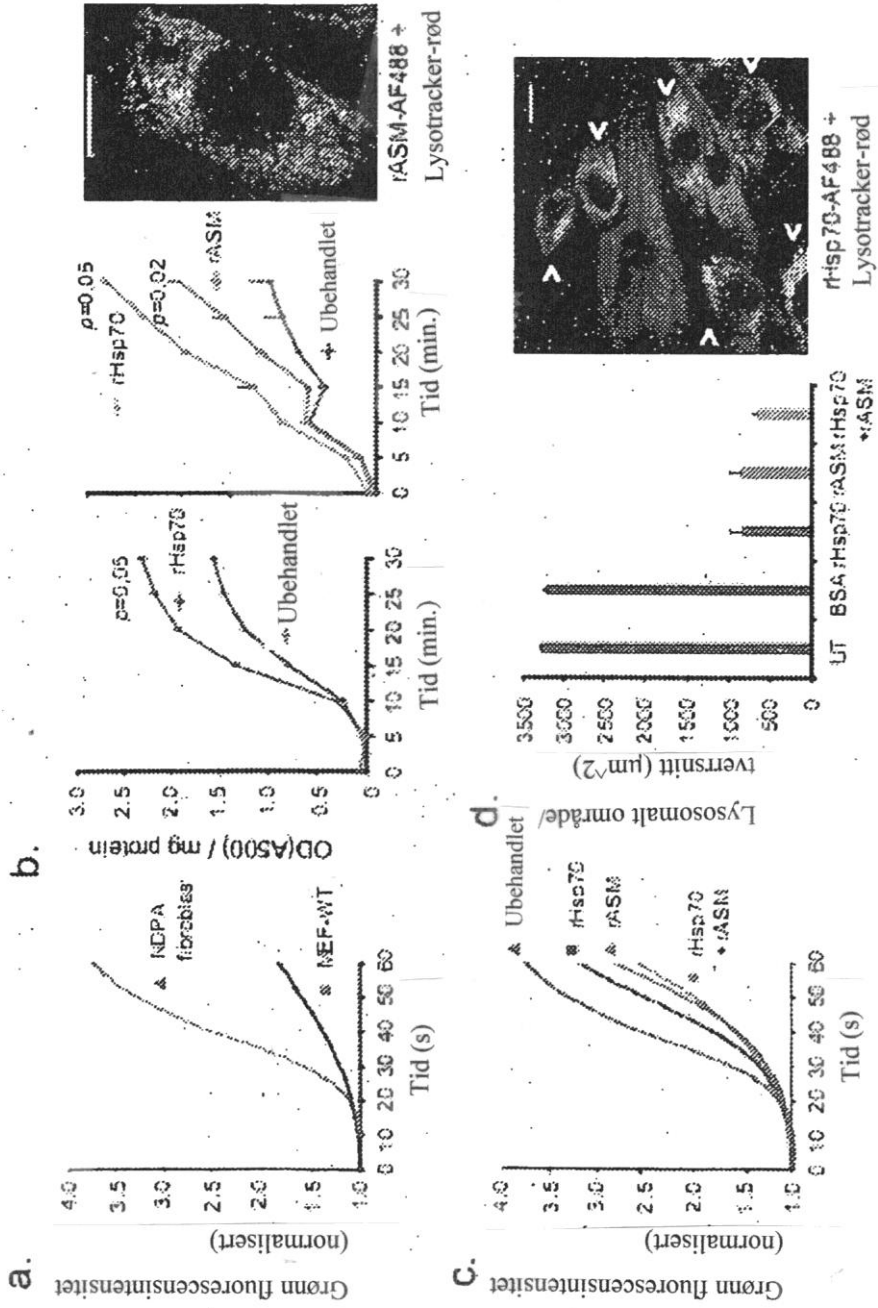
**d.**



**e.**

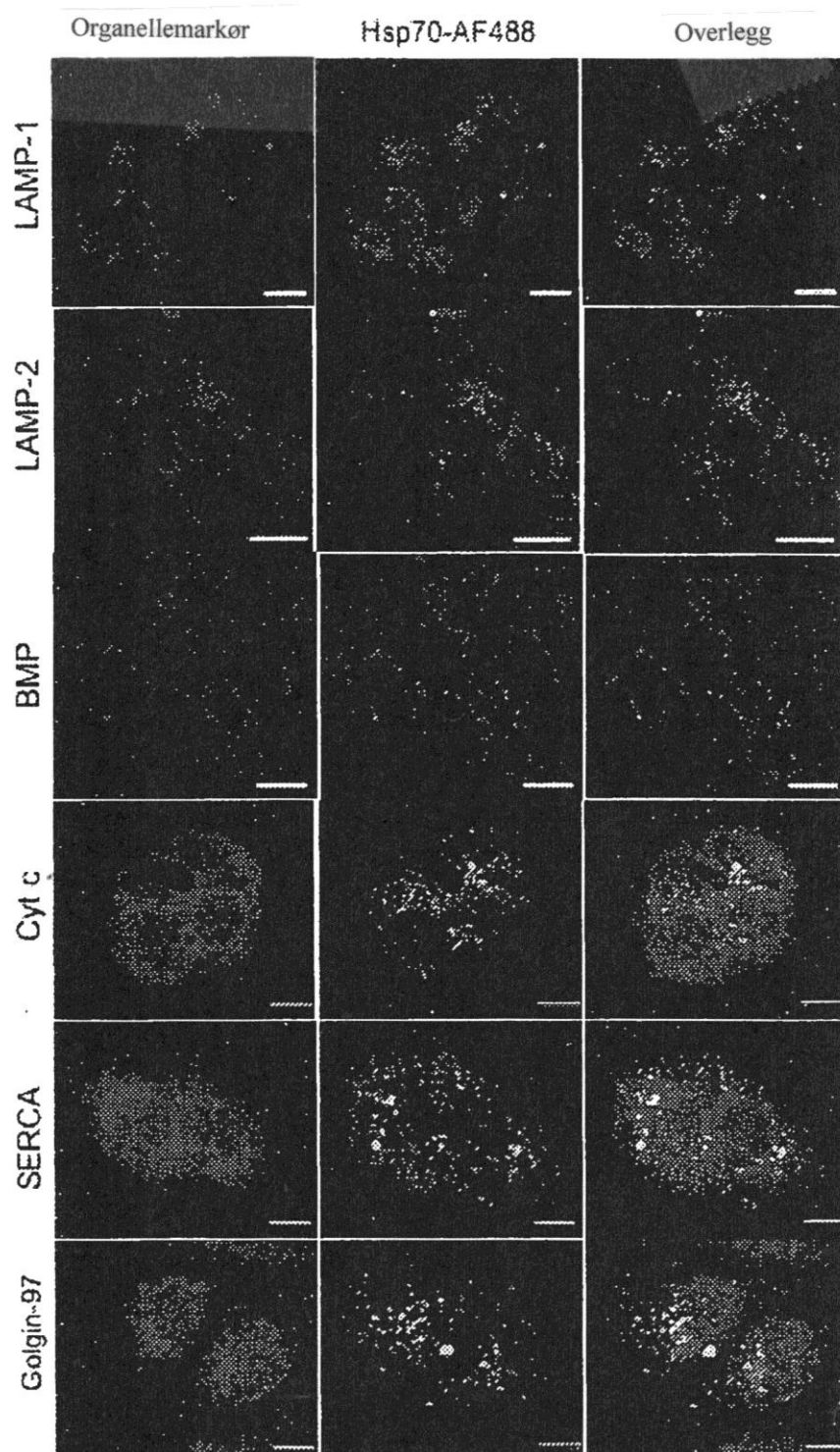


Figur 8



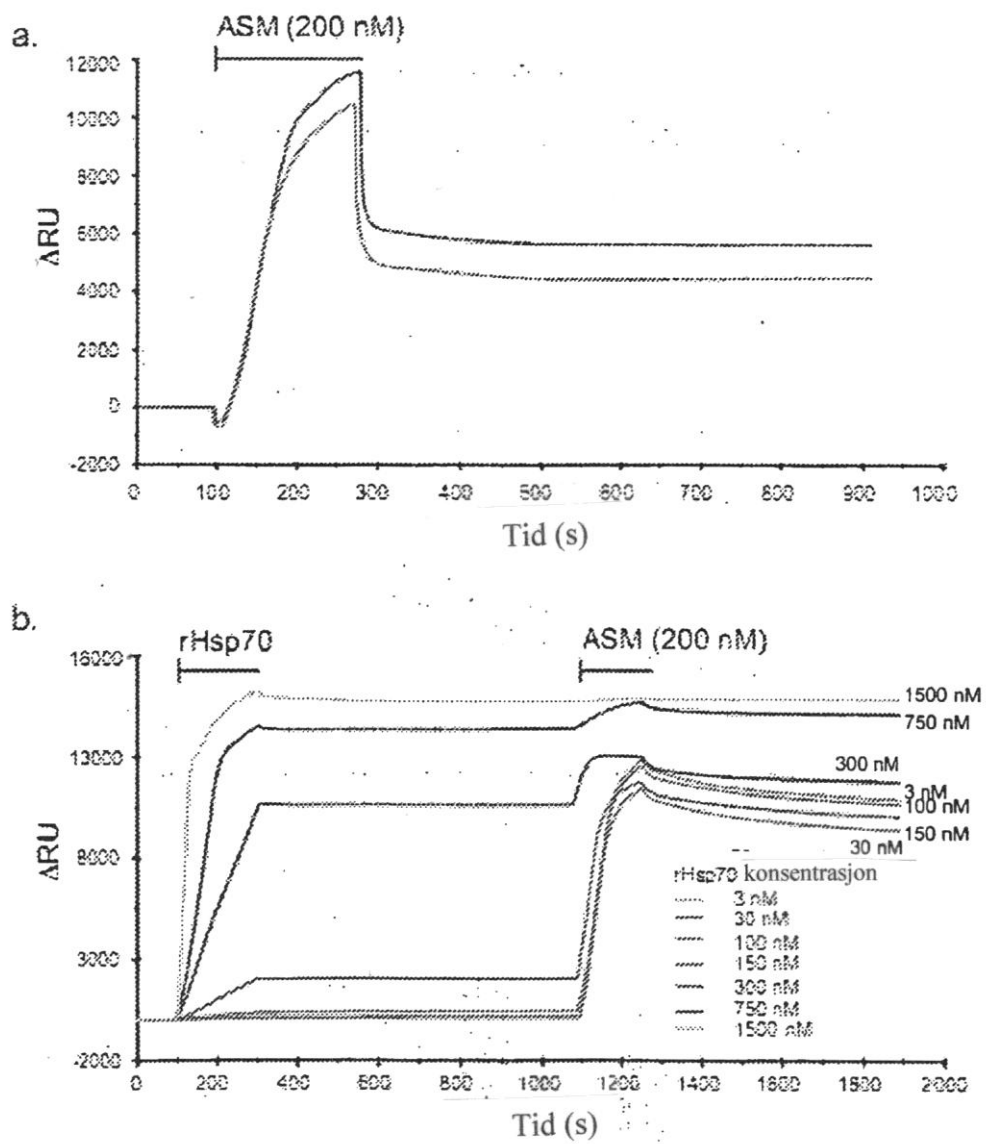
9/16

Figur 9



10/16

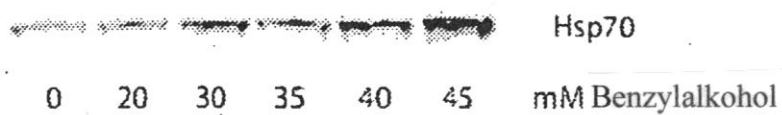
Figur 10



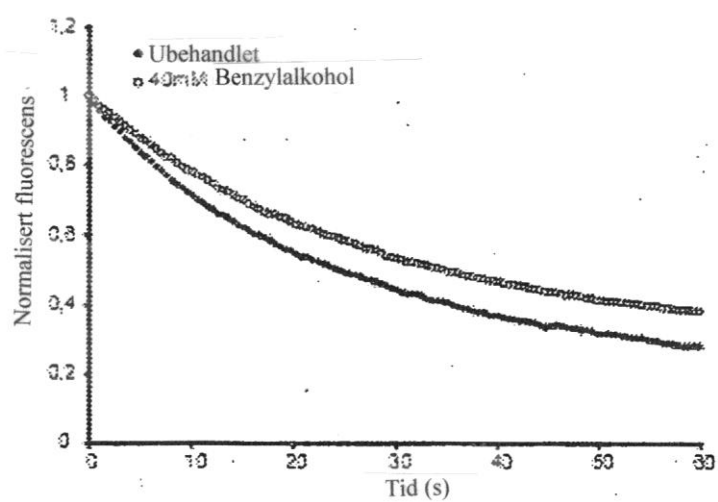
11/16

Figur 11

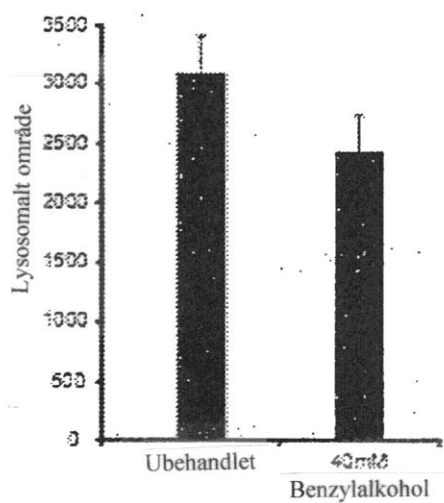
A



B

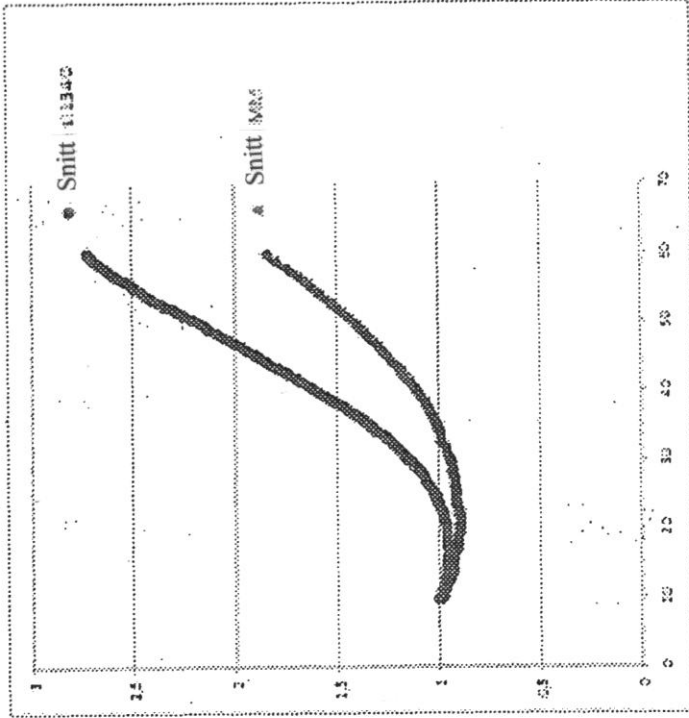


C

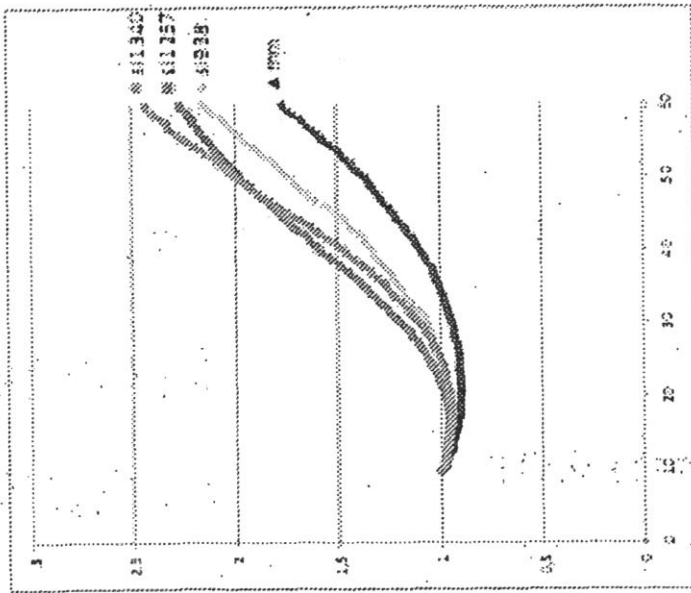




Figur 12



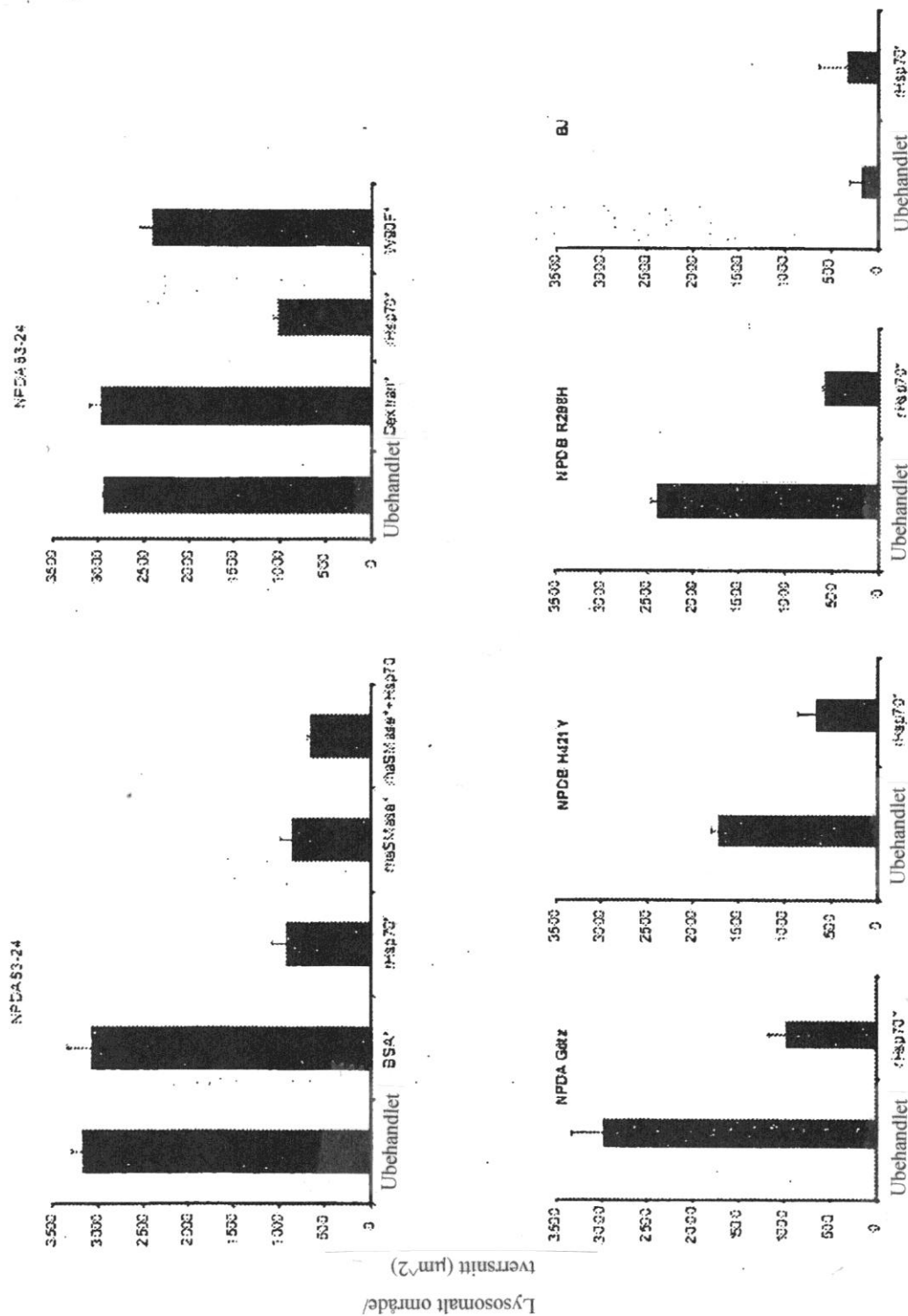
Snitt av 3 uavhengige eksp.



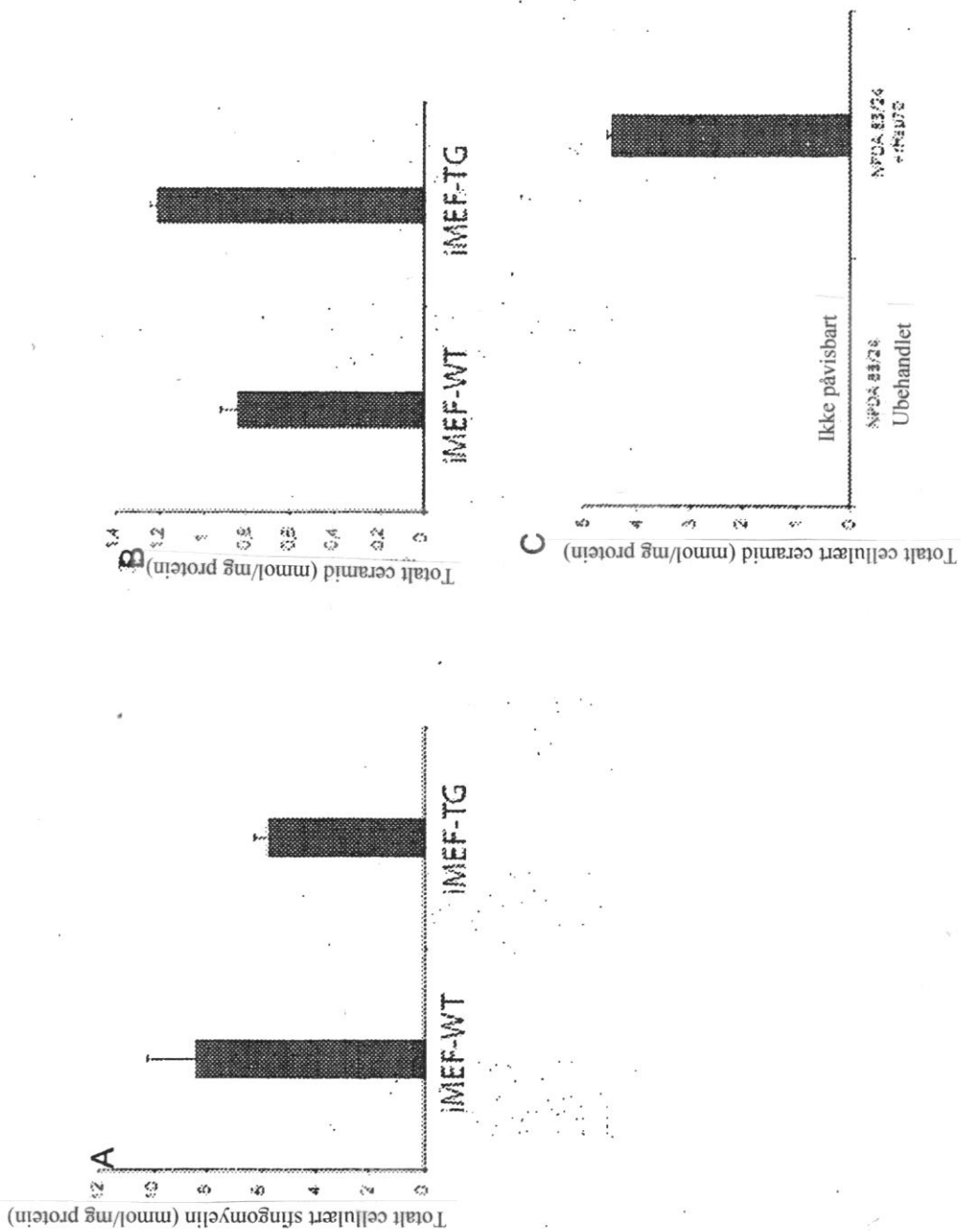
Ett eksp. - 3 siRNA'er

Normalisert grønn fluorescens

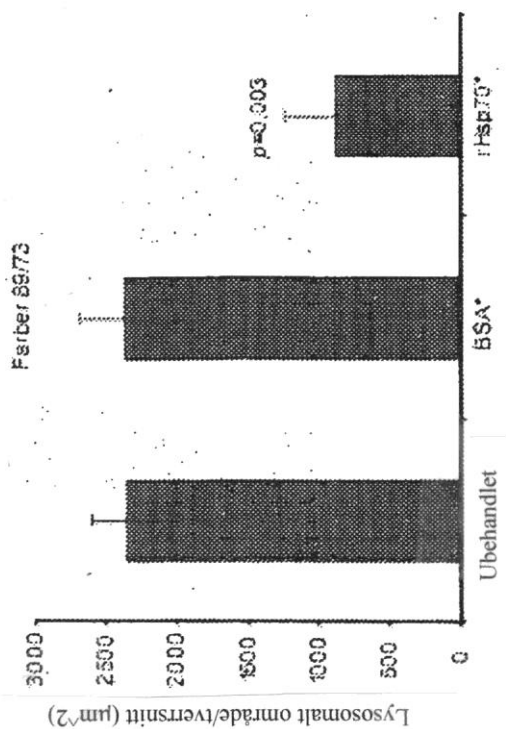
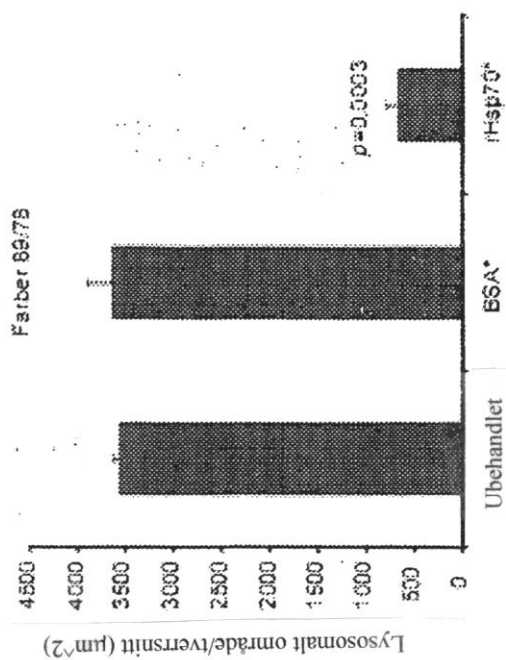
Figur 13



Figur 14



Figur 15



Figur 16

