



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2650008 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.

A61K 38/01 (2006.01)
A61K 38/03 (2006.01)
A61K 38/04 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2015.05.18
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.12.17
(86)	Europeisk søknadsnr	13002793.1
(86)	Europeisk innleveringsdag	2009.06.02
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2013.10.16
(30)	Prioritet	2008.05.30, WO, PCT/EP08/004341
(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
(73)	Innehaver	Xigen Inflammation Ltd., Arch. Makariou III 195 Neocleous House, 3030 Limassol, CY-Kypros
(72)	Oppfinner	Bonny, Christophe, En Vernaules, 1580 Avenches, CH-Sveits
(74)	Fullmektig	Onsagers AS, Postboks 1813 Vika, 0123 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Anvendelse av celle-permeable peptidinhibitorer i JNK-signaloverføringsveien i behandlingen av ulike kreftsykdommer
(56)	Anførte publikasjoner	EP-A- 1 364 949 WO-A-01/27268 WO-A-03/075917 WO-A-03/103698 WO-A-2005/097116 WO-A-2007/031098 WO-A-2008/028860 US-A1- 2003 100 549 US-A1- 2004 082 509 US-A1- 2006 258 706 US-A1- 2006 270 646 US-A1- 2007 003 531 ZOUKHRI DRISS ET AL: "c-Jun NH2-terminal kinase mediates interleukin-1beta-induced inhibition of lacrimal gland secretion.", JOURNAL OF NEUROCHEMISTRY JAN 2006, vol. 96, no. 1, January 2006 (2006-01), pages 126-135, XP002515924, ISSN: 0022-3042 MILANO GIUSEPPINA ET AL: "A peptide inhibitor of c-Jun NH2-terminal kinase reduces myocardial ischemia-reperfusion injury and infarct size in vivo.", AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. HEART AND CIRCULATORY PHYSIOLOGY APR 2007, vol. 292, no. 4, April 2007 (2007-04), pages H1828-H1835, XP002515925, ISSN: 0363-6135 HOLZBERG DAVID ET AL: "Disruption of the c-JUN-JNK complex by a cell-permeable peptide

containing the c-JUN delta domain induces apoptosis and affects a distinct set of interleukin-1-induced inflammatory genes.", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 10 OCT 2003, vol. 278, no. 41, 10 October 2003 (2003-10-10), pages 40213-40223, XP002515926, ISSN: 0021-9258

JOHNSON ET AL: "The c-jun kinase/stress-activated pathway: Regulation, function and role in human disease", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. MOLECULAR CELL RESEARCH, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 1773, no. 8, 1 August 2007 (2007-08-01), pages 1341-1348, XP022181683, ISSN: 0167-4889

MOON D O ET AL: "Bcl-2 overexpression attenuates SP600125-induced apoptosis in human leukemia U937 cells", CANCER LETTERS, NEW YORK, NY, US, vol. 264, no. 2, 14 March 2008 (2008-03-14), pages 316-325, XP022637679, ISSN: 0304-3835 [retrieved on 2008-03-14]

Foreliggende oppfinnelse refererer til anvendelsen av proteinkinaseinhibitorer og mer spesifikt anvendelsen av inhibitorer av proteinkinase c-jun-aminoterminal kinase, JNK-inhibitorsekvenser, kimære peptider, eller farmasøytiske sammensetninger inneholdende samme, for behandlingen av ulike sykdommer eller forstyrrelser sterkt relatert til JNK-signalisering, der disse sykdommene eller forstyrrelsene er valgt fra kreftsykdommer.

Den c-Jun-aminoterminal kinase (JNK) er et medlem av den stressaktiverte gruppen av mitogenaktiverte protein (MAP)-kinasene. Disse kinasene har blitt implisert i kontrollen av cellevekst og differensiering, og mer generelt, som responsen for celler på miljøstimuli. JNK-signaloverføringsveien blir aktivert som respons på miljømessig stress og ved engasjeringen av flere klasser med celleoverflatereseptorer. Disse reseptorene kan inkludere cytokinreseptorer, serpentinreseptorer og reseptortyrosinkinaser. I pattedyrceller har JNK blitt implisert i biologiske prosesser slik som onkogen transformasjon og mediering av adaptive responser på miljømessig stress. JNK har også blitt assosiert med modulering av immunresponser, inkludert modning og differensiering av immunceller, i tillegg til effektivering av programmert celledød i celler identifisert for ødeleggelse av immunsystemet. Denne unike egenskapen gjør JNK-signalisering til et lovende mål for utvikling av farmakologisk intervensjon. Blant flere neurologiske forstyrrelser er JNK-signalisering spesielt implisert i ischemisk slag og Parkinsons sykdom, men også i andre sykdommer som nevnt nærmere nedenfor. Videre ble den mitogenaktiverte proteinkinase (MAPK) p38alfa vist negativt å regulere celleproliferasjonen ved antagonisering av JNK-c-Jun-veien. Den mitogenaktiverte proteinkinase (MAPK)p38alfa ser derfor ut til å være aktiv i undertrykking av normal proliferasjon og kreftcelleproliferasjon, og viser ytterligere involveringen av JNK i kreftsykdommer (se f.eks. Hui et al., Nature Genetics, vol 39, nr.6, juni 2007). Det ble også vist at c-Jun-N-terminal kinase (JNK) er involvert i neuropatisk smerte frembrakt ved spinalnerveligering (SNL) der SNL induserte en langsom og vedvarende aktivering av JNK, spesielt JNK1, der p38-mitogenaktivert proteinkinase-aktivering ble funnet i spinal-mikroglier etter SNL, som hadde falt til nær basalnivå ved 21 dager (Zhuang et al., The Journal of Neuroscience, 29.mars 2006, 26(13):3551-3560)).

Inhibering eller avbrytelse av JNK-signaliseringsveien, spesielt tilveiebringelsen av inhibitorer av JNK-signaliseringsveien, ser slik ut til å være en lovende tilnærming til bekjempelse av forstyrrelser som er sterkt relatert til JNK-signalisering. Imidlertid er det kun kjent noen få inhibitorer av JNK-signaliseringsveien så langt.

Inhibitorer av JNK-signaliseringsveien som allerede er kjent i den kjente teknikken inkluderer spesielt f.eks. oppstrømskinaseinhibitorer (f.eks. CEP-1347), små kjemiske inhibitorer av JNK (SP600125 og AS601245) som direkte påvirker kinaseaktivitet, f.eks. ved å konkurrere med ATP-bindingssetet på proteinkinase,

og peptidinhibitorer av interaksjonen mellom JNK og dens substrater (D-JNKI og I-JIP) (se f.eks. Kuan et al., *Current Drug Targets – CNS & Neurological Disorders*, februar 2005, vol.4. nr. 1, s.63-67(5)).

Oppstrømskinaseinhibitoren CEP-1347 (KT7515) fremmer neuronal
 5 overlevelse ved doseringer som inhiberer aktivering av c-jun-aminoterminal
 kinaser (JNK'er) i primære embryonale kulturer og differensierte PC12-celler etter
 topisk fjerning og i mus behandlet med 1-metyl-4-fenyl-tetrahydropyridin. Videre
 kan CEP-1347 (KT7515) fremme langtidsoverlevelse av dyrkede hønse-embryonal
 dorsal-rotganglion, sympatetiske, ciliære og motorneuroner (se f.eks. Borasio et al.,
 10 *Neuroreport*. 9(7): 1435-1439, 11.may 1998).

Den lille kjemiske JNK-inhibitoren SP600125 ble funnet å redusere nivåene
 av c-Jun-fosforylering for å beskytte dopaminerge neuroner fra apoptose, og for
 delvis å gjenopprette nivået av dopamin i MPTP-indusert PD i C57BL/6N-mus
 (Wang et al., *Neurosci. Res.* 2004, feb., 48(2), 195-202). Disse resultatene indikerer
 15 videre at JNK-veien er hovedmediatoren av de neurotoksiske effektene av MPTP in
 vivo og inhibering av JNK-aktivitet kan representere en ny og effektiv strategi for å
 behandle PD.

Et ytterligere eksempel på små kjemiske inhibitorer er den tidligere nevnte
 JNK-inhibitoren AS601245. AS601245 inhiberer JNK-signaliseringsveien og
 20 fremmer celleoverlevelse etter cerebral iskemi. In vivo tilveiebrakte AS601245
 signifikant beskyttelse mot det forsinkede tapet av CA1-hippocampusneuroner i en
 gerbilmodell av transient global iskemi. Denne effekten er mediert ved JNK-
 inhibering og derfor ved c-Jun-uttrykking og fosforylering (se f.eks. Carboni et al.,
Pharmacol. Exp. Ther., 2004 juli, 310(1):25-32. Epub 2004. 26.februar).

En tredje klasse av inhibitorer av JNK-signaliseringsveien representerer
 peptidinhibitorer av interaksjonen mellom JNK og dens substrater, som nevnt
 ovenfor. Som et utgangspunkt for konstruksjon av slike JNK-inhibitorpeptider kan
 en sekvenssammenstilling av naturlig forekommende JNK-proteiner bli benyttet.
 Typisk omfatter disse proteinene JNK-bindingsdomener (JBD'er) og forekommer i
 30 ulike insulinbindings (IB)-proteiner slik som IB1 eller IB2. Resultatene av en slik
 eksempelmessig sekvenssammenstilling mellom JNK-bindingsdomenene i IB1
 (SEQ ID nr. 13), IB2 (SEQ ID nr. 14), c-Jun (SEQ ID nr. 15) og ATF2 (SEQ ID nr.
 16) (se f.eks. figurene 1A-1C). Slike sammenstillinger avslører en delvis konserver
 t sekvens på 8 aminosyrer (se figur 1A). E sammenligning av JBD'ene for IB1 og
 35 IB2 avslører ytterligere to blokker på syv og tre aminosyrer som er svært konserver
 t mellom de to sekvensene.

Sekvenser konstruert på basis av en slik sammenstilling er f.eks. tilkjennegitt
 i WO 01/27268 eller i WO 2007/031280. WO 2007/031280 og WO 01/27268
 tilkjennegir små cellepermeable fusjonspeptider, omfattende en såkalt TAT-
 40 cellepermeasjonssekvens avledet fra den grunnleggende trafikkeringssekvensen til

HIV-TAT-proteinet og en minimum 20 aminosyrer lang inhibitorisk sekvens for IB1. Begge komponenter er kovalent koblet til hverandre. Eksempler på (og per i dag de eneste) inhibitorene av MAPK-JNK-signaliseringsveien tilkjennegitt i både WO 2007/031280 og WO 01/27268 er f.eks. L-JNKI1 (JNK-inhibitorpeptid sammensatt av L-aminosyrer) eller de proteaseresistente D-JNKI1-peptidene (JNK-inhibitorpeptid sammensatt av ikke-native D-aminosyrer). Disse JNK-inhibitor (JNKI)-peptidene er spesifikke for JNK (JNK1, JNK2 og JNK3). I motsetning til de småforbindelsesinhibitorene som er diskutert ovenfor inhiberer inhibitorsekvensene i WO 2007/031280 eller WO 01/27268 heller interaksjonen mellom JNK og dens substrat. Ved sin trafikkeringssekvens avledet fra TAT blir fusjonspeptidet effektivt transportert inn i cellene. På grunn av de nye egenskapene oppnådd ved trafikkeringskomponenten blir fusjonspeptidene aktivt transportert inn i celler, der de forblir effektive inntil proteolytisk degradering.

Likevel har peptider ifølge WO 2007/031280 eller WO 01/27268 kun vist seg å være aktive i et spesielt lite antall sykdommer, spesielt ikke-maligne eller immunologisk relaterte celleproliferative sykdommer.

Et mål med foreliggende oppfinnelse er slik å identifisere ytterligere sykdommer som kan bli bekjempet med JNK-inhibitorpeptider. Et annet mål med foreliggende oppfinnelse er å tilveiebringe (anvendelsen av) nye JNK-inhibitorpeptider og derivater derav for behandlingen av disse sykdommene og av sykdommer ikke ennå er kjent for eller som allerede er kjent for å være sterkt relatert til JNK-signalisering.

Målet blir nådd ved anvendelsen av en JNK-inhibitorsekvens, som definert her, for fremstillingen av en farmasøytisk sammensetning for behandling av ulike sykdommer som er sterkt relatert til JNK-signalisering hos et individ, der sykdommene eller forstyrrelsene som er sterkt relatert til JNK-signalisering hos et individ fortrinnsvis er valgt fra kreftsykdommer.

Ifølge en annen foretrukket utførelsesform er kreftsykdommene valgt fra Kaposi sarkom, akutt myeloid leukemi, inkludert erytroleukemi, melanomer, maligne melanomer, kolonkarsinomer, lymfomer, blastomer, nyrekarsinomer, gastrointestinaltumorer, gliomer, prostatatumorer, blærekreft, rektaltumorer, magekreft, øsofaguskreft, pankreaskreft, leverkreft, brystkarsinomer (= brystkreft), livmorkreft, livmorhalskreft, akutt myeloid leukemi (AML), akutt lymfoid leukemi (ALL), kronisk myeloid leukemi (CML), kronisk lymfocytteleukemi (CLL), hepatomer, ulike virusinduserte tumorer, slik som f.eks. papillomvirusinduserte karsinomer (f.eks. livmorhalskarsinom = livmorhalskreft), adenokarsinomer, herpesvirusinduserte tumorer (f.eks. Burkitts lymfom, EBV-indusert B-cellelymfom), hepatitt-B-induserte tumorer (hepatocellekarsinomer), HTLV-1- og HTLV-2-induserte lymfomer, akustisk neurinom, lungekarsinomer (= lungekreft = bronkiekarsinom), småcellede lungekarsinomer, strupekreft, analkarsinom,

glioblastom, rektumkarsinom, astrocytom, hjernetumorer, retinoblastom, basaliom, hjernemetastaser, medulloblastomer, vaginalkreft, testikkelkreft, skjoldbruskkjertelkreft, Hodgkins syndrom, meningeomer, Schneebergers sykdom, hypofysetumor, mycosis fungoides, karsinoider, neurinom, spinaliom, Burkitts lymfom, strupekreft, nyrekreft, tymom, corpus-karsinom, benkreft, non-Hodgkins lymfomer, urinveiskreft, CUP-syndrom, hode-/nakketumorer, oligodendrogliom, vulvakreft, tarmkreft, kolonkarsinom, øsofaguskarsinom (= øsofaguskreft), vortetilstander, tynntarmtumorer, kraniofaryngomer, ovariekarsinom, bløtvevstumorer, ovariekreft (= ovariekarsinom), pankreaskarsinom (= pankreaskreft), endometriekarsinom, levermetastaser, peniskreft, tungekreft, galleblærekreft, leukemi, plasmocytom, lid-tumor, og prostatakreft (= prostatatumorer) osv., eller smittsomme sykdommer valgt fra influensa, malaria, SARS, gul feber, AIDS, Lyme borreliose, leishmaniasis, anthrax og meningitt.

Fordi JNK-inhibitorsekvenser som kjent på fagområdet kun viste anvendelighet for et begrenset antall sykdommer var det et overraskende resultat at JNK-inhibitorsekvenser som definert her kan bli benyttet og er passende for behandlingen av sykdommer eller forstyrrelser som er sterkt relatert til JNK-signalisering som nevnt ovenfor. Dette var verken åpenbart eller antydnet i den kjente teknikken, selv om JNK-inhibitorsekvenser generelt har vært kjent på fagområdet.

Ifølge en spesifikk utførelsesform binder typisk en JNK-inhibitorsekvens som benyttet her JNK og/eller inhiberer aktiveringen av minst én JNK-aktivert transkripsjonsfaktor, f.eks. c-Jun eller ATF2 (se henholdsvis f.eks. SEQ ID nr. 15 og 16) eller Elk1.

JNK-inhibitorsekvensen ifølge oppfinnelsen består av SEQ ID nr. 2. Andre JNK-inhibitorsekvenser som tilkjennegitt her omfatter eller består av minst én aminosyresekvens ifølge enhver av SEQ ID nr. 1 til 4, 13 til 20 og 33 til 100, eller et fragment, derivat eller variant derav. Slike andre JNK-inhibitorsekvenser kan inneholde 1, 2, 3, 4 eller til og med flere kopier av en aminosyresekvens ifølge SEQ ID nr. 1 til 4, 13 til 20 og 33 til 100, eller et fragment, derivat eller variant derav. Dersom de er til stede i flere enn én kopi kan disse aminosyresekvensene ifølge SEQ ID nr. 1 til 4, 13 til 20 og 33 til 100, eller et fragment, derivat eller variant derav være direkte koblet til hverandre uten noen linkersekvens eller via en linkersekvens som omfatter 1 til 10, fortrinnsvis 1 til 5 aminosyrer. Aminosyrer som danner linkersekvensen er fortrinnsvis valgt fra glysin eller prolin som aminosyrerester. Disse aminosyresekvensene ifølge SEQ ID nr. 1 til 4, 13 til 20 og 33 til 100, eller fragmenter, derivater eller varianter derav kan være separert fra hverandre med en hengsle av to, tre eller flere prolinrester.

JNK-inhibitorsekvensen som krevd er sammensatt av D-aminosyrer. Andre JNK-inhibitorsekvenser kan være sammensatt av L-aminosyrer, D-aminosyrer eller

en kombinasjon av begge. JNK-inhibitorsekvensene kan omfatte minst 1 eller til og med 2, eller minst 3, 4 eller 5, eller minst 6, 7, 8 eller 9 eller minst 10 eller flere D- og/eller L-aminosyrer, der D- og/eller L-aminosyrene kan være anbrakt i JNK-inhibitorsekvensen som benyttet her på en blokkvis, en ikke-blokkvis eller på en alternativ måte.

Andre JNK-inhibitorsekvenser som tilkjennegitt her kan utelukkende være sammensatt av L-aminosyrer. Slike JNK-inhibitorsekvenser kan da omfatte eller bestå av minst én «nativ JNK-inhibitorsekvens» ifølge SEQ ID nr. 1 eller 3. I denne konteksten refereres uttrykket «nativ» eller «nativ JNK-inhibitorsekvens(er)» til ikke-endrede JNK-inhibitorsekvenser ifølge enhver av SEQ ID nr. 1 eller 3 som utelukkende er sammensatt av L-aminosyrer.

Andre JNK-inhibitorsekvenser som tilkjennegitt her kan omfatte eller bestå av minst én (nativ) aminosyresekvens $\text{NH}_2\text{-X}_n^b\text{-X}_n^a\text{-RPTTLXLXXXXXXXQD-X}_n^b\text{-COOH}$ (L-IB generell (s)) [SEQ ID nr. 3] og/eller JNK-bindingsdomenet (JBD'er) til IB1 XRPTTLXLXXXXXXXQDS/TX (L-IB (generell)) [SEQ ID nr. 19]. I denne konteksten representerer hver X typisk en aminosyrerest, fortrinnsvis valgt fra enhver (nativ) aminosyrerest. X_n^a representerer typisk én aminosyrerest, fortrinnsvis valgt fra enhver aminosyrerest bortsett fra serin eller treonin, der n (antallet repetisjoner av X) er 0 til 1. Videre kan hver X_n^b være valgt fra enhver aminosyrerest, der n (antallet repetisjoner av X) er 0-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-30 eller mer, gitt at dersom n (antallet repetisjoner av X) er 0 for X_n^a , så omfatter X_n^b fortrinnsvis ikke en serin eller treonin på sin C-terminal, for å unngå en serin eller treonin på denne posisjonen. X_n^b kan representere en kontinuerlig strekning av peptidrester utledet fra SEQ ID nr. 1 eller 3. X_n^a og X_n^b kan representere enten D- eller L-aminosyrer. En JNK-inhibitorsekvens som tilkjennegitt her kan omfatte eller bestå av minst én (nativ) aminosyresekvens valgt fra gruppen som omfatter JNK-bindingsdomenet til IB1 DTYRPKRPTTLNLFQVPRSQDT (L-IB1) (SEQ ID nr. 17). En annen JNK-inhibitorsekvens som tilkjennegitt her kan videre omfatte eller bestå av minst én (nativ) aminosyresekvens $\text{NH}_2\text{-RPKRPTTLNLFQVPRSQD-COOH}$ (L-IB1(s)) (SEQ ID nr. 1). Andre JNK-inhibitorsekvenser som tilkjennegitt her kan omfatte eller bestå av minst én (nativ) aminosyresekvens valgt fra gruppen som omfatter JNK-

bindingsdomenet til **IB1** L-IB1(s1) (NH₂-TLNLFQVPRSQD-COOH, SEQ ID NO: 33); L-IB1(s2) (NH₂-TTLNLFQVPRSQ-COOH, SEQ ID NO: 34); L-IB1(s3) (NH₂-PTTLNLFQVPRS-COOH, SEQ ID NO: 35); L-IB1(s4) (NH₂-RPTTLNLFQVPR-COOH, SEQ ID NO: 36); L-IB1(s5) (NH₂-KRPTTLNLFQVP-COOH, SEQ ID NO: 37); L-IB1(s6) (NH₂-PKRPTTLNLFQV-COOH, SEQ ID NO: 38); L-IB1(s7) (NH₂-RPKRPTTLNLFQ-COOH, SEQ ID NO: 39); L-IB1(s8) (NH₂-LNLFPQVPRSQD-COOH, SEQ ID NO: 40); L-IB1(s9) (NH₂-TLNLFQVPRSQ-COOH, SEQ ID NO: 41); L-IB1(s10) (NH₂-TTLNLFQVPRS-COOH, SEQ ID NO: 42); L-IB1(s11) (NH₂-PTTLNLFQVPR-COOH, SEQ ID NO: 43); L-IB1(s12) (NH₂-RPTTLNLFQVP-COOH, SEQ ID NO: 44); L-IB1(s13) (NH₂-KRPTTLNLFQV-COOH, SEQ ID NO: 45); L-IB1(s14) (NH₂-PKRPTTLNLFQ-COOH, SEQ ID NO: 46); L-IB1(s15) (NH₂-RPKRPTTLNLF-COOH, SEQ ID NO: 47); L-IB1(s16) (NH₂-NLFQVPRSQD-COOH, SEQ ID NO: 48); L-IB1(s17) (NH₂-LNLFPQVPRSQ-COOH, SEQ ID NO: 49); L-IB1(s18) (NH₂-TLNLFQVPRS-COOH, SEQ ID NO: 50); L-IB1(s19) (NH₂-TTLNLFQVPR-COOH, SEQ ID NO: 51); L-IB1(s20) (NH₂-PTTLNLFQVP-COOH, SEQ ID NO: 52); L-IB1(s21) (NH₂-RPTTLNLFQV-COOH, SEQ ID NO: 53); L-IB1(s22) (NH₂-KRPTTLNLFQ-COOH, SEQ ID NO: 54); L-IB1(s23) (NH₂-PKRPTTLNLF-COOH, SEQ ID NO: 55); L-IB1(s24) (NH₂-RPKRPTTLNLF-COOH, SEQ ID NO: 56); L-IB1(s25) (NH₂-LFPQVPRSQD-COOH, SEQ ID NO: 57); L-IB1(s26) (NH₂-NLFQVPRSQ-COOH, SEQ ID NO: 58); L-IB1(s27) (NH₂-LNLFPQVPRS-COOH, SEQ ID NO: 59); L-IB1(s28) (NH₂-TLNLFQVPR-COOH, SEQ ID NO: 60); L-IB1(s29) (NH₂-TTLNLFQVP-COOH, SEQ ID NO: 61); L-IB1(s30) (NH₂-PTTLNLFQV-COOH, SEQ ID NO: 62); L-IB1(s31) (NH₂-RPTTLNLFQ-COOH, SEQ ID NO: 63); L-IB1(s32) (NH₂-KRPTTLNLF-COOH, SEQ ID NO: 64); L-IB1(s33) (NH₂-PKRPTTLNLF-COOH, SEQ ID NO: 65); and L-IB1(s34) (NH₂-RPKRPTTLNL-COOH, SEQ ID NO: 66).

(SEQ ID NO: = SEQ ID nr.)

- 5 En annen JNK-inhibitorsekvens som tilkjennegitt her kan omfatte eller bestå av minst én (nativ) aminosyresekvens som er valgt fra gruppen som omfatter (det lange) JNK-bindingsdomenet (JBDs) til
- IB1** PGTGCGDTYRPKRPTTLNLFQVPRSQDT (IB1-lang) (SEQ ID nr. 13), (det lange) JNK-bindingsdomenet til **IB2** IPSPSVEEPHKHRPTTLRLTTLGAQDS (IB2-lang) (SEQ ID nr. 14), JNK-bindingsdomenet til c-Jun
- 10 **GAYGYSNPKILKQSMTLNLADPVGNLKP**H (c-Jun) (SEQ ID nr. 15), JNK-bindingsdomenet til **ATF2** TNEDHLAVHKHKHEMTLKFGPARNDVIV (ATF2) (SEQ ID nr. 16) (se f.eks. figurene 1A-1C). I denne konteksten avslørte en sammenstilling en delvis konserverte 8 aminosyrer lang sekvens (se f.eks. figur 1A) og en ytterligere sammenligning av JBDs fra IB1 og IB2 avslørte to blokker med sju og tre
- 15 aminosyrer som er svært konserverte mellom de to sekvensene.

JNK-inhibitorsekvensene som krevd her utelukkende sammensatt av D-aminosyrer som definert ovenfor. Disse JNK-inhibitorsekvensene som er sammensatt av D-aminosyrer ikke-native D-retro-invers-sekvenser av native JNK-inhibitorsekvenser. Uttrykket «retro-invers-sekvens» refererer til en isomer av en lineær peptidsekvens der retningen på sekvensen er reversert og kiraliteten til hver aminosyrerest er invertert (se f.eks. Jameson et al., Nature, 368, 744-746 (1994), Brady et al., Nature, 368, 692-693 (1994)). Fordelen med å kombinere D-enantiomerer og revers syntese er at posisjonene til karbonyl- og aminogrupper på hver amidbinding blir byttet om, mens posisjonen til sidekjedegruppene på hvert alfa-karbon blir beholdt.

D-retro-invers-sekvensene som benyttet her og som definert ovenfor har en mengde nyttige egenskaper. F.eks. inntar D-retro-invers-sekvenser som benyttet her celler like effektivt som L-aminosyresekvenser som benyttet her, mens D-retro-invers-sekvenser som benyttet her er mer stabile enn de tilsvarende L-aminosyresekvensene.

Andre JNK-inhibitorsekvenser som tilkjennegett her kan omfatte eller bestå av minst én D-retro-invers sekvens ifølge aminosyresekvensen

$\text{NH}_2\text{-X}_b^n\text{-DQXXXXXXXXLXLTPR-X}_n^a\text{-X}_n^b\text{-COOH}$ (DIB1 generell (S)) (SEQ ID nr. 4) og/eller $\text{XS/TDQXXXXXXXXLXLTPRX}$ (D-IB (generell)) (SEQ ID nr. 20). X , X_n^a og X_n^b er som definert ovenfor (representerer fortrinnsvis D-aminosyrer), der X_n^b fortrinnsvis representerer en kontinuerlig strekning med rester avledet fra SEQ ID nr. 2 eller 4. En annen JNK-inhibitorsekvens som tilkjennegett her kan omfatte eller bestå av minst én D-retro-inverso-sekvens ifølge aminosyresekvensen som omfatter JNK-bindingsdomenet (JBDs) til **IB1 TDQSRPVQPFLNLTPRKPRYTD (D-IB1)** (SEQ ID nr. 18). JNK-inhibitorsekvensen som krevd her består av minst én D-retro-invers-sekvens ifølge aminosyresekvensen **$\text{NH}_2\text{-DQSRPVQPFLNLTPRKPR-COOH}$ (D-IB1(s))** (SEQ ID nr. 2). Andre tilkjennegitte JNK-inhibitorsekvenser kan omfatte eller bestå av minst én D-retro-inverso-sekvens ifølge aminosyresekvensen som omfatter JNK-bindingsdomenet (JBDs) til **IB1 D-IB1(s1) ($\text{NH}_2\text{-QPFLNLTPRKPR-COOH}$, SEQ ID nr. 67), D-IB1 (s2) ($\text{NH}_2\text{-VQPFLNLTPRKPR-COOH}$, SEQ ID nr. 68), D-IB1(s3) ($\text{NH}_2\text{-PVQPFLNLTPRK-COOH}$, SEQ ID nr. 69), D-IB1(s4) ($\text{NH}_2\text{-RPVQPFLNLTPR-COOH}$, SEQ ID nr. 70), D-**

IB1(s5) (NH₂-SRPVQPFLNLTP-COOH, SEQ ID NO: 71); D-IB1(s6) (NH₂-QSRPVQPFLNLTT-COOH, SEQ ID NO: 72); D-IB1(s7) (NH₂-DQSRPVQPFLNLTT-COOH, SEQ ID NO: 73); D-IB1(s8) (NH₂-PFLNLTTTPRKPR-COOH, SEQ ID NO: 74); D-IB1(s9) (NH₂-QPFLNLTTTPRK-COOH, SEQ ID NO: 75); D-IB1(s10) (NH₂-VQPFLNLTTTPRK-COOH, SEQ ID NO: 76); D-IB1(s11) (NH₂-PVQPFLNLTTTPR-COOH, SEQ ID NO: 77); D-IB1(s12) (NH₂-RPVQPFLNLTTTP-COOH, SEQ ID NO: 78); D-IB1(s13) (NH₂-SRPVQPFLNLTT-COOH, SEQ ID NO: 79); D-IB1(s14) (NH₂-QSRPVQPFLNLTT-COOH, SEQ ID NO: 80); D-IB1(s15) (NH₂-DQSRPVQPFLNL-COOH, SEQ ID NO: 81); D-IB1(s16) (NH₂-FLNLTTTPRKPR-COOH, SEQ ID NO: 82); D-IB1(s17) (NH₂-PFLNLTTTPRKPR-COOH, SEQ ID NO: 83); D-IB1(s18) (NH₂-QPFLNLTTTPRK-COOH, SEQ ID NO: 84); D-IB1(s19) (NH₂-VQPFLNLTTTPR-COOH, SEQ ID NO: 85); D-IB1(s20) (NH₂-PVQPFLNLTTTP-COOH, SEQ ID NO: 86); D-IB1(s21) (NH₂-RPVQPFLNLTT-COOH, SEQ ID NO: 87); D-IB1(s22) (NH₂-SRPVQPFLNLTT-COOH, SEQ ID NO: 88); D-IB1(s23) (NH₂-QSRPVQPFLNL-COOH, SEQ ID NO: 89); D-IB1(s24) (NH₂-DQSRPVQPFLN-COOH, SEQ ID NO: 90); D-IB1(s25) (NH₂-DQSRPVQPFL-COOH, SEQ ID NO: 91); D-IB1(s26) (NH₂-QSRPVQPFLN-COOH, SEQ ID NO: 92); D-IB1(s27) (NH₂-SRPVQPFLNL-COOH, SEQ ID NO: 93); D-IB1(s28) (NH₂-RPVQPFLNLTT-COOH, SEQ ID NO: 94); D-IB1(s29) (NH₂-PVQPFLNLTT-COOH, SEQ ID NO: 95); D-IB1(s30) (NH₂-VQPFLNLTTTP-COOH, SEQ ID NO: 96); D-IB1(s31) (NH₂-QPFLNLTTTPR-COOH, SEQ ID NO: 97); D-IB1(s32) (NH₂-PFLNLTTTPRK-COOH, SEQ ID NO: 98); D-IB1(s33) (NH₂-FLNLTTTPRKPR-COOH, SEQ ID NO: 99); and D-IB1(s34) (NH₂-LNLTTTPRKPR-COOH, SEQ ID NO: 100).

(SEQ ID NO: = SEQ ID nr.)

- Andre tilkjennegitte JNK-inhibitorsekvenser er presentert i Tabell 1 (SEQ ID nr. 1, 3, 4, 13-20 og 33-100). Tabellen viser navnet på JNK-inhibitorsekvensen som benyttet her, i tillegg til deres sekvensidentifiseringsnummer, deres lengde og aminosyresekvens. Videre viser tabell 1 sekvenser i tillegg til deres generiske formler, f.eks. for henholdsvis SEQ ID nr. 1, 2, 5, 6, 9 og 11 og SEQ ID nr. 3, 4, 7, 8, 10 og 12. Tabell 1 tilkjennegir videre de kimære sekvensene SEQ ID nr. 9-12 og 23-32 (se nedenfor), L-IB1-sekvensene SEQ ID nr. 33 til 66 og D-IB1-sekvensene SEQ ID nr. 67-100.

Tabell 1

SEQUENCE/ PEPTIDE NAME	SEQ ID NO	AA	SEQUENCE
L-IB1(s)	1	19	RPKRPTTLNLFQVPRSQD (NH ₂ -RPKRPTTLNLFQVPRSQD-COOH)
D-IB1(s)	2	19	DQSRPVQPFLNLTPRKPR (NH ₂ -DQSRPVQPFLNLTPRKPR-COOH)
L-IB generic (s)	3	19	NH ₂ -X _n ^b -X _n ^a -RPTTLXLLLLXXXXQD-X _n ^b -COOH
D-IB (generic) (s)	4	19	NH ₂ -X _n ^b -DQXXXXXXXXLXLTTPR-X _n ^a -X _n ^b -COOH
L-TAT	5	10	GRKKRRQRRR (NH ₂ -GRKKRRQRRR-COOH)
D-TAT	6	10	RRRQRRKKRG (NH ₂ -RRRQRRKKRG-COOH)
L-generic-TAT (s)	7	11	NH ₂ -X _n ^b -RKKRRQRRR-X _n ^b -COOH
D-generic-TAT (s)	8	11	NH ₂ -X _n ^b -RRRQRRKKR-X _n ^b -COOH
L-TAT-IB1(s)	9	31	GRKKRRQRRRPPRPKRPTTLNLFQVPRSQD (NH ₂ -GRKKRRQRRRPPRPKRPTTLNLFQVPRSQD-COOH)
L-TAT-IB (generic) (s)	10	29	NH ₂ -X _n ^b -RKKRRQRRR-X _n ^b -X _n ^a -RPTTLXLLLLXXXXQD-X _n ^b -COOH
D-TAT-IB1(s)	11	31	DQSRPVQPFLNLTPRKPRPPRRRQRRKKRG (NH ₂ -DQSRPVQPFLNLTPRKPRPPRRRQRRKKRG-COOH)
D-TAT-IB (generic) (s)	12	29	NH ₂ -X _n ^b -DQXXXXXXXXLXLTTPR-X _n ^a -X _n ^b -RRRQRRKKR-X _n ^b -COOH
IB1-long	13	29	PGTGCGDTPRPKRPTTLNLFQVPRSQDT (NH ₂ -PGTGCGDTPRPKRPTTLNLFQVPRSQDT -COOH)
IB2-long	14	27	IPSPSVEEPKHKRPTTLRLTLGAQDS (NH ₂ -IPSPSVEEPKHKRPTTLRLTLGAQDS-COOH)
c-Jun	15	29	GAYGYSNPKILKQSMTLNADPVGNLKPH (NH ₂ -GAYGYSNPKILKQSMTLNADPVGNLKPH -COOH)
ATF2	16	29	TNEDHLAVHKHKHEMTLKFGPARNDVIV (NH ₂ -TNEDHLAVHKHKHEMTLKFGPARNDVIV-COOH)
L-IB1	17	23	DTYRPKRPTTLNLFQVPRSQDT (NH ₂ -DTYRPKRPTTLNLFQVPRSQDT -COOH)
D-IB1	18	23	TDQSRPVQPFLNLTPRKPRYTD (NH ₂ -TDQSRPVQPFLNLTPRKPRYTD -COOH)
L-IB (generic)	19	19	XRPTTLXLLLLXXXXQDS/TX (NH ₂ -XRPTTLXLLLLXXXXQDS/TX -COOH)
D-IB (generic)	20	19	XS/TDQXXXXXXXXLXLTTPRX (NH ₂ -XS/TDQXXXXXXXXLXLTTPRX -COOH)
L-generic-TAT	21	17	XXXXRKKRRQRRRXXXX (NH ₂ -XXXXRKKRRQRRRXXXX -COOH)
D-generic-TAT	22	17	XXXXRRRQRRKKRXXXX (NH ₂ -XXXXRRRQRRKKRXXXX -COOH)

SEQUENCE/ PEPTIDE NAME	SEQ ID NO	AA	SEQUENCE
L-TAT-IB1	23	35	GRKKRRQRRRPPDTPYRPKRPTTLNLFQVPRSQDT (NH ₂ -GRKKRRQRRRPPDTPYRPKRPTTLNLFQVPRSQDT-COOH)
L-TAT-IB (generic)	24	42	XXXXXXXXRKKRRQRRRXXXXXXXXRPTTLXLLLLXXXXXQDS/TX (NH ₂ -XXXXXXXXRKKRRQRRRXXXXXXXXRPTTLXLLLLXXXXXQDS/TX -COOH)
ID-TAT-IB1	25	35	TDQSRPVQPFNLTTTPRKPRYTDPPIRRQRRKKRG (NH ₂ -TDQSRPVQPFNLTTTPRKPRYTDPPIRRQRRKKRG-COOH)
D-TAT-IB (generic)	26	42	XT/SDQXXXXXXXXLXLTTPRXXXXXXXXRRRQRRKKRXXXXXXXX (NH ₂ -XT/SDQXXXXXXXXLXLTTPRXXXXXXXXRRRQRRKKRXXXXXXXX -COOH)
L-TAT-IB1(s1)	27	30	RKKRRQRRRPPRPKRPTTLNLFQVPRSQD (NH ₂ -RKKRRQRRRPPRPKRPTTLNLFQVPRSQD-COOH)
L-TAT-IB1(s2)	28	30	GRKKRRQRRRX _n °RPKRPTTLNLFQVPRSQD (NH ₂ -GRKKRRQRRRX _n °RPKRPTTLNLFQVPRSQD-COOH)
L-TAT-IB1(s3)	29	29	RKKRRQRRRX _n °RPKRPTTLNLFQVPRSQD (NH ₂ -RKKRRQRRRX _n °RPKRPTTLNLFQVPRSQD-COOH)
D-TAT-IB1(s1)	30	30	DQSRPVQPFNLTTTPRKPRPIRRQRRKKR (NH ₂ -DQSRPVQPFNLTTTPRKPRPIRRQRRKKR-COOH)
D-TAT-IB1(s2)	31	30	DQSRPVQPFNLTTTPRKPRX _n °RRRQRRKKRG (NH ₂ -DQSRPVQPFNLTTTPRKPRX _n °RRRQRRKKRG-COOH)
D-TAT-IB1(s3)	32	29	DQSRPVQPFNLTTTPRKPRX _n °RRRQRRKKR (NH ₂ -DQSRPVQPFNLTTTPRKPRX _n °RRRQRRKKR-COOH)
L-IB1(s1)	33	13	TLNLFQVPRSQD (NH ₂ -TLNLFQVPRSQD-COOH)
L-IB1(s2)	34	13	TTLNLFQVPRSQ (NH ₂ -TTLNLFQVPRSQ-COOH)
L-IB1(s3)	35	13	PTTLNLFQVPRS (NH ₂ -PTTLNLFQVPRS-COOH)
L-IB1(s4)	36	13	RPTTLNLFQVPR (NH ₂ -RPTTLNLFQVPR-COOH)
L-IB1(s5)	37	13	KRPTTLNLFQVP (NH ₂ -KRPTTLNLFQVP-COOH)
L-IB1(s6)	38	13	PKRPTTLNLFQV (NH ₂ -PKRPTTLNLFQV-COOH)
L-IB1(s7)	39	13	RPKRPTTLNLFQ (NH ₂ -RPKRPTTLNLFQ-COOH)
L-IB1(s8)	40	12	LNLFPQVPRSQD (NH ₂ -LNLFPQVPRSQD-COOH)
L-IB1(s9)	41	12	TLNLFQVPRSQ (NH ₂ -TLNLFQVPRSQ-COOH)
L-IB1(s10)	42	12	TTLNLFQVPRS (NH ₂ -TTLNLFQVPRS-COOH)

SEQUENCE/ PEPTIDE NAME	SEQ ID NO	AA	SEQUENCE
L-IB1(s11)	43	12	PTTLNLFQVPR (NH ₂ -PTTLNLFQVPR-COOH)
L-IB1(s12)	44	12	RPTTLNLFQVP (NH ₂ -RPTTLNLFQVP-COOH)
L-IB1(s13)	45	12	KRPTTLNLFQV (NH ₂ -KRPTTLNLFQV-COOH)
L-IB1(s14)	46	12	PKRPTTLNLFQ (NH ₂ -PKRPTTLNLFQ-COOH)
L-IB1(s15)	47	12	RPKRPTTLNLF (NH ₂ -RPKRPTTLNLF-COOH)
L-IB1(s16)	48	11	NLFQVPRSQD (NH ₂ -NLFQVPRSQD-COOH)
L-IB1(s17)	49	11	LNLFQVPRSQ (NH ₂ -LNLFQVPRSQ-COOH)
L-IB1(s18)	50	11	TLNLFQVPRS (NH ₂ -TLNLFQVPRS-COOH)
L-IB1(s19)	51	11	TTLNLFQVPR (NH ₂ -TTLNLFQVPR-COOH)
L-IB1(s20)	52	11	PTTLNLFQVP (NH ₂ -PTTLNLFQVP-COOH)
L-IB1(s21)	53	11	RPTTLNLFQV (NH ₂ -RPTTLNLFQV-COOH)
L-IB1(s22)	54	11	KRPTTLNLFQ (NH ₂ -KRPTTLNLFQ-COOH)
L-IB1(s23)	55	11	PKRPTTLNLF (NH ₂ -PKRPTTLNLF-COOH)
L-IB1(s24)	56	11	RPKRPTTLNLF (NH ₂ -RPKRPTTLNLF-COOH)
L-IB1(s25)	57	10	LFPQVPRSQD (NH ₂ -LFPQVPRSQD-COOH)
L-IB1(s26)	58	10	NLFQVPRSQ (NH ₂ -NLFQVPRSQ-COOH)
L-IB1(s27)	59	10	LNLFQVPRS (NH ₂ -LNLFQVPRS-COOH)
L-IB1(s28)	60	10	TLNLFQVPR (NH ₂ -TLNLFQVPR-COOH)
L-IB1(s29)	61	10	TTLNLFQVP (NH ₂ -TTLNLFQVP-COOH)
L-IB1(s30)	62	10	PTTLNLFQV (NH ₂ -PTTLNLFQV-COOH)
L-IB1(s31)	63	10	RPTTLNLFQ (NH ₂ -RPTTLNLFQ-COOH)

SEQUENCE/ PEPTIDE NAME	SEQ ID NO	AA	SEQUENCE
L-IB1(s32)	64	10	KRPTTLNLF (NH ₂ -KRPTTLNLF-COOH)
L-IB1(s33)	65	10	PKRPTTLNLF (NH ₂ -PKRPTTLNLF-COOH)
L-IB1(s34)	66	10	RPKRPTTLNL (NH ₂ -RPKRPTTLNL-COOH)
D-IB1(s1)	67	13	QPFLNLTPRKPR (NH ₂ -QPFLNLTPRKPR-COOH)
D-IB1(s2)	68	13	VQPFLNLTPRKPR (NH ₂ -VQPFLNLTPRKPR-COOH)
D-IB1(s3)	69	13	PVQPFLNLTPRK (NH ₂ -PVQPFLNLTPRK-COOH)
D-IB1(s4)	70	13	RPVQPFLNLTPR (NH ₂ -RPVQPFLNLTPR-COOH)
D-IB1(s5)	71	13	SRPVQPFLNLTP (NH ₂ -SRPVQPFLNLTP-COOH)
D-IB1(s6)	72	13	QSRPVQPFLNLTT (NH ₂ -QSRPVQPFLNLTT-COOH)
D-IB1(s7)	73	13	DQSRPVQPFLNLTT (NH ₂ -DQSRPVQPFLNLTT-COOH)
D-IB1(s8)	74	12	PFLNLTPRKPR (NH ₂ -PFLNLTPRKPR-COOH)
D-IB1(s9)	75	12	QPFLNLTPRKPR (NH ₂ -QPFLNLTPRKPR-COOH)
D-IB1(s10)	76	12	VQPFLNLTPRK (NH ₂ -VQPFLNLTPRK-COOH)
D-IB1(s11)	77	12	PVQPFLNLTPR (NH ₂ -PVQPFLNLTPR-COOH)
D-IB1(s12)	78	12	RPVQPFLNLTP (NH ₂ -RPVQPFLNLTP-COOH)
D-IB1(s13)	79	12	SRPVQPFLNLTT (NH ₂ -SRPVQPFLNLTT-COOH)
D-IB1(s14)	80	12	QSRPVQPFLNLTT (NH ₂ -QSRPVQPFLNLTT-COOH)
D-IB1(s15)	81	12	DQSRPVQPFLNL (NH ₂ -DQSRPVQPFLNL-COOH)
D-IB1(s16)	82	11	FLNLTPRKPR (NH ₂ -FLNLTPRKPR-COOH)
D-IB1(s17)	83	11	PFLNLTPRKPR (NH ₂ -PFLNLTPRKPR-COOH)
D-IB1(s18)	84	11	QPFLNLTPRK (NH ₂ -QPFLNLTPRK-COOH)

SEQUENCE/ PEPTIDE NAME	SEQ ID NO	AA	SEQUENCE
D-IB1(s19)	85	11	VQPFLNLTPR (NH ₂ -VQPFLNLTPR-COOH)
D-IB1(s20)	86	11	PVQPFLNLTP (NH ₂ -PVQPFLNLTP-COOH)
D-IB1(s21)	87	11	RPVQPFLNLTT (NH ₂ -RPVQPFLNLTT-COOH)
D-IB1(s22)	88	11	SRPVQPFLNLT (NH ₂ -SRPVQPFLNLT-COOH)
D-IB1(s23)	89	11	QSRPVQPFLNL (NH ₂ -QSRPVQPFLNL-COOH)
D-IB1(s24)	90	11	DQSRPVQPFLN (NH ₂ -DQSRPVQPFLN-COOH)
D-IB1(s25)	91	10	DQSRPVQPFL (NH ₂ -DQSRPVQPFL-COOH)
D-IB1(s26)	92	10	QSRPVQPFLN (NH ₂ -QSRPVQPFLN-COOH)
D-IB1(s27)	93	10	SRPVQPFLNL (NH ₂ -SRPVQPFLNL-COOH)
D-IB1(s28)	94	10	RPVQPFLNLT (NH ₂ -RPVQPFLNLT-COOH)
D-IB1(s29)	95	10	PVQPFLNLTT (NH ₂ -PVQPFLNLTT-COOH)
D-IB1(s30)	96	10	VQPFLNLTP (NH ₂ -VQPFLNLTP-COOH)
D-IB1(s31)	97	10	QPFLNLTPR (NH ₂ -QPFLNLTPR-COOH)
D-IB1(s32)	98	10	PFLNLTPRK (NH ₂ -PFLNLTPRK-COOH)
D-IB1(s33)	99	10	FLNLTPRK (NH ₂ -FLNLTPRK-COOH)
D-IB1(s34)	100	10	LNLTTPRKPR (NH ₂ -LNLTTPRKPR-COOH)

- En annen tilkjennegitt JNK-inhibitorsekvens omfatter eller består av minst én variant, fragment og/eller derivat av de ovenfor definerte native eller ikke-native aminosyresekvensene ifølge SEQ ID nr. 1-4, 13-20 og 33-100. Slike varianter, fragmenter og/eller derivater opprettholder biologisk aktivitet for de ovenfor tilkjennegitte native eller ikke-native JNK-inhibitorsekvensene som tilkjennegitt her, spesifikt for native eller ikke-native aminosyresekvenser ifølge SEQ ID nr. 1-4, 13-20 og 33-100, dvs., binding av JNK og/eller inhibering av aktiveringen av minst én JNK-aktivert transkripsjonsfaktor, f.eks. c-Jun, ATF2 eller Elk1. Funksjonalitet kan bli testet ved ulike tester, f.eks. bindingstester av peptidet til sitt målmolekyl

eller ved biofysiske fremgangsmåter, f.eks. spektroskopi, datamodellering, strukturanalyse osv. Spesifikt kan en JNK-inhibitorsekvens eller varianter, fragmenter og/eller derivater derav som definert ovenfor bli analysert ved hydrofilisitetsanalyse (se f.eks. Hopp and Woods, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci USA 78:3824-3828) som kan bli benyttet for å identifisere de hydrofobe og hydrofile regionene til peptidene, for slik å hjelpe til i designet av substrater for eksperimentell manipulering, slik som i bindingseksperimenter, eller for antistoffsyntese. Sekundærstrukturanalyse kan også bli utført for å identifisere regioner på en JNK-inhibitorsekvens eller varianter, fragmenter og/eller derivater derav som benyttet her som antar spesifikke strukturelle motiver (se f.eks. Chou og Fassman, 1974, Biochem. 13, 222-223). Manipulasjon, translasjon, sekundærstrukturprediksjon, hydrofilitets- og hydrofobisitetsprofiler, prediksjon av åpen leseramme og plotting, og bestemmelse av sekvenshomologier kan bli utført ved å benytte dataprogramvare som er tilgjengelig på fagområdet. Andre fremgangsmåter for strukturanalyse inkluderer f.eks. røntgenkrystallografi (se f.eks. Engström 1974, Biochem. Exp. Biol. 11:7-13), massespektroskopi og gasskromatografi (se f.eks. Methods in Protein Science, 1997, J. Wiley and Sons, New York, NY) og datamodellering (se f.eks. Fletterick og Zoller, eds., 1986. Computer Graphics and Molecular Modelling, In: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) kan også bli benyttet.

Andre tilkjennegitte JNK-inhibitorsekvenser kan omfatte eller bestå av minst én variant av (native eller ikke-native) aminosyresekvenser ifølge SEQ ID nr. 1-4, 13-20 og 33-100. En «variant av en (nativ eller ikke-nativ) aminosyresekvens ifølge SEQ ID nr. 1-4, 13-20 og 33-100» er typisk en sekvens som er utledet fra enhver av sekvensene ifølge SEQ ID nr. 1-4, 13-20 og 33-100, der varianten omfatter aminosyre-endringer i aminosyresekvensene ifølge SEQ ID nr. 1-4, 13-20 og 33-100. Slike endringer omfatter typisk 1 til 20, fortrinnsvis 1 til 10 og mer foretrukket 1 til 5 substitusjoner, addisjoner og/eller delesjoner av aminosyrer ifølge SEQ ID nr. 1-4, 13-20 og 33-100, der varianten oppviser en sekvensidentitet med enhver av sekvensene ifølge SEQ ID nr. 1-4, 13-20 og 33-100 på minst omtrent 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % eller til og med 99 %.

Dersom varianter av (native eller ikke-native) aminosyresekvenser ifølge SEQ ID nr. 1-4, 13-20 og 33-100 som definert ovenfor blir oppnådd ved substitusjon av spesifikke aminosyrer så omfatter fortrinnsvis slike substitusjoner konservative aminosyresubstitusjoner. Konservative aminosyresubstitusjoner kan inkludere synonyme aminosyrerester innenfor en gruppe som har tilstrekkelig like fysiokjemiske egenskaper slik at en substitusjon mellom medlemmer av gruppen vil preservere den biologiske aktiviteten til molekylet (se f.eks. Grantham, R. (1974), Science 185, 862-864). Det er åpenbart for en erfaren fagperson at aminosyrer også kan bli satt inn i og/eller fjernet fra de ovenfor-identifiserte sekvensene uten å endre

deres funksjon, spesielt dersom innskuddene og/eller delesjonene kun involverer noen få aminosyrer, f.eks. færre enn tjue, og fortrinnsvis færre enn ti, og som ikke fjerner eller forskyver aminosyrer som er avgjørende for funksjonell aktivitet.

- 5 Videre skal substitusjoner bli unngått i varianter der disse fører til ytterligere treoniner på aminosyreposisjoner som er tilgjengelige for en fosforylase, fortrinnsvis en kinase, for å unngå inaktivering av JNK-inhibitorsekvensen som benyttet her eller det kimære peptidet som benyttet her in vivo eller in vitro.

Synonyme aminosyrerester, som er klassifiserte i de samme gruppene og typisk kan byttes med hverandre i konservative aminosyresubstitusjoner, er definert i tabell 2.

10

Tabell 2

Foretrukne grupper av synonyme aminosyrerester

<u>Aminosyre</u>	<u>Synonym rest</u>
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His
Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
Pro	Gly, Ala, (Thr), Pro
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val
Gly	Ala, (Thr), Pro, Ser, Gly
Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile
Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys
His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His
Gln	Glu, Lys, Asn, His, (Thr), Arg, Gln
Asn	Gln, Asp, Ser, Asn
Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys
Asp	Glu, Asn, Asp
Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp

15

En spesifikk form av en variant av SEQ ID nr. 1-4, 13-20 og 33-100 er et fragment av de (native eller ikke-native) aminosyresekvensene ifølge SEQ ID nr. 1-4, 13-20 og 33-100, som typisk er endret ved minst én delesjon sammenlignet med SEQ ID nr. 1-4, 13-20 og 33-100. Typisk omfatter et fragment minst 4 kontinuerlige aminosyrer av enhver av SEQ ID nr. 1-4, 13-20 og 33-100, som er en lengde som typisk er tilstrekkelig for å tillate spesifikk gjenkjenning av en epitop fra enhver av disse sekvensene. Fragmentet omfatter typisk 4 til 18, 4 til 15 eller 4 til 10 kontinuerlige aminosyrer ifølge enhver av SEQ ID nr. 1-4, 13-20 og 33-100, der den nedre grensen i området kan være 4 eller 5, 6, 7, 8, 9 eller 10. Fjernede aminosyrer

20

kan forekomme i enhver posisjon i SEQ ID nr. 1-4, 13-20 og 33-100, fortrinnsvis N- eller C-terminalt.

5 Videre kan et fragment av de (native eller ikke-native) aminosyresekvensene ifølge SEQ ID nr. 1-4, 13-20 og 33-100, som beskrevet ovenfor, være definert som en sekvens som deler en sekvensidentitet med enhver av sekvensene ifølge SEQ ID nr. 1-4, 13-20 og 33-100 som benyttet her på minst omtrent 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 95 %, 98 % eller til og med 99 %.

10 Andre tilkjennegitte JNK-inhibitorsekvenser kan ytterligere omfatte eller bestå av minst ett derivat av (native eller ikke-native) aminosyresekvenser ifølge SEQ ID nr. 1-4, 13-20 og 33-100 som definert ovenfor. I denne konteksten er et «derivat av (native eller ikke-native) aminosyresekvenser ifølge SEQ ID nr. 1-4, 13-20 og 33-100» fortrinnsvis en aminosyresekvens som er avledet fra enhver av sekvensene ifølge SEQ ID nr. 1-4, 13-20 og 33-100, der derivatet omfatter minst én
15 modifisert L- eller D-aminosyre (for å danne ikke-naturlig(e) aminosyre(er)), fortrinnsvis 1 til 20, mer foretrukket 1 til 10, og enda mer foretrukket 1 til 5 modifiserte L- eller D-aminosyrer. Derivater av varianter eller fragmenter faller også inn under omfanget av foreliggende oppfinnelse.

20 «En modifisert aminosyre» kan i så henseende være enhver aminosyre som er endret, f.eks. ved ulik glykosylering i ulike organismer, ved fosforylering eller ved merking av spesifikke aminosyrer. Et slikt merke er da typisk valgt fra gruppen av merker som omfatter:

- (i) radioaktive merker, dvs., radioaktiv fosforylering eller radioaktivt merke med svovel, hydrogen, karbon, nitrogen osv.,
- 25 (ii) fargestoffer (f.eks. digoksygenin, osv.),
- (iii) fluorescerende grupper (f.eks. fluorescein, osv.),
- (iv) kjemoluminescensgrupper,
- (v) grupper for immobilisering på en fast fase (f.eks. His-tag, biotin, strep-tag, flag-tag, antistoffer, antigen, osv.), og
- 30 (vi) en kombinasjon av to eller flere av merkene nevnt under (i) til (v).

I konteksten ovenfor er en aminosyresekvens som har en sekvens som «deler en sekvensidentitet» på minst f.eks. 95 % med en annen aminosyresekvens ment å skulle bety at sekvensen til den gjeldende aminosyresekvensen er identisk med den andre aminosyresekvensen bortsett fra at den gjeldende aminosyresekvensen kan
35 inkludere opp til fem aminosyre-endringer per 100 aminosyrer av den andre aminosyresekvensen. For å oppnå en aminosyresekvens som har en sekvens med minst 95 % identitet med en annen aminosyresekvens så kan med andre ord opp til 5

% (5 av 100) av aminosyrerestene i den gjeldende sekvensen bli innsatt eller substituert med en annen aminosyre eller fjernet.

For sekvenser uten en eksakt korrespondering kan en «% identitet» for en første sekvens bli bestemt med hensyn på en andre sekvens. Generelt blir disse to sekvensene som skal sammenlignes sammenstilt for å gi en maksimal korrelasjon mellom sekvensene. Dette kan medføre å sette inn «åpninger» i enten én av eller begge sekvenser for å øke graden av sammenstilling. En % identitet kan da bli bestemt over hele lengden av hver av sekvensene som blir sammenlignet (såkalt global sammenstilling) som er spesielt passende for sekvenser av samme eller tilsvarende lengde, eller over kortere, definerte lengder (såkalt lokal sammenstilling) som er mer hensiktsmessig for sekvenser med ulik lengde.

Fremgangsmåter for sammenligning av identiteten og homologien til to eller flere sekvenser, spesielt som benyttet her, er velkjent på fagområdet. Slik kan f.eks. programmer som er tilgjengelige i Wisconsin Sequence Analysis Package, version 9.1 (Deveraux et al., 1984, Nucleic Acids Res. 12, 387-395), f.eks. programmene BESTFIT og GAP, bli benyttet for å bestemme % identitet mellom to polynukleotider og % identitet og % homologi mellom to polypeptidsekvenser. BESTFIT benytter den «lokale homologialgoritmen» til (Smith og Waterman (1981), J. Mol. Biol. 147, 195-197) og finner den beste single regionen med likhet mellom to sekvenser. Andre programmer for bestemmelse av identitet og/eller likhet mellom sekvenser er også kjent på fagområdet, f.eks. BLAST-familien av programmer (Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol., 215, 403-410) som er tilgjengelig på hjemmesiden til NCBI på internettsiden ncbi.nlm.nih.gov) og FASTA (Pearson (1990), Methods Enzymol. 183, 63-98, Pearson and Lipman (1988), Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 85, 2444-2448).

En JNK-inhibitorsekvens som benyttet ifølge foreliggende oppfinnelse og som definert ovenfor kan bli oppnådd eller produsert ved fremgangsmåter som er velkjente på fagområdet, f.eks. ved kjemisk syntese som diskutert nedenfor. F.eks. kan et peptid tilsvarende en del av en JNK-inhibitorsekvens som benyttet her inkludert en ønsket region av nevnte JNK-inhibitorsekvens, eller som medierer den ønskede aktiviteten in vitro eller in vivo, bli syntetisert ved anvendelse av en peptidsyntetiserer.

JNK-inhibitorsekvens som benyttet her og som definert ovenfor kan videre være modifisert ved en trafikkeringssekvens, for å tillate JNK-inhibitorsekvensen som benyttet her og definert ovenfor å bli transportert effektivt inn i celler. En slik modifisert JNK-inhibitorsekvens er fortrinnsvis tilveiebrakt og benyttet som kimære sekvenser.

Ifølge et andre aspekt tilveiebringer derfor foreliggende oppfinnelse anvendelsen av et kimært peptid bestående av et første domene og et andre domene for fremstillingen av en farmasøytisk sammensetning for behandling av sykdommer

eller forstyrrelser som er sterkt relatert til JNK-signalisering som definert ovenfor i et individ, der det første domenet i det kimære peptidet omfatter en trafikkeringssekvens, mens det andre domenet i det kimære peptidet består av en JNK-inhibitorsekvens ifølge SEQ ID nr. 2 eller et derivat derav og der det første domenet og det andre domenet er forbundet med en kovalent binding.

Typisk har kimære peptider som benyttet ifølge foreliggende oppfinnelse en lengde på minst 25 aminosyrer, f.eks. 25 til 250 aminosyrer, mer foretrukket 25 til 200 aminosyrer, enda mer foretrukket 25 til 150 aminosyrer, 25 til 100 og mest foretrukket aminosyre 25 til 50 aminosyrer.

Som et første domene omfatter fortrinnsvis det kimære peptidet som benyttet her en trafikkeringssekvens som typisk er valgt fra enhver sekvens av aminosyrer som styrer et peptid (som det er til stede i) til en ønsket cellulær destinasjon. Slik styrer typisk trafikkeringssekvensen slik den benyttes her peptidet over plasmamembranen, f.eks. fra utsiden av cellen gjennom plasmamembranen og inn i cytoplasma. Alternativt, eller i tillegg, så kan trafikkeringssekvensen styre peptidet til en ønsket lokalisering inne i cellen, f.eks. kjernen, ribosomet, det endoplasmatiske retikulum (ER), et lysosom, eller peroksisom, ved f.eks. å kombinere to komponenter (f.eks. komponent for cellepermeabilitet og en komponent for nukleær lokalisering) eller ved at én enkelt komponent f.eks. har egenskaper for cellemembrantransport og målrettet, f.eks. intranukleær transport. Trafikkeringssekvensen kan i tillegg omfatte en annen komponent som er i stand til å binde en cytoplasmakomponent eller enhver annen komponent eller avdeling i cellen (f.eks. endoplasmatiske retikulum, mitokondrier, golgiapparatet, lysosomale vesikler). Dermed kan f.eks. trafikkeringssekvensen på det første domenet og JNK-inhibitorsekvensen på det andre domenet være lokalisert i cytoplasma eller enhver annen avdeling i cellen. Dette gjør det mulig å bestemme lokalisering av det kimære peptidet i cellen ved opptak.

Fortrinnsvis har trafikkeringssekvensen (når den er inkludert i det første domenet i det kimære peptidet som benyttet her) en lengde på 5 til 150 aminosyrer, mer foretrukket en lengde på 5 til 100 og mest foretrukket en lengde fra 5 til 50, 5 til 30 eller til og med 5 til 15 aminosyrer.

Mer foretrukket kan trafikkeringssekvensen (inneholdt i det første domenet i det kimære peptidet som benyttet her) foreligge som en kontinuerlig aminosyresekvensstrekning i det første domenet. Alternativt kan trafikkeringssekvensen i det første domenet være splittet i to eller flere fragmenter, der alle disse fragmentene ligner hele trafikkeringssekvensen og kan være separert fra hverandre med 1 til 10, fortrinnsvis 1 til 5 aminosyrer, gitt at trafikkeringssekvensen opprettholder sine bærerregenskaper som tilkjennegett ovenfor. Disse aminosyrene som separerer fragmentene av trafikkeringssekvensen kan f.eks. bli valgt fra aminosyresekvenser som er forskjellige fra

trafikkeringssekvensen. Alternativt kan det første domenet inneholde en trafikkeringssekvens sammensatt av mer enn én komponent, der hver komponent har sin egen funksjon for transporten av JNK-inhibitorsekvensen på det andre domenet til f.eks. en spesifikk avdeling i cellen.

- 5 Trafikkeringssekvensen som definert ovenfor kan være sammensatt av L-aminosyrer, D-aminosyrer, eller en kombinasjon av begge. Fortrinnsvis kan trafikkeringssekvensen (inkludert i det første domenet i det kimære peptidet som benyttet her) omfatte minst 1 eller til og med 2, fortrinnsvis minst 3, 4 eller 5, mer foretrukket minst 6, 7, 8 eller 9, og enda mer foretrukket minst 10 eller flere D-
10 og/eller L-aminosyrer, der D- og/eller L-aminosyrene kan være anbrakt i JNK-trafikkeringssekvensene på en blokkvis, en ikke-blokkvis eller på en alternativ måte.

- Ifølge én alternativ utførelsesform kan trafikkeringssekvensen i det kimære peptidet som benyttet her være utelukkende sammensatt av L-aminosyrer. Mer
15 foretrukket omfatter eller består trafikkeringssekvensen i det kimære peptidet som benyttet her av minst én «nativ» trafikkeringssekvens som definert ovenfor. I denne konteksten refererer uttrykket «nativ» til ikke-endrede trafikkeringssekvenser som i sin helhet er sammensatt av L-aminosyrer.

- Ifølge en annen alternativ utførelsesform kan trafikkeringssekvensen i det
20 kimære peptidet som benyttet her være utelukkende sammensatt av D-aminosyrer. Mer foretrukket kan trafikkeringssekvensen i det kimære peptidet som benyttet her være sammensatt av et D-retro-invers-peptid av sekvensene som vist ovenfor.

- Trafikkeringssekvensen i det første domenet av det kimære peptidet som benyttet her kan være oppnådd fra naturlig forekommende kilder, eller kan være
25 fremstilt ved genetiske fremstillingsteknikker eller kjemisk syntese (se f.eks. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A laboratory manual, 2.utgave. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA).

- Kilder for trafikkeringssekvensen i det første domenet kan bli benyttet
30 inkludert f.eks. native proteiner slik som f.eks. TAT-proteinet (f.eks. som beskrevet i US patent nr. 5,804,604 og 5,674,980, VP22 (beskrevet i f.eks. WO 97/05265, Elliott and O'Hare, Cell 88: 223-233 (1997)), ikke-virale proteiner (Jackson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10691-10695 (1992)), trafikkeringssekvenser avledet fra Antennapedia (f.eks. antennapedia-bærersekvensen) eller fra basiske peptider,
35 f.eks. peptider som har en lengde på 5 til 15 aminosyrer, fortrinnsvis 10 til 12 aminosyrer og som omfatter minst 80 %, mer foretrukket 85 % eller til og med 90 % basiske aminosyrer, slik som f.eks. arginin, lysin og/eller histidin. Videre er varianter, fragmenter og derivater av ett av de native proteinene benyttet som trafikkeringssekvenser tilkjennegitt her. Med hensyn på varianter, fragmenter og
40 derivater refereres det til definisjonen gitt ovenfor for JNK-inhibitorsekvenser som

benyttet her. Varianter, fragmenter i tillegg til derivater er tilsvarende definert som fremlagt ovenfor for JNK-inhibitorsekvenser som benyttet her. Spesifikt, i konteksten av trafikkeringssekvensen, så kan en variant eller derivat bli definert som en sekvens som deler en sekvensidentitet med ett av de native proteinene

5 benyttet som trafikkeringssekvenser som definert ovenfor på minst omtrent 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % eller til og med 99 %.

I en foretrukket utførelsesform av det kimære peptidet som benyttet her omfatter eller består trafikkeringssekvensen i det første domenet av en sekvens som er avledet fra det humane immunsviktivirus (HIV)1-TAT-proteinet, spesielt noen

10 eller alle av de 86 aminosyrene som utgjør TAT-proteinet.

For en trafikkeringssekvens (som er inkludert i det første domenet i det kimære peptidet som benyttet her) kan partielle sekvenser av fullengde-TAT-proteinet bli benyttet for å danne et funksjonelt effektivt fragment av et TAT-protein, dvs., et TAT-peptid som inkluderer regionen som medierer inntrengning i

15 og opptak inn i celler. Når det gjelder hvorvidt en slik sekvens er et funksjonelt effektivt fragment av TAT-proteinet kan bli bestemt ved å benytte kjente teknikker (se f.eks. Franked et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA 86:7397-7401 (1989)). Slik kan trafikkeringssekvensen i det første domenet av det kimære peptidet som benyttet her være avledet fra et funksjonelt effektivt fragment eller del av en TAT-

20 proteinsekvens som omfatter mindre enn 86 aminosyrer, og som oppviser opptak inn i celler, og eventuelt opptaket inn i cellekjernen. Mer foretrukket er partielle sekvenser (fragmenter) av TAT som skal bli benyttet som bærer for å mediere permeasjon av det kimære peptidet over cellemembranen ment å skulle omfatte den basiske regionen (aminosyrene 48 til 57 eller 49 til 57) av fullengde-TAT.

Ifølge en mer foretrukket utførelsesform kan trafikkeringssekvensen (som er inkludert i det første domenet i det kimære peptidet som benyttet her) omfatte eller bestå av en aminosyresekvens inneholdende TAT-restene 48-57 eller 49-57, og mest foretrukket en generisk TAT-sekvens $\text{NH}_2\text{-X}_n^b\text{-RKKRRQRRR-X}_n^b\text{-COOH}$ (L-generisk-TAT (s)) (SEQ ID nr. 7) og/eller $\text{XXXXRKKRRQ RRRXXXX}$ (L-generisk-TAT) (SEQ ID nr. 21), der X eller X_n^b er som definert ovenfor. Videre er

30 antallet « X_n^b »-rester i SEQ ID nr. 8 ikke begrenset til den som er vist, og kan variere som beskrevet ovenfor. Alternativt kan trafikkeringssekvensen som er inkludert i det første domenet av det kimære peptidet som benyttet her omfatte eller bestå av et peptid inneholdende f.eks. aminosyresekvensen $\text{NH}_2\text{-GRKKRRQRRR-}$

35 COOH (L-TAT) (SEQ ID nr. 5).

Ifølge en annen mer foretrukket utførelsesform kan trafikkeringssekvensen (som er inkludert i det første domenet i det kimære peptidet som benyttet her) omfatte et D-retro-invers-peptid av sekvensen som vist ovenfor, dvs., D-retro-invers-sekvensen av den generiske TAT-sekvensen som har sekvensen $\text{NH}_2\text{-X}_n^b\text{-RRRQRRKKR-X}_n^b\text{-COOH}$ (D-generisk TAT (s)) (SEQ ID nr. 8) og/eller

40

XXXXRRRQRRKKRXXXX (D-generisk-TAT) (SEQ ID nr. 22). Også her er X_n^b som definert ovenfor (som fortrinnsvis representerer D-aminosyrer). Videre er antallet « X_n^b »-rester i SEQ ID nr. 8 ikke begrenset til den ene som er vist, og kan variere som beskrevet ovenfor. Mest foretrukket kan trafikkeringssekvensen som benyttet her omfatte D-retro-invers-sekvensen NH_2 -RRRQRRKKRG-COOH (D-TAT) (SEQ ID nr. 6).

Ifølge en annen utførelsesform kan trafikkeringssekvensen som er inkludert i det første domenet i det kimære peptidet som benyttet her omfatte eller bestå av varianter av trafikkeringssekvensene som definert ovenfor. En «variant av en trafikkeringssekvens» er fortrinnsvis en sekvens avledet fra en trafikkeringssekvens som definert ovenfor, der varianten omfatter en modifisering, f.eks. addisjon, (intern) delesjon (som fører til fragmenter) og/eller substitusjon av minst én aminosyre som er til stede i trafikkeringssekvensen som definert ovenfor. Slike modifiseringer omfatter typisk 1 til 20, fortrinnsvis 1 til 10 og mer foretrukket 1 til 5 substitusjoner, addisjoner og/eller delesjoner av aminosyrer. Videre oppviser varianten fortrinnsvis en sekvensidentitet med trafikkeringssekvensen som definert ovenfor, mer foretrukket med enhver av SEQ ID nr. 5 til 8 eller 21-22, på minst omtrent 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % eller til og med 99 %.

Fortrinnsvis føre en slik modifisering av trafikkeringssekvensen som er inkludert i det første domenet av det kimære peptidet som benyttet her til en trafikkeringssekvens med økt eller minsket stabilitet. Alternativt kan varianter av trafikkeringssekvensen bli designet for å modulere intracellulær lokalisering av det kimære peptidet som benyttet her. Når de tilsettes eksogent er slike varianter som definert ovenfor typisk designet slik at trafikkeringssekvensenes evne til å trenge inn i celler blir opprettholdt (dvs., opptaket av varianten av trafikkeringssekvensen inn i cellen er vesentlig lik den for det native proteinet benyttet som trafikkeringssekvens). F.eks. kan endring av den basiske regionen som er antatt å være viktig for nukleær lokalisering (se f.eks. Dang og Lee, J. Biol. Chem. 264:18019-18023 (1989), Hauber et al., J. Virol. 63:1181-1187 (1989)) føre til en cytoplasmalokalisering eller partiell cytoplasmalokalisering av trafikkeringssekvensen, og derfor av JNK-inhibitorsekvensen som komponent av det kimære peptidet som benyttet her. I tillegg til det ovenstående kan ytterligere modifiseringer bli introdusert i varianten, f.eks. ved å koble til f.eks. kolesterol eller andre lipidenheter på trafikkeringssekvensen for å fremstille en trafikkeringssekvens som har økt løselighet i membranen. Enhver av variantene som er tilkjennegitt ovenfor av trafikkeringssekvensene som er inkludert i det første domenet til det kimære peptidet som benyttet her kan bli fremstilt ved å benytte teknikker som typisk er kjent for fagmannen på området (se f.eks. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A laboratory manual, 2.utgave. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA).

Som et andre domene består det kimære peptidet som benyttet her av JNK-inhibitorsekvensen ifølge SEQ ID nr. 2, inkludert derivater av denne JNK-inhibitorsekvensen.

5 Begge domener, dvs., det første og andre domenet i det kimære peptidet som benyttet her kan være koblet for slik å danne en funksjonell enhet. Enhver fremgangsmåte for kobling av det første og andre domenet, slik det generelt er kjent på fagområdet, kan bli benyttet.

10 Ifølge én utførelsesform er det første og andre domenet av det kimære peptidet slik det benyttes her fortrinnsvis koblet med en kovalent binding. En kovalent binding, som definert her, kan f.eks. være en peptidbinding. Likevel kan begge domener også være koblet via sidekjeder eller kan være koblet med en kjemisk linkerenheter.

15 Det første og andre domenet av det kimære peptidet som benyttet her foreligger i en enkelt kopi, det første domenet er koblet til enten N-terminale eller den C-terminale enden av det andre domenet. I en annen ikke-krevd utførelsesform kan flere kopier av det første og andre domenet være anbrakt i enhver mulig rekkefølge. F.eks. kan det første domenet være til stede i det kimære peptidet som benyttet her i et flertallskopiantall, f.eks. i to, tre eller flere kopier, som fortrinnsvis er anbrakt i konsekutiv rekkefølge. Da kan det andre domenet være til stede i én
20 kopi som foreligger på N- eller C-terminalen til sekvensen som omfatter det første domenet. Alternativt kan det andre domenet være til stede i et flertallskopiantall, f.eks. i to, tre eller flere kopier, og det første domenet kan være til stede i en enkelt kopi. Ifølge begge alternativer kan første og andre domene ha enhver plass i et konsekutivt oppsett. Eksempeloppsett er vist i det følgende: f.eks. første domene –
25 første domene – første domene – andre domene, første domene – første domene – andre domene – første domene, første domene – første domene – første domene – første domene, eller f.eks. andre domene – første domene – første domene – første domene. Fortrinnsvis kan det første og andre domenet være direkte koblet med hverandre uten noen linker. Alternativt kan de være forbundet med hverandre via en
30 linkersekvens som omfatter 1 til 10, fortrinnsvis 1 til 5 aminosyrer. Aminosyrer som danner linkersekvensen er fortrinnsvis valgt fra glysin eller prolin som aminosyrerester. Mer foretrukket kan det første og andre domenet være separert fra hverandre med en hengsle av to, tre eller flere prolinrester mellom det første og andre domenet.

35 Det kimære peptidet som definert ovenfor og benyttet her, som består av ett første og ett andre domene, kan være sammensatt av L-aminosyrer, D-aminosyrer, eller en kombinasjon av begge. Deri kan det første domenet (i tillegg til linkerne som benyttes) være sammensatt av L-aminosyrer, D-aminosyrer, eller en kombinasjon av begge (F.eks. L-TAT og D-IB1(s) osv.) med det andre domenet
40 bestående av SEQ ID nr. 2. Andre ikke-krevde kimære peptider som tilkjennegett

- her omfatter eller består av de L-aminosyre kimære peptidene ifølge det generelle L-TAT-IB-peptidet $\text{NH}_2\text{-X}_n^b\text{-RKKRRQRRR-X}_n^b\text{-X}_n^a\text{-RPTTLXLXXXXXXQD-X}_n^b\text{-COOH}$ (L-TAT-IB (generelt) (s)) (SEQ ID nr. 10), der X, X_n^a og X_n^b er som definert ovenfor.
- Et annet kimært peptid kan omfatte eller bestå av det L-aminosyre kimære peptidet $\text{NH}_2\text{-GRKKRRQRRRPPRPKRPTTLNLFQVPRSQD-COOH}$ (L-TAT-IB1 (s)) (SEQ ID nr. 9).
- Et annet kimært peptid kan omfatte eller bestå av den L-aminosyre kimære peptidsekvensen $\text{GRKKRRQRRR PPDYRPKRP TTLNLFQVP RSQDT}$ (L-TAT-IB1) (SEQ ID nr. 23), eller $\text{XXXXXXXXRKK RRQRRRXXXX XXXXRPTTLX LXXXXXXXQD S/TX}$ (L-TAT-IB generell) (SEQ ID nr. 24), der X er som definert ovenfor, eller det kimære peptidet kan omfatte eller bestå av den L-aminosyre kimære peptidsekvensen $\text{RKKRRQRRRPPRPKRPTTLNLFQVPRSQD}$ (L-TAT-IB1(s1)) (SEQ ID nr. 27), $\text{GRKKRRQRRRX}_n^c\text{RPKRPTTLNLFQVPRSQD}$ (L-TAT-IB1(s2)) (SEQ ID nr. 28) eller $\text{RKKRRQRRRX}_n^c\text{RPKRPTTLNLFQVPRSQD}$ (L-TAT-IB1(s3)) (SEQ ID nr. 29). I denne konteksten representerer hver X typisk en aminosyrerest som definert ovenfor, typisk representerer X_n^c en kontinuerlig strekning med peptidrester, der hver X uavhengig er valgt fra hverandre fra glysin eller prolin, f.eks. en monoton glysinstreking eller en monoton prolinstreking, der n (antallet repetisjoner av X_n^c) typisk er 0-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-30 eller til og med flere, fortrinnsvis 0-5 eller 5-10. X_n^c kan representere enten D- eller L-aminosyrer.
- Andre ikke-krevde kimære peptider som tilkjennegett her kan omfatte eller bestå av D-aminosyre kimære peptider av de ovenfor tilkjennegitte L-aminosyre kimære peptidene. Eksempler på D-retro-inverse kimære peptider ifølge foreliggende oppfinnelse er f.eks. det generelle D-TAT-IB-peptidet $\text{NH}_2\text{-X}_n^b\text{-DQXXXXXXXXLXLTPR-X}_n^a\text{-X}_n^b\text{-RRRQRRKKR-X}_n^b\text{-COOH}$ (D-TAT-IB (generelt) (s)) (SEQ ID nr. 12). Her er X, X_n^a og X_n^b er som definert ovenfor (som f.eks. representerer D-aminosyrer). Det krevde kimære peptidet som benyttet her består av D-aminosyre kimære peptider ifølge TAT-IB1-peptidet $\text{NH}_2\text{-DQSRPVQPFLNLTTPRKPRPPRRRQRRKKRG-COOH}$ (D-TAT-IB1(s)) (SEQ ID nr. 11).
- Andre ikke-krevde kimære peptider kan omfatte eller bestå av den D-aminosyre kimære peptidsekvensen $\text{TDQSRPVQPFLNLTTPRKPRYTDPPRRRQRRKKRG}$ (D-TAT-IB1) (SEQ ID nr. 25), eller $\text{XT/SDQXXXXXXXXLXLTPRXXXXXXXXRRRQRRKKRXXXXXXXX}$ (D-TAT-IB generell) (SEQ ID nr. 26), der X er som definert ovenfor. Det kimære peptidet som benyttet her omfatter eller består av den D-aminosyre kimære peptidsekvensen $\text{DQSRPVQPFLNLTTPRKPRPPRRRQRRKKR}$ (D-TAT-IB1(s1)) (SEQ ID nr. 30), $\text{DQSRPVQPFLNLTTPRKPRX}_n^c\text{RRRQRRKKRG}$ (D-TAT-IB1(s2)) (SEQ ID nr. 31), eller $\text{DQSRPVQPFLNLTTPRKPRX}_n^c\text{RRRQRRKKR}$ (D-TAT-IB1(s3)) (SEQ ID nr. 32). X_n^c kan være som definert ovenfor.

Det første og andre domenet av det kimære peptidet som definert ovenfor kan være koblet til hverandre ved kjemisk eller biokjemisk kobling utført på enhver passende måte som er kjent på fagområdet, f.eks. ved å etablere en peptidbinding mellom det første og andre domenet, f.eks. ved å kryssbinde det første og andre domenet i det kimære peptidet som definert ovenfor.

Mange kjent fremgangsmåter som er passende til kjemisk kryssbinding av det første og andre domenet i det kimære peptidet som definert ovenfor er ikke-spesifikke, dvs., de styrer ikke punktet for kobling til noe spesifikt sete på transportpolypeptidet eller det fraktete makromolekylet. Som et resultat av dette kan anvendelse av ikke-spesifikke kryssbindingsmidler angripe funksjonelle seter eller sterisk blokkere aktive seter, og gjøre de konjugerte proteinene biologisk inaktive. Slik blir fortrinnsvis slike kryssbindingsfremgangsmåter benyttet som tillater en mer spesifikk kobling av det første og andre domenet.

I denne konteksten er én måte å øke koblingsspesifisitet på en direkte kjemisk kobling til en funksjonell gruppe som kun foreligger én gang eller noen få ganger på én av eller begge av det første og andre domenet som skal krysskobles. F.eks. forekommer cystein, som er den eneste protein-aminosyren som inneholder en tiolgruppe, i mange proteiner kun noen få ganger. Også, f.eks. hvis et polypeptid ikke inneholder noen lysinrester, så vil et kryssbindingsreagens som er spesifikt for primære aminer være selektivt for aminoterminalen på dette polypeptidet. Vellykket anvendelse av denne tilnærmingen for å øke koblingsspesifisitet krever at polypeptidet har de passende sjeldne og reaktive restene i områder i molekylet som kan bli endret uten tap av molekylets biologiske aktivitet. Cysteinrester kan bli erstattet når de foreligger i deler av polypeptidsekvensen der deres deltagelse i en kryssbindingsreaksjon ellers sannsynligvis ville interferere med den biologiske aktiviteten. Når en cysteinrest blir erstattet er det typisk ønskelig å minimere de resulterende endringene i polypeptidfoldning. Endringer i polypeptidfoldning blir minimert når utskiftningen er kjemisk og sterisk tilsvarende cystein. Av disse grunner er serin foretrukket som en erstatning for cystein. Som vist i eksemplene nedenfor kan en cysteinrest bli introdusert i polypeptidets aminosyresekvens for kryssbindingsformål. Når en cysteinrest blir introdusert er introduksjon på eller nær den amino- eller karboksyterminale enden foretrukket. Konvensjonelle fremgangsmåter er tilgjengelige for slike aminosyresekvensmodifiseringer, der polypeptidet av interesse blir fremstilt ved kjemisk syntese.

Kobling av det første og andre domenet på det kimære peptidet som definert ovenfor og benyttet her kan også bli utført via et koblings- eller konjugeringsmiddel. Det finnes flere intermolekulære kryssbindingsreagenser som kan bli benyttet (se f.eks. Means og Feeny, Chemical Modification of Proteins, Holden-Day, 1974, s.39-43). Blant disse reagensene er f.eks. N-suksinimidyl-3-(2-pyridyltio)-propionat (SPDP) eller N,N'-(1,3-fenylene)-bismaleimid (der begge er svært spesifikke for sulfhydrylgrupper og danner irreversible koblinger), N,N'-

etylen-bis-(jodacetamid) eller annet slikt reagens som har 6 til 11 karbon-metylenbruer (som er relativt spesifikke for sulfydrylgrupper) og 1,5-difluor-2,4-dinitrobenzen (som danner irreversible koblinger med amino- og tyrosingrupper). Andre kryssbindingsreagenser som er nyttige til dette formålet inkluderer: p,p'-difluor-m, m'-dinitrodifenylsulfon som danner irreversible kryssbindinger med amino- og fenolgrupper, dimetyladiipimidat (som er spesifikk for aminogru-
 5 pper), fenol-1,4-disulfonylklorid (som prinsipielt reagerer med aminogru-
 pper), heksametylendiisocyanat, eller azofenyl-p-diisocyanat (som prinsipielt reagerer med aminogru-
 pper), glutaraldehyd (som reagerer med flere ulike sidekjeder) og
 10 disdiazobenzidin (som primært reagerer med tyrosin og histidin).

Kryssbindingsreagenser benyttet til kryssbinding av det første og andre domenet av det kimære peptidet som definert ovenfor kan være homobifunksjonelle, dvs., ha to funksjonelle grupper som gjennomgår den samme reaksjonen. Et foretrukket homobifunksjonelt kryssbindingsreagens er bismaleimidoheksan («BMH»). BMH
 15 inneholder to funksjonelle maleimidgrupper som reagerer spesifikt med sulfhydrylinneholdende forbindelser ved milde betingelser (pH 6,5-7,7). De to maleimidgruppene er forbundet med en hydrokarbonkjede. Derfor er BMH nyttig til irreversibel kryssbinding av polypeptider som inneholder cysteinrester.

Kryssbindingsreagenser benyttet til kryssbinding av det første og andre
 20 domenet i det kimære peptidet som definert ovenfor kan også være heterobifunksjonelt. Heterobifunksjonelle kryssbindingsmidler har to ulike funksjonelle grupper, f.eks. en amin-reaktiv gruppe og en tiol-reaktiv gruppe, som henholdsvis vil kryssbinde to proteiner som har frie aminer og tioler. Eksempler på heterobifunksjonelle kryssbindingsmidler er suksinimidyl-4-(N-maleimidometyl)-
 25 sykloheksan-1-karboksylat («SMCC»), m-maleimidobenzoyl-N-hydroksysuksinimidester («MBS») og suksinimid-4-(p-maleimidofenyl)-butyrat («SMPB»), som er en kjedeforlenget analog av MBS. Suksinimidylgruppen på disse kryssbinderne reagerer med et primært amin, og det tiolreaktive maleimidet danner en kovalent binding med tiolen på en cysteinrest.

Kryssbindingsreagenser som er passende for kryssbinding av det første og andre domenet i det kimære peptidet som definert ovenfor har ofte lav løselighet i vann. En hydrofil enhet slik som en sulfonatgruppe kan slik bli addert på kryssbindingsreagenset for å forbedre dets løselighet i vann. I så henseende er Sulfo-MBS og Sulfo-SMCC eksempler på kryssbindingsreagenser som er modifisert
 35 for vannløselighet, som kan bli benyttet i overensstemmelse med foreliggende oppfinnelse.

Likeledes gir mange kryssbindingsreagenser et konjugat som essensielt er ikke-kløyybart ved cellulære betingelser. Likevel inneholder noen kryssbindingsreagenser som er spesielt passende for kryssbinding av det første og
 40 andre domenet i det kimære peptidet som definert ovenfor en kovalent binding, slik

som et disulfid, som er kløyvbar ved cellulære betingelser. F.eks. er Trauts reagens, ditiobis(suksinimidylpropionat) («DSP») og N-suksinimidyl-3-(2-pyridylditio)-propionat («SPDP») velkjente kløyvbare kryssbindere. Anvendelsen av et kløyvbart kryssbindingsmiddel gjør det mulig for den fraktete enheten å bli separert fra transportpolypeptidet etter levering inn i målcellen. Direkte disulfidbinding kan også være nyttig.

Utallige kryssbindingsmidler, inkludert de som er diskutert ovenfor, er kommersielt tilgjengelige. Detaljerte instruksjoner for deres anvendelse er enkelt tilgjengelig fra de kommersielle tilbyderne. En generell referanse som gjelder proteinkryssbinding og konjugatfremstilling er: Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking, CRC Press (1991).

Kjemisk kryssbinding av det første og andre domenet i det kimære peptidet som definert ovenfor inkluderer anvendelsen av spacer-armer. Spacer-armer tilveiebringer intramolekylær fleksibilitet eller justerer intramolekylære avstander mellom konjugatenheter og kan derved hjelpe til å bevare biologisk aktivitet. En spacer-arm kan foreligge i formen av en polypeptidenhet som inkluderer spacer-aminosyrer, f.eks. prolin. Alternativt kan en spacer-arm være del av kryssbindingsreagenset, slik som i «langkjede-SPDP» (Pierce Chem. Co., Rockford IL., katalognummer 21651 H).

Også tilkjennegitt her er varianter, fragmenter eller derivater av ett av de ovenfor-tilkjennegitte kimære peptidene. Med hensyn på fragmenter og varianter blir det generelt referert til definisjonen ovenfor gitt for JNK-inhibitorsekvenser.

En «variant av et kimært peptid» er typisk en sekvens som er avledet fra enhver av sekvensene ifølge SEQ ID nr. 9 til 12 og 23 til 32 der den kimære varianten omfatter aminosyre-endringer i de kimære peptidene ifølge SEQ ID nr. 9 til 12 og 23 til 32. Slike endringer omfatter typisk 1 til 20, fortrinnsvis 1 til 10 og mer foretrukket 1 til 5 substitusjoner, addisjoner og/eller delesjoner (som fører til fragmenter) av aminosyrer ifølge SEQ ID nr. 9 til 12 og 23 til 32, der det endrede kimære peptidet som benyttet her oppviser en sekvensidentitet med enhver av sekvensene ifølge SEQ ID nr. 9 til 12 og 23 til 32 på minst omtrent 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, eller 95 %, 98 % eller til og med 99 %. Disse variantene opprettholder den biologiske aktiviteten til det første og andre domenet som inneholdt i det kimære peptidet som benyttet her, dvs., trafikkeringsaktiviteten til det første domenet som tilkjennegitt ovenfor og aktiviteten til det andre doemenet for binding av JNK og/eller inhibering av aktiveringen av minst én JNK-aktivert transkripsjonsfaktor.

Dermed omfatter det kimære peptidet slik det benyttes her også fragmenter av de kimære peptidene, spesifikt av de kimære peptidsekvensene ifølge enhver av SEQ ID nr. 25, 30 til 32. I konteksten av foreliggende oppfinnelse er slik et «fragment av det kimære peptidet» fortrinnsvis en sekvens utledet fra enhver av sekvensene ifølge SEQ ID nr. 25, 30 til 32.

Til slutt omfatter det kimære peptidet som benyttet her også derivater av de tidligere tilkjennegitte kimære peptidene, spesielt av de kimære peptidsekvensene ifølge SEQ ID nr. 11 og 30 til 32.

JNK-inhibitorsekvensene og/eller de kimære peptidene som definert her, i tillegg til fragmenter, varianter og derivater derav, kan bli benyttet som immunogener for å generere antistoffer som immunspesifikt binder disse peptidkomponentene. Slike antistoffer inkluderer f.eks. polyklonale, monoklonale, kimære, enkeltkjede, Fab-fragmenter og et Fab-ekspresjonsbibliotek. Ulike prosedyrer som er kjent på fagområdet kan bli benyttet i produksjonen av disse antistoffene.

Som eksempel kan ulike vertsdyr bli immunisert for produksjon av polyklonale antistoffer ved injeksjon med ethvert kimært peptid eller JNK-inhibitorsekvens som definert ovenfor. Ulike adjuvaner kan bli benyttet derved for å øke den immunologiske responsen som inkluderer, men er ikke begrenset til, Freund's (kimplott og ikke-komplett) adjuvans, mineralgeler (f.eks. aluminiumhydroksid), overflateaktive stoffer (f.eks. lysolechitin, pluronic-polyoler, polyanioner, peptider, olje-emulsjoner, dinitrofenol osv.), CpG, polymerer, Pluronics, og humane adjuvaner slik som Bacille Calmette-Guerin og *Corynebacterium parvum*.

For fremstilling av monoklonale antistoffer rettet mot et kimært peptid eller en JNK-inhibitorsekvens som definert ovenfor kan enhver teknikk bli benyttet som tilveiebringer produksjonen av antistoffmolekyler ved kontinuerlige cellelinjekulturer. Slike teknikker inkluderer, men er ikke begrenset til, hybridomteknikken (se Kohler og Milstein, 1975, Nature 256: 495-497), triomteknikken, den humane B-celle-hybridomteknikken (se Kozbor et al., 1983, Immunol. Today 4:72) og EBV-hybridomteknikken for å produsere humane, monoklonale antistoffer (se Cole et al., 1985, I: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., s.77-96). Humane, monoklonale antistoffer kan bli benyttet i utøvelsen av foreliggende oppfinnelse og kan bli produsert ved anvendelsen av humane hybridomer (se Cote et al., 1983, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 80:2026-2030) eller ved å transformere humane B-celler med Epstein-Barr-virus in vitro (se Cole et al., 1985, I: Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., s.77-96).

Teknikker kan bli tilpasset for produksjonen av enkeltkjede-antistoffer spesifikke for JNK-inhibitorsekvensene og/eller de kimære peptidene (se f.eks. US patent nr. 4,946,778) som definert her. I tillegg kan fremgangsmåter bli tilpasset konstruksjonen av Fab-ekspresjonsbiblioteker (se f.eks. Huse et al., 1989, Science 246: 1275-1281) for å tillate rask og effektiv identifisering av monoklonale Fab-fragmenter med den ønskede spesifisiteten for disse JNK-inhibitorsekvensene og/eller kimære peptidene. Ikke-humane antistoffer kan bli «humanisert» med

teknikker som er velkjente på fagområdet (se f.eks. US patent nr. 5,225,539).

Antistoffragmenter som inneholder idiotypene til en JNK-inhibitorsekvens og/eller kimært peptid som definert her kan bli produsert med teknikker som er kjent på fagområdet, inkludert f.eks. (i) et F(ab')₂-fragment produsert ved pepsinfordøyning av et antistoffmolekyl, (ii) et Fab-fragment generert ved å redusere disulfidbroene til et F(ab')₂-fragment, (iii) et Fab-fragment generert ved behandlingen av antistoffmolekylet med papain og et reduserende middel og (iv) Fv-fragmenter.

Fremgangsmåter som kan bli benyttet til screeningen av antistoffer og som innehar den ønskede spesifisiteten inkluderer, men er ikke begrenset til, enzyumbundet immunsorbent analyse (ELISA) og andre immunologisk medierte teknikker som er kjent på fagområdet. I en spesifikk utførelsesform blir seleksjon av antistoffer som er spesifikke mot en spesifikk epitop på en JNK-inhibitorsekvens og/eller et kimært peptid som definert her (f.eks. et fragment derav som typisk omfatter en lengde på fra 5 til 20, fortrinnsvis 8 til 18 og mest foretrukket 8 til 11 aminosyrer) fremmet ved generering av hybridomer som binder til fragmentet av en JNK-inhibitorsekvens og/eller et kimært peptid, som definert her, som innehar en slik epitop. Disse antistoffene som er spesifikke for en epitop som definert ovenfor blir også tilveiebrakt her.

Antistoffene som definert her kan bli benyttet i fremgangsmåter som er kjent på fagområdet med referanse til lokaliseringen og/eller kvantifiseringen av en JNK-inhibitorsekvens (og/eller tilsvarende et kimært peptid som definert ovenfor), f.eks. for anvendelse i måling av nivåer av peptidet i passende fysiologiske prøver, for anvendelse i diagnostiske fremgangsmåter, eller for anvendelse i synliggjøring av peptidet og liknende.

JNK-inhibitorsekvensene, de kimære peptidene og/eller antistoffene som definert ifølge oppfinnelsen kan bli formulert i en farmasøytisk sammensetning, som kan bli benyttet i forebyggingen eller behandlingen av enhver sykdom som definert her, spesielt i forebyggingen eller behandlingen av sykdommer eller forstyrrelser som er sterkt relatert til JNK-signalisering som definert her. Typisk inkluderer en slik farmasøytisk sammensetning som benyttes ifølge foreliggende oppfinnelse som en aktiv komponent f.eks.: (i) enhver én eller flere av JNK-inhibitorsekvensene og/eller de kimære peptidene som definert ovenfor, og/eller varianter, fragmenter eller derivater derav, spesielt JNK-inhibitorsekvenser ifølge SEQ ID nr. 2 og/eller kimære peptider ifølge enhver av sekvensene SEQ ID nr. 11 og 30 til 32, og/eller JNK-inhibitorsekvenser ifølge SEQ ID nr. 2 som omfatter en trafikkeringssekvens ifølge enhver av SEQ ID nr. 5 til 8 og 21 til 22, eller varianter eller fragmenter derav innenfor definisjonene ovenfor.

Ifølge en foretrukket utførelsesform omfatter en slik farmasøytisk sammensetning benyttet ifølge foreliggende oppfinnelse typisk en trygg og effektiv mengde av en komponent som definert ovenfor, fortrinnsvis minst én JNK-

inhibitorsekvens ifølge SEQ ID nr. 2 og/eller minst ett kimært peptid ifølge enhver av sekvensene SEQ ID nr. 11 og 30 til 32, og/eller minst én JNK-inhibitorsekvens ifølge SEQ ID nr. 2 som omfatter en trafikkeringssekvens ifølge enhver av SEQ ID nr. 5 til 8 og 21 til 22, eller varianter eller fragmenter derav innenfor definisjonene ovenfor.

Oppfinnerne av foreliggende oppfinnelse fant i tillegg at henholdsvis JNK-inhibitorsekvensen og det kimære peptidet, som definert her, oppviser en spesielt god opptaksrate inn i celler involvert i sykdommene ifølge foreliggende oppfinnelse. Derfor kan mengden av henholdsvis en JNK-inhibitorsekvens og kimært peptid i den farmasøytiske sammensetningen som skal bli administrert til et individ, uten å være begrenset til dette, ha en svært lav dose. Slik kan dosen være mye lavere enn for peptidlegemidler som er kjent på fagområdet, slik som DTS-108 (Florence Meyer-Losic et al., Clin. Cancer Res. 2008, 2145-53). Dette har flere positive aspekter, f.eks. en reduksjon av potensielle sidereaksjoner og en reduksjon av kostnader.

Fortrinnsvis ligger dosen (per kg kroppsvekt) i området opp til 10 mmol/kg, fortrinnsvis opp til 1 mmol/kg, mer foretrukket opp til 100 µmol/kg, enda mer foretrukket opp til 10 µmol/kg, enda mer foretrukket opp til 1 µmol/kg, enda mer foretrukket opp til 100 nmol/kg, mest foretrukket opp til 50 nmol/kg.

Slik kan doseringsområdet fortrinnsvis være fra omtrent 1 pmol/kg til omtrent 1 mmol/kg, fra omtrent 10 pmol/kg til omtrent 0,1 mmol/kg, fra omtrent 100 pmol/kg til omtrent 0,01 mmol/kg, fra omtrent 50 pmol/kg til omtrent 1 µmol/kg, fra omtrent 100 pmol/kg til omtrent 500 nmol/kg, fra omtrent 200 pmol/kg til omtrent 300 nmol/kg, fra omtrent 300 pmol/kg til omtrent 100 nmol/kg, fra omtrent 500 pmol/kg til omtrent 50 nmol/kg, fra omtrent 750 pmol/kg til omtrent 30 nmol/kg, fra omtrent 250 pmol/kg til omtrent 5 nmol/kg, fra omtrent 1 nmol/kg til omtrent 10 nmol/kg, eller en kombinasjon av hvilke to som helst av nevnte verdier.

I denne konteksten er forskriving for behandling, f.eks. avgjørelser vedrørende dosering osv., når den farmasøytiske sammensetningen ovenfor benyttes, typisk innenfor ansvarsområdet til generelle utøvere og andre medisinske doktorer, og tar typisk hensyn til forstyrrelsen som skal bli behandlet, tilstanden til den individuelle pasienten, leveringsstedet, fremgangsmåten for administrering og andre faktorer som er kjent for utøvere. Eksempler på teknikker og protokoller nevnt ovenfor kan bli funnet i Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. utgave, Osol, A. (red.), 1980. Dermed betyr en «sikker og effektiv mengde» som definert ovenfor for komponenter av de farmasøytiske sammensetningene som benyttet ifølge foreliggende oppfinnelse en mengde med hver av eller alle disse komponentene som er tilstrekkelig til signifikant å indusere en positiv modifisering av sykdommer eller forstyrrelser som er sterkt relatert til JNK-signalisering som definert her. Samtidig er likevel en «sikker og effektiv mengde» liten nok til å

unngå alvorlige bivirkninger, det vil si å muliggjøre et fornuftig forhold mellom fortrinn og risiko. Bestemmelsen av disse begrensningene ligger typisk innenfor omfanget av fornuftig medisinsk bedømmelse. En «sikker og effektiv mengde» av en slik komponent vil variere i sammenheng med den spesifikke tilstanden som skal 5 behandles og også med alderen og den fysiske tilstanden til pasienten som skal behandles, alvorligheten av tilstanden, varigheten av behandlingen, karakteren til den tilhørende terapien, med den spesifikke farmasøytiske bærer som benyttes, og liknende faktorer, innenfor kunnskapen og erfaringen til den veiledende doktoren. De farmasøytiske sammensetningene ifølge oppfinnelsen kan bli benyttet i 10 overensstemmelse med oppfinnelsen til humanmedisinske og også veterinærmedisinske formål.

Den farmasøytiske sammensetningen som benyttet ifølge foreliggende oppfinnelse kan videre i tillegg til ett av disse stoffene omfatte en (kompatibel) farmasøytisk akseptabel bærer, eksipiens, buffer, stabilisator eller andre materialer 15 som er velkjente for fagfolk på området.

I denne konteksten inkluderer uttrykket «(kompatibel) farmasøytisk akseptabel bærer» fortrinnsvis den flytende eller ikke-flytende basisen for sammensetningen. Uttrykket «kompatibel» betyr at bestanddelene av den farmasøytiske sammensetningen som benyttet her er i stand til å bli blandet med den 20 farmasøytisk aktive komponenten som definert ovenfor og med én annen komponent på en slik måte at det ikke forekommer noen interaksjon som vil vesentlig redusere den farmasøytiske effektiviteten til sammensetningen ved vanlige anvendelsesbetingelser. Farmasøytisk akseptable bærere må selvfølgelig ha tilstrekkelig høy renhet og tilstrekkelig lav toksisitet for å gjøre dem 25 hensiktsmessige for administrering til en person som skal behandles.

Dersom den farmasøytiske sammensetningen som benyttet her blir tilveiebrakt i flytende form vil den farmasøytisk akseptable bæreren typisk omfatte én eller flere (kompatible) farmasøytisk akseptable flytende bærere. Sammensetningen kan som (kompatible) farmasøytisk akseptable flytende bærere 30 omfatte f.eks. pyrogenfritt vann, isoton saltløsning eller bufrede (vandige) løsninger, f.eks. fosfatbufrede, sitratbufrede løsninger osv., vegetabiliske oljer slik som f.eks. jordnøttolje, bomullsfrøolje, sesamolje, olivenolje, maisolje og olje fra theobroma, polyoler slik som f.eks. polypropylenglykol, glyserol, sorbitol, mannitol og polyetylenglykol, alginsyre osv. Spesielt for injeksjon av den farmasøytiske 35 sammensetningen som benyttet her kan en buffer, fortrinnsvis en vandig buffer, bli benyttet.

Dersom den farmasøytiske sammensetningen som benyttet her er tilveiebrakt i fast form vil den farmasøytisk akseptable bæreren typisk omfatte én eller flere (kompatible) farmasøytisk akseptable faste bærere. Sammensetningen kan omfatte 40 som (kompatible) farmasøytisk akseptable faste bærere, f.eks. ett eller flere

kompatible faste eller flytende fyllmidler eller fortynningsmidler eller innkapslende forbindelser kan bli benyttet i tillegg, som er passende for administrering til en person. Noen eksempler på slike (kompatible) farmasøytisk akseptable faste bærere er f.eks. sukkertyper slik som f.eks. laktose, glukose og sukrose, stivelser slik som

5 f.eks. maisstivelse eller potetstivelse, cellulose og dens derivater slik som f.eks. natriumkarboksymetylcellulose, etylcellulose, celluloseacetat, pulverisert tragant, malt, gelatin, talg, faste glidemidler slik som f.eks. stearinsyre, magnesiumstearat, kalsiumsulfat osv.

Den nøyaktige karakteren til den (kompatible) farmasøytisk akseptable

10 bæreren eller annet materiale kan være avhengig av administreringsruten. Valget av en (kompatibel) farmasøytisk akseptabel bærer kan slik i prinsippet bli bestemt ved måten den farmasøytiske sammensetningen som benyttet ifølge oppfinnelsen blir administrert på. Den farmasøytiske sammensetningen som benyttet ifølge

15 oppfinnelsen kan bli administrert f.eks. systemisk. Administreringsruter inkluderer f.eks. parenteralt (f.eks. via injeksjon), slik som intravenøst, intramuskulært, subkutant, intradermalt eller transdermalt osv., enteralt slik som oralt eller rektalt osv., topisk slik som nasalt eller intranasalt osv., eller på andre måter slik som epidermalt eller ved plasterlevering.

Den passende mengden av den farmasøytiske sammensetningen som skal

20 benyttes kan bli bestemt ved hjelp av rutinemessige eksperimenter med dyremodeller. Slike modeller inkluderer, uten å antyde noen begrensning, kanin-, får-, mus-, rotte-, hund- og ikke-humane primatmodeller. Foretrukne enhetsdoseringsformer for injeksjon inkluderer sterile løsninger av vann, fysiologisk saltløsning eller blandinger derav. pH i slike løsninger bør bli justert til

25 omtrent 7,4. Passende bærere for injeksjon inkluderer hydrogeler, innretninger for kontrollert eller forsinket frigjøring, polymelkesyre og kollagenmatriser. Passende farmasøytisk akseptable bærere for topisk applikasjon inkluderer de som er hensiktsmessige for anvendelse i lotion, kremer, geler og liknende. Dersom forbindelsen skal administreres peroralt er tabletter, kapsler og liknende den

30 foretrukne enhetsdoseringsformen. De farmasøytisk akseptable bærerne for fremstillingen av enhetsdoseringsformer, som kan bli benyttet til oral administrering, er velkjente på fagområdet. Valget derav vil være avhengig av sekundære overveielser slik som smak, kostnad og lagringsevne, som ikke er avgjørende for formålene med foreliggende oppfinnelse, og kan bli utført uten

35 vanskelighet av en fagmann på området.

Farmasøytiske sammensetninger for oral administrering kan foreligge i tablett-, kapsel-, pulver- eller flytende form. En tablett kan inkludere en fast bærer som definert ovenfor, slik som gelatin, og eventuelt en adjuvans. Flytende farmasøytiske sammensetninger til oral administrering kan generelt inkludere en

40 flytende bærer som definert ovenfor, slik som vann, petroleum, animalske eller vegetabiliske oljer, mineralolje eller syntetisk olje. Fysiologisk saltløsning,

dekstrose eller annen sakkaridløsning eller glykoler slik som etylenglykol, propylenglykol eller polyetylglykol kan bli inkludert.

For intravenøs, kutan eller subkutan injeksjon, eller injeksjon på stedet for plage vil den aktive ingrediensen foreligge i formen av en parenteralt akseptabel vandig løsning som er pyrogenfri og har en passende pH, isotonisitet og stabilitet. De med relevant erfaring på fagområdet er godt i stand til å fremstille passende løsninger ved f.eks. å benytte isotone vehikler slik som natriumkloridinjeksjon, Ringers løsning, laktert Ringers løsning. Preserveringsmidler, stabilisatorer, buffere, antioksidanter og/eller andre tilsetningsstoffer kan bli inkludert etter behov. Uansett om det er et polypeptid, peptid, eller nukleinsyremolekyl, annen farmasøytisk nyttig forbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse som skal gis til et individ, så er administrering fortrinnsvis i en «profylaktisk effektiv mengde» eller en «terapeutisk effektiv mengde», der dette er tilstrekkelig til å vise seg å være til gagn for individet. Den faktiske mengden som administreres, og raten og tidsforløpet for administrering, vil være avhengig av karakteren og alvorligheten av det som blir behandlet.

Forebygging og/eller behandling av en sykdom som definert her inkluderer typisk administrering av en farmasøytisk sammensetning som definert ovenfor. Uttrykket «modulere» inkluderer undertrykkelsen av JNK når den overuttrykkes i enhver av sykdommene ovenfor. Det inkluderer også undertrykkelse av fosorylering av c-jun, ATF2 eller NFAT4 i enhver av sykdommene ovenfor, f.eks. ved å benytte minst én JNK-inhibitorsekvens ifølge SEQ ID nr. 2 og/eller minst ett kimært peptid ifølge SEQ ID nr. 30 til 32 og/eller minst én JNK-inhibitorsekvens ifølge SEQ ID nr. 2 omfattende en trafikkeringssekvens ifølge enhver av SEQ ID nr. 5 til 8 og 21-22, eller varianter eller fragmenter derav innenfor definisjonene ovenfor, som en kompetitiv inhibitor av det naturlige c-jun-, ATF2- og NFAT4-bindingssitet i en celle. Uttrykket «modulere» inkluderer også undertrykkelse av hetero- og homomere komplekser av transkripsjonsfaktorer sammensatt av, uten begrensning til dette, c-jun, ATF2 eller NFAT4 og deres relaterte partnere, slik som f.eks. AP-1-kompleks som utgjøres av c-jun, AFT2 og c-fos. Når en sykdom eller forstyrrelse som er sterkt relatert til JNK-signalisering som definert ovenfor er assosiert med JNK-overuttrykking så kan slike undertrykkende JNK-inhibitorsekvenser bli introdusert til en celle. I noen tilfeller kan «modulere» da inkludere økningen av JNK-uttrykking, f.eks. ved anvendelse av et IB-peptidspesifikt antistoff som blokkerer bindingen av et IB-peptid til JNK, for slik å forhindre JNK-inhibering ved det IB-relaterte peptidet. Forebygging og/eller behandling av et individ med den farmasøytiske sammensetningen som tilkjennegett ovenfor kan typisk bli oppnådd ved administrering (in vivo) av en («terapeutisk effektiv») mengde av nevnte farmasøytiske sammensetning til et individ, der individet f.eks. kan være ethvert pattedyr, f.eks. et menneske, en primat, mus, rotte, hund, katt, ku, hest eller svin. Uttrykket «terapeutisk effektiv» betyr at den aktive

komponenten i den farmasøytiske sammensetningen foreligger i tilstrekkelig mengde til å lindre sykdommen eller forstyrrelsen som er sterkt relatert til JNK-signalisering som definert ovenfor.

Dermed kan ethvert peptid som definert ovenfor, f.eks. minst én JNK-inhibitorsekvens ifølge SEQ ID nr. 2 og/eller minst ett kimært peptid ifølge SEQ ID nr. 11, 30 til 32 og/eller minst én JNK-inhibitorsekvens ifølge SEQ ID nr. 2 omfattende en trafikkeringssekvens ifølge enhver av SEQ ID nr. 5 til 8 og 21-22, eller varianter eller fragmenter derav innenfor definisjonene ovenfor, bli benyttet i en spesifikk utførelsesform av foreliggende oppfinnelse for å behandle sykdommer som er sterkt relatert til JNK-signalisering som definert ovenfor, f.eks. ved modulering av aktiverte JNK-signaliseringsveier.

For behandling av sykdommer som nevnt her kan målrettede terapier bli benyttet for å levere JNK-inhibitorsekvensen og/eller de kimære peptidene, som definert ovenfor mer spesifikt for visse celletyper, ved anvendelsen av et målrettede systemer slik som (et målrettet) antistoff eller cellespesifikke ligander. Antistoffer benyttet til målretting er typisk spesifikke for celleoverflateproteiner på celler assosiert med enhver av sykdommene definert nedenfor. For eksemplets del kan disse antistoffene være rettet på celleoverflateantistoffer slik som f.eks. B-celleassosierte overflateproteiner slik som MHC-klasse-II-DR-protein, CD18 (LFA-1-betakjede), CD45RO, CD40 eller Bgp95 eller celleoverflateproteiner valgt fra f.eks. CD2, CD4, CD5, CD7, CD8, CD9, CD 10, CD13, CD16, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD30, CD33, CD34, CD38, CD39, CD40, CD43, CD45, CD52, CD56, CD68, CD71, CD138 osv. Målrettede konstruksjoner kan typisk bli klargjort ved kovalent binding av JNK-inhibitorsekvensene og de kimære peptidene som definert her ifølge oppfinnelsen til et antistoff spesifikt for et celleoverflateprotein eller ved binding av en cellespesifikk ligand. Proteiner kan f.eks. bli bundet til et slikt antistoff eller kan bli festet dertil ved en peptidbinding eller med kjemisk kobling, kryssbinding osv. Den målrettede terapien kan deretter bli utført ved å administrere den målrettede konstruksjonen i en farmasøytisk effektiv mengde til en pasient ved hjelp av enhver av administreringsrutene som er definert nedenfor, f.eks. intraperitonalt, nasalt, intravenøst, oralt og ved plasterlevering. Fortrinnsvis kan JNK-inhibitorsekvensene eller de kimære peptidene som definert her ifølge oppfinnelsen, der disse er festet til de målrettede antistoffene eller de cellespesifikke ligandene som definert ovenfor, bli frigjort in vitro eller in vivo, f.eks. ved hydrolyse av den kovalente bindingen, ved peptidaser eller ved enhver annen passende fremgangsmåte. Alternativt, dersom JNK-inhibitorsekvensene, de kimære peptidene eller nukleinsyrene som definert her ifølge oppfinnelsen er festet til en liten cellespesifikk ligand, så er det ikke sikkert frigjøring av liganden er mulig. Dersom de foreligger på celleoverflaten kan de kimære peptidene trenge inn i cellen ved hjelp av aktiviteten til sin trafikkeringssekvens. Målretting kan være ønskelig av en mengde grunner, f.eks.

dersom JNK-inhibitorsekvensene og de kimære peptidene som definert her ifølge oppfinnelsen er uakseptabelt toksiske eller dersom det på annen måte ville kreve en for stor dose.

Alternativt kan JNK-inhibitorsekvensene og/eller de kimære peptidene som definert her bli administrert i en forløperform ved hjelp av et antistoff. Disse JNK-inhibitorsekvensene og/eller de kimære peptidene kan da bli konvertert til den aktive formen ved et aktiverende middel produsert i, eller rettet mot, cellene som skal behandles. Denne typen tilnærming er noen ganger kjent som ADEPT (antistoffrettet enzym-prolegemiddelterapi) som involverer målretting av det aktiverende middelet til cellene ved konjugering til et cellespesifikt antistoff.

Ifølge en ytterligere utførelsesform kan JNK-inhibitorsekvensene, de kimære peptidene eller antistoffer mot JNK-inhibitorsekvensene eller de kimære peptidene som definert her, f.eks. en JNK-inhibitorsekvens ifølge SEQ ID nr. 2 og/eller et kimært peptid ifølge SEQ ID nr. 30 til 32 og/eller en JNK-inhibitorsekvens ifølge SEQ ID nr. 2 omfattende en trafikkeringssekvens ifølge enhver av SEQ ID nr. 5 til 8 og 21-22, eller varianter eller fragmenter derav innenfor definisjonene ovenfor, bli benyttet i (in vitro) analyser (f.eks. immunanalyser) for å påvise, prognostisere, diagnostisere eller overvåke ulike tilstander og sykdomstilstander valgt fra sykdommer eller forstyrrelser som er sterkt relatert til JNK-signalisering som definert ovenfor, eller overvåke behandling derav. Immunanalysene kan bli utført med en fremgangsmåte omfattende å kontakte en prøve avledet fra en pasient med et antistoff mot en JNK-inhibitorsekvens eller et kimært peptid, som definert ovenfor, ved betingelser slik at immunspesifikk binding kan forekomme, og deretter påvise eller måle mengden immunspesifikk binding ved antistoffet. I en spesifikk utførelsesform kan et antistoff spesifikt for en JNK-inhibitorsekvens eller et kimært peptid bli benyttet for å analysere en vevs- eller serumprøve fra en pasient for tilstedeværelsen av JNK eller en JNK-inhibitorsekvens, der et avvikende nivå av JNK er indikativt på en sykdomstilstand. Immunanalysene som kan bli benyttet inkluderer, men er ikke begrenset til, kompetitive og ikke-kompetitive analysesystemer ved å benytte teknikker slik som Western-blotting, radioimmunanalyser (RIA), enzyumbundet immunsorbent analyse (ELISA), «sandwich»-immunanalyser, immunpresipiteringsanalyser, presiptinreaksjoner, geldiffusjon-presiptinreaksjoner, immundiffusjonsanalyser, agglutineringsanalyser, fluorescens-immunanalyser, komplementfikseringsanalyser, immunoradiometriske analyser og protein-A-immunanalyser osv. Alternativt kan (in vitro) analyser bli utført ved levering av JNK-inhibitorsekvensene, de kimære peptidene eller antistoffene til JNK-inhibitorsekvensene eller til kimære peptider, som definert ovenfor, for å målsøke celler som typisk er valgt fra f.eks. dyrkede dyreceller, humane celler eller mikroorganismer, og for å overvåke celleresponsen ved biofysiske fremgangsmåter som typisk er kjent for en fagmann. Måcellene som typisk benyttes der kan være dyrkede celler (in vitro) eller celler in vivo, dvs., celler

som utgjør organene eller vevene i levende dyr eller mennesker, eller mikroorganismer som er funnet i levende dyr eller mennesker.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer ytterligere anvendelsen av sett for diagnostiske eller terapeutiske formål, spesielt for behandlingen, forebyggingen eller overvåkingen av sykdommer og forstyrrelser som er sterkt relatert til JNK-signalisering som definert ovenfor, der settet inkluderer én eller flere beholdere inneholdende JNK-inhibitorsekvenser, kimære peptider og/eller antistoffer mot disse JNK-inhibitorsekvensene eller mot kimære peptider som definert ovenfor, f.eks. et anti-JNK-inhibitorsekvensantistoff mot en JNK-inhibitorsekvens ifølge SEQ ID nr. 2, mot et kimært peptid ifølge SEQ ID nr. 11, 30 til 32, mot en JNK-inhibitorsekvens ifølge SEQ ID nr. 2 som omfatter en trafikkeringssekvens ifølge enhver av SEQ ID nr. 5 til 8 og 21-22, eller mot varianter eller fragmenter derav innenfor definisjonene ovenfor, eller et slikt anti-JNK-inhibitorsekvensantistoff og eventuelt en merket bindingspartner for antistoffet. Merket som derved er inkorporert i antistoffet kan inkludere, men er ikke begrenset til, en kjemiluminescensenhet, enzymatisk enhet, fluorescensenhet, kolorimetrisk enhet eller radioaktiv enhet. Settet kan eventuelt ytterligere omfatte en forhåndsbestemt mengde av en renset JNK-inhibitorsekvens som definert ovenfor eller et kimært peptid som definert ovenfor, til anvendelse som en diagnostisk standard, eller kontroll i analysene for formålene ovenfor.

Dersom ikke annet er definert har alle tekniske og vitenskapelige uttrykk her den samme betydningen som vanligvis forstås av en fagmann på området. Selv om fremgangsmåter og materialer tilsvarende eller ekvivalente med de som er beskrevet her kan bli benyttet i utøvelsen av eller testingen av foreliggende oppfinnelse, passende fremgangsmåter og materialer er beskrevet nedenfor. I tilfelle av konflikt vil foreliggende beskrivelse, inkludert definisjoner, styre. I tillegg er materialene, fremgangsmåtene og eksemplene kun illustrerende og er ikke ment å være begrensende. Andre trekk og fortrinn ved oppfinnelsen vil være åpenbare ut fra den følgende detaljerte beskrivelsen og kravene.

30 **Beskrivelse av figurene**

Figurene 1A-C er diagrammer som viser sammenstillinger av konserverte JBD-domeneregioner i de indikerte transkripsjonsfaktorene. JNK-inhibitorsekvenser benyttet her ble identifisert ved å utføre sekvenssammenstillinger. Resultatene av denne sammenstillingen er eksempelmessig vist på figurene 1A-C. Figur 1A viser regionen med høyest homologi mellom JBD'ene for IB1, IB2, c-jun og ATF2. Panel B viser aminosyresekvensen til JBD'ene L-IB1(s) og L-IB1 av sammenligningsgrunner. Fult konserverte rester er indikert med asterisker, mens rester endret til Ala i GFP-JBD_{23Mut}-vektoren er indikert med åpne sirkler. Figur 1C viser aminosyresekvensene for kimære proteiner som inkluderer en JNK-inhibitorsekvens og en trafikkeringssekvens. I eksemplet som er vist er

trafikkeringssekvensen avledet fra det humane immunsviktvirus (HIV)-TAT-polypeptidet, og JNK-inhibitorsekvensen er avledet fra et IB1(s)-polypeptid. Human-, mus- og rotte-sekvenser er identiske i panelene B og C.

- 5 **Figur 2** er et diagram som viser sekvenser for generiske TAT-IB-fusjonspeptider fra menneske, mus og rotte.

10 **Figur 3** viser resultatene av inhiberingen av endogen JNK-aktivitet i HepG2-celler ved å benytte fusjonspeptider ifølge SEQ ID nr. 9 og 11 i en enkeltbrønn-tilnærming. Slik det fremgår på figur 3, spesielt på panel d på figur 3, så inhiberer D-TAT-IB1(s) ifølge SEQ ID nr. 11 (her forkortet som D-JNKI) effektivt JNK-aktivitet, til og med bedre enn L-TAT-IB1(s) ifølge SEQ ID nr. 9 (her forkortet L-JNKI).

15 **Figur 4** viser resultatet av den cytotoksiske analysen med en kimær JNK-inhibitorsekvens ifølge SEQ ID nr. 11, også betegnet XG-102 (se eksempel 12). Slik det fremgår er ikke XG-102 (SEQ ID nr. 11) cytotoksisk for HFFs. HFFs ble sådd ut på 96-brønners vevskulturplater. Medium inneholdende DMSO (samme nivå som 5 µM legemiddelet), eller XG-102 ved 1, 2 og 5 µM ble tilsatt i 24 t. Neutral Red ble
20 kort tilsatt, cellene ble fiksert, og deretter ble fargestoffet ekstrahert. Absorbans ble målt ved 540 nm. Ingen forskjell ble observert mellom DMSO og 1 µM XG-102.

25 **Figur 5** viser resultatene av plakk-reduksjonsanalysen utført for testing av aktivitet for en kimær JNK-inhibitorsekvens ifølge SEQ ID nr. 11, også betegnet XG-102 mot Varizella Zoster-virus (VZV) (se eksempel 12). Slik det fremgår er XG-102 (SEQ ID nr. 11) en sterk inhibitor av Varizella Zoster-virus (VZV), spesielt ved konsentrasjoner på 0,5 µM og 1 µM.

30 **Figur 6** viser resultater av inhiberingen av Varizella Zoster-virus (VZV) i dyrkede, humane fibroblaster ved å benytte en kimær JNK-inhibitorsekvens ifølge SEQ ID nr. 11, også betegnet XG-102 (se eksempel 12). Slik det fremgår viser VZV en signifikant sensitivitet for XG-102 (SEQ ID nr. 11). VZV-replikasjon var normal i nærværet av den negative kontrollen (XG-100, Tat-peptidet alene). XG-102 (SEQ ID nr. 11) forhindret slik VZV-replikasjon allerede ved den laveste konsentrasjonen
35 som ble testet på 0,25 µM.

Figur 7 komparativt eksempel som viser aktiviteten til XG-102 (SEQ ID nr. 11) på cellerekuttering i lunge ved å benytte MPO i lungehomogenisering i behandlingen av kronisk obstruktiv pulmonal sykdom (COPD) ved å benytte en dyremodell med bleomycinindusert akutt lungeinflammasjon. Slik det fremgår ble ikke MPO signifikant indusert etter administrering av bleomycin. XG-102 (SEQ ID nr. 11) hadde slik kun liten effekt på MPO-nivåene i lungen.

Figur 8 sammenligningseksempel som viser aktiviteten av XG-102 (SEQ ID nr. 11) på TNF-nivåer i behandlingen av kronisk obstruktiv pulmonal sykdom (COPD) ved å benytte en dyremodell med bleomycinindusert akutt lungefibrose. Når TNF-nivåer ble målt ble en trend mot reduksjon av TNF-nivået i BALF etter administrering av XG-102 (SEQ ID nr. 11) observert i BLM-modellen. TNF-nivåer er svært lave etter BLM.

Figur 9 sammenligningseksempel som viser aktiviteten til XG-102 (SEQ ID nr. 11) på cellerekuttering i bronkiealvoleært lavage-rom i behandlingen av kronisk obstruktiv pulmonal sykdom (COPD) ved å benytte en dyremodell med bleomycinindusert akutt lungefibrose. Ved 0,1 mg/kg reduserer XG-102 (SEQ ID nr. 11) signifikant lymfocyttrekutteringen og antallet totale celler rekruttert i det inflammatoriske stadiet kjennetegnet på dette tidspunktet ved lymfocyttrekutteringen. Ved 0,1 mg/kg forsterker XG-102 (SEQ ID nr. 11) lymfocyttrekutteringen eller antallet totale celler inn i det bronkiealvoleære rommet (n=5 mus per gruppe, *, $p<0,05$, ** $p<0,001$).

Figur 10 sammenligningseksempel som beskriver resultatene av histologien i behandlingen av kronisk obstruktiv pulmonal sykdom (COPD) ved å benytte en dyremodell med bleomycinindusert akutt lungefibrose. Seksjoner på 3 μ m med lunge ble farget med hematoxylin og eosin. Akkumulering av inflammatoriske celler, fibrotiske områder, tap av lungearkitektur ble observert 10 dager etter BLM-administrering. Slik det fremgår blir en minskning av disse parameterne observert etter administrering av XG-102 ved den lave dosen (0,001 mg/kg) men ikke med den høye dosen (0,1 mg/kg).

Figur 11 viser effektene av en behandling med XG-102 (SEQ ID nr. 11) på hjernenivåer av $A\beta_{1-40}$ og $A\beta_{1-42}$ bestemt med ELISA. Grafene representerer nivåene av $A\beta_{1-40}$ (venstre) og $A\beta_{1-42}$ (høyre) bestemt med ELISA i ulike hjernehomogenatfraksjoner med Triton-40 og Triton-42. Data er representert som scattered-dot-plot med individuelle verdier (svart) og gruppesnitt $\pm$ SEM.

Signifikante forskjeller er merket med asterisker (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Signifikante gruppeforskjeller ble observert kun i Triton X-100-fraksjon for $A\beta_{1-42}$.

Figur 12 viser effektene av en behandling med XG-102 (SEQ ID nr. 11) på nivåer av CSF- $A\beta_{1-40}$ og $-A\beta_{1-42}$ bestemt ved ELISA. . Grafene representerer nivåene av $A\beta_{1-40}$ (venstre) og $A\beta_{1-42}$ (høyre) bestemt med ELISA i CSF. Data er representert som scattered-dot-plot med individuelle verdier (svart) og gruppesnitt $\pm$ SEM. Signifikante forskjeller er merket med asterisker (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Behandling med XG-102 (SEQ ID nr. 11) i begge doseringer førte til en signifikant minskning av $A\beta_{1-40}$ og $A\beta_{1-42}$ i CSF.

Figur 13 viser behandlingseffektene på det Thioflavin-S-fargingsvisualiserte antallet plakk i hAPP-Tg-musene: Grafene representerer antallet Thioflavin-S-fargede plakk per mm^2 i cortex og hippocampus. XG-102 (SEQ ID nr. 11)-behandling reduserte antallet plakk negativt doseavhengig i hippocampus. Data er representert som gjennomsnitt $\pm$ SEM. N=8 per gruppe. *... $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Figur 14 viser behandlingseffektene på det Thioflavin-S-visualiserte plakkområdet (%) i hAPP-Tg-musene: Grafene representerer plakkarealet (%) av Thioflavin-S-positive plakk i cortex og hippocampus. XG-102 (SEQ ID nr. 11) reduserte signifikant området oppnådd med plakk i hippocampus. Data er representert som $\pm$ SEM. N=8 per gruppe.

Figur 15 sammenligningseksempel som beskriver resultatet av administreringen av XG-102 (SEQ ID nr. 11) på fastende blodglukosenivåer (absolutte og relative) i dyremodellen for diabetes type 2. Fastende blodglukose ble målt hver tredje dag inntil dag 68 og på regulær basis inntil terminering på dag 111 i gruppene A og C. Vi observert en klar og signifikant ($p < 0,001$) minskning av nivået for fastende blodglukose i de diabetiske db/db-musene behandlet med XG-102 (SEQ ID nr. 11) (10 mg/kg) sammenlignet med vehikkelkontroll. De fastende blodglukosenivåene hos musene behandlet med XG-102 (SEQ ID nr. 11) (10 mg/kg) nådde et lavt platå på omtrent 5 mmol/L. Denne effekten var synlig etter 14 dager med dosering og varte gjennom hele undersøkelsen, og slik gjennom hele utskyllingsperioden fra dag 21 til dag 111. I motsatt fall observert vi ingen effekt med lav dose av XG-102 (SEQ ID nr. 11) (1 mg/kg) i løpet av 28 dager med dosering.

Figur 16 sammenligningseksempel som beskriver resultatene av administreringen av XG-102 (SEQ ID nr. 11) (10 mg/kg) på kroppsvekt i dyremodellen for diabetes type 2. Vi observerte en klar og signifikant ($p < 0,001$) forhindring av kroppsvektøkning hos mus behandlet med XG-102 (SEQ ID nr. 11) (10 mg/kg) sammenlignet med vehikkelkontroll. Effekten var synlig fra dag 28 med dosering og vedvarte inntil termineringen på dag 111. I motsetning til dette observerte vi ingen effekt med lav dose av XG-102 (SEQ ID nr. 11) (1 mg/kg) på kroppsvekt i løpet av de 28 dagene med dosering.

Figur 17, 18 sammenligningseksempel som beskriver effekten av vehikkel eller XG-102 (SEQ ID nr. 11) (10 mg/kg) i dyremodellen for diabetes type 2 på 24 timers mat- og vanninntak, og urin- og fecesproduksjon som målt i metabolske bur på studiedag 68 på figur 17 (g) og 18 (normalisert til g kroppsvekt). Vi observerte ingen signifikante effekter av XG-102 (SEQ ID nr. 11) (10 mg/kg) på noen av de målte parameterne sammenlignet med vehikkelkontroll selv om en trend mot en minskning av matinntak og urinproduksjon ble observert.

Figur 19, 20 sammenligningseksempel som beskriver effekten av vehikkel eller XG-102 (SEQ ID nr. 11) (10 mg/kg) i dyremodellen for diabetes type 2 som målt på dagene 57, 77 og 108 på plasmanivåer av insulin, MCP-1 og IL6 på figur 19, på plasmanivåer av tPAI-1, TNF og resistin på figur 20. Vi observerte ingen signifikante effekter med XG-102 (SEQ ID nr. 11) (10 mg/kg) på noen av de målte parameterne sammenlignet med vehikkelkontroll bortsett fra nivåene for plasma-resistin, som var signifikant høyere i XG-102 (SEQ ID nr. 11)-behandlede dyr på dagene 77 og 108.

Figur 21 viser effekten av vehikkel eller XG-102 (SEQ ID nr. 11) (10 mg/kg) i dyremodellen for diabetes type 2 på vevsvekt i epididymale, inguinale subkutane og retroperitoneale fettsamlinger. Vi observerte en signifikant minskning av epididymal ($p < 0,05$) og retroperitoneal ($p < 0,01$) fettmasse hos mus behandlet med XG-102 sammenlignet med vehikkelkontroll.

Figur 22 sammenligningseksempel som viser effekten av vehikkel eller XG-102 (SEQ ID nr. 11) (10 mg/kg) i dyremodellen for diabetes type 2 på vevsvekt av hjerne, milt og hjerte. Vi observerte ingen signifikante effekter av XG-102 (SEQ ID nr. 11) (10 mg/kg) på disse parameterne sammenlignet med vehikkelkontroll.

Figur 23 sammenligningseksempel som beskriver effekten av vehikkel eller XG-102 (SEQ ID nr. 11) (10 mg/kg) i dyremodellen for diabetes type 2 på vevsvekt av nyre og lever. Vi observerte en signifikant minskning av nyre ($p < 0,05$) og levermasse ($p < 0,01$) hos mus behandlet med XG-102 (SEQ ID nr. 11) sammenlignet med vehikkelkontroll.

Figur 24 primære dyrkede makrofager ble inkubert med XG-102 (SEQ ID nr. 11) og omfattende vasket. Tilstedeværelse av XG-102 (SEQ ID nr. 11) ble avslørt ved å benytte et spesifikt antistoff mot XG-102. XG-102 blir sterkt inkorporert inn i primære makrofager.

Figur 25 Mus ble behandlet vis tre ulike administreringsruter (s.c., i.v., i.p.) med radiomerkede peptider med C^{14} (1 mg/ml). Dyr ble avlivet 72 timer etter injeksjon og prosessert for immunradiografi. Sagital-seksjoner ble eksponert og avslørte den fremherskende akkumuleringen av XG-102-peptider i leveren, milten og benmargen (XG-102 SEQ ID nr. 11).

Figur 26 viser en immunfarging mot XG-102 (SEQ ID nr. 11) i leveren hos rotter injisert med 1 mg/kg XG-102 i.v. Dyr ble avlivet 24 timer etter injeksjon. Avsløring ble utført ved å benytte DAB-substrat. Denne figuren viser igjen den tydelige akkumuleringen av XG-102 i leveren, og spesielt i Kupffer-cellene (makrofager).

Figur 27 viser inhiberingen av cytokin- og kjemokinfrigjøring i to cellelinjer. XG-102 (SEQ ID nr. 11) inhiberer cytokinfrigjøring i både myeloide og lymfoide cellelinjer, reduserer LPS-indusert TNFa-, IL-6- og MCP-1-frigjøring i THP-1-celler (panel A-C) og PMA- og ionomycinindusert IFNg-, IL-6- og IL-2-produksjon i Jurkat-celler (panel D-F). Kontrollen (XG-101) er mindre effektiv på grunn av sin mindre stabilitet.

Figur 28 viser inhiberingen av cytokinfrigjøring i primære celler. XG-102 (SEQ ID nr. 11) inhiberer også cytokinfrigjøring i primære lymfoide eller myeloide celler, reduserer LPS-indusert TNFa-, IL-6- og Rantes-frigjøring i murine makrofager (panel A-C) og PMA- og ionomycinindusert TNFa- og IFNg-produksjon i murine T-celler (panel D-E). Effekter forekommer ved ikke-cytotoksiske konsentrasjoner av XG-102 (panel F).

Figur 29 viser IB1-cDNA-sekvensen fra rotte og dens predikerte aminosyresekvens (SEQ ID nr. 102)

5 **Figur 30** viser IB1-proteinsekvensen fra rotte kodet for av ekson-intron-grensen i rIB1-gen-speleisedonoren (SEQ ID nr. 103)

Figur 31 viser IB1-proteinsekvensen fra Homo sapiens (SEQ ID nr. 104)

10 **Figur 32** viser IB1-cDNA-sekvensen fra Homo sapiens (SEQ ID nr. 105)

Eksempler

Eksempel 1: Identifisering av JNK-inhibitorsekvenser

15 Aminosyresekvenser som er viktige for effektiv interaksjon med JNK ble identifisert ved sekvenssammenstillinger mellom kjente JNK-bindingsdomener JBD'er. En sekvenssammenligning mellom JBD'er fra IB1 (SEQ ID nr. 13), IB2 (SEQ ID nr. 14), c-jun (SEQ ID nr. 15) og ATF2 (SEQ ID nr. 16) definerte en svakt konserverte sekvens på 8 aminosyrer (se figur 1A). Fordi JBD'ene i IB1 og IB2 er omtrent 100 ganger så effektive som s-Jun og ATF2 i binding av JNK (Dickens et al., Science 277;693 (1997)) ble det resonnert at konserverte rester mellom IB1 og IB2 må være viktige for å gi maksimal binding. Sammenligningen mellom JBD'ene i IB1 og IB2 definerer to blokker på syv og tre aminosyrer som er svært konserverte mellom de to sekvensene.

25 Disse to blokkene er inneholdt i en peptidsekvens på 19 aminosyrer i L-IB1(s) (SEQ ID nr. 1) og er også vist for sammenligningsgrunner i en 23 aminosyrer lang peptidsekvens avledet fra IB1 (SEQ ID nr. 17). Disse sekvensene er vist på figur 1B, streker i L-IB1-sekvensene indikerer et hull i sekvensen for å sammenstille de konserverte restene med L-IB1(s).

30 Eksempel 2: Fremstilling av JNK-inhibitorfusjonsproteiner

JNK-inhibitorfusjonsproteiner ifølge SEQ ID nr. 9 ble syntetisert ved kovalent kobling av den C-terminale enden av SEQ ID nr. 1 til et N-terminalt 10 aminosyrer langt bærerpeptid utledet fra HIV-TAT4g-57 (Vives et al., J. Biol. Chem., 272:16010 (1997)) ifølge SEQ ID nr. 5 via en linker bestående av to prolinrester. Denne linkeren ble benyttet for å muliggjøre maksimal fleksibilitet og forhindre uønskede sekundærstrukturendringer. De basiske konstruksjonene ble

også fremstilt og henholdsvis betegnet L-IB1(s) (SEQ ID nr. 1) og L-TAT (SEQ ID nr. 5).

Kun D-retro-inverse peptider ifølge SEQ ID nr. 1 ble syntetisert tilsvarende. De basiske konstruksjonene ble også fremstilt og henholdsvis betegnet D-IB1(s) (SEQ ID nr. 2) og D-TAT (SEQ ID nr. 6).

Alle D- og L-fusjonspeptider ifølge SEQ ID nr. 9, 10, 11 og 12 ble produsert med klassisk Fmock-syntese og ytterligere analysert ved massespektrometri. De ble til slutt rensert med HPLC. For å bestemme effekten av prolin-linkeren ble to typer TAT-peptid produsert, ett med og ett uten to proliner. Addisjonen av de to prolinene så ikke ut til å modifisere inntrengningen eller lokaliseringen av TAT-peptidet inne i celler. Generiske peptider som viser de konserverte aminosyrerestene er vist på figur 2.

Eksempel 3: Inhibering av celledød ved JBD19

Effektene av den 19 aminosyrer lange JBD-sekvensen i IB1(s) på biologisk JNK-aktivitet ble studert. Den 19 aminosyrer lange sekvensen ble koblet N-terminalt til grønt fluorescerende protein (GFP JBD19-konstruksjon) og effekten av denne konstruksjonen på bukspyttkjertelbetacelle-apoptose induert ved IL1 ble evaluert. Dette apoptose moduset var tidligere vist å bli blokkert ved transfeksjon med JBD₁₋₂₈₀ mens spesifikke inhibitorer av ERK1/2 eller p38 som kjent på fagområdet beskyttet ikke.

Oligonukleotider tilsvarende JBD19 og omfattende en konservert sekvens på 19 aminosyrer i tillegg til muterte og fullt konserverte regioner ble syntetisert og retningsbestemt satt inn i EcoRI- og SalI-seter i pEGFP-1-vektoren som koder for grønt fluorescerende protein (GFP) (fra Clontech). Insulinproduserende TC-3-celler ble dyrket i RPMI-1640-medium tilsatt 10 % føtalt kalveserum, 100 µg/ml streptomycin, 100 enheter/ml penicillin og 2 mM glutamin. Insulinproduserende TC-3-celler ble transfektert med de indikerte vektorene og IL1 (10 ng/ml) ble tilsatt cellekulturmediet. Antallet apoptotiske celler ble talt ved 48 timer etter tilsetningen av IL-1 ved å benytte et invertert fluorescensmikroskop. Apoptotiske celler ble skilt fra normale celler ved den karakteristiske «utboblingen» av cytoplasma og ble talt etter to dager.

GFP er grønt fluorescerende protein-ekspresjonsvektor benyttet som kontroll, JBD19 er vektoren som uttrykker en kimær GFP koblet til den 19 aminosyrer lange sekvensen avledet fra JBD fra IB1, JBD19Mut er den samme vektoren som GFP-JBD19 men med JBD mutert på fire konserverte rester vist som figur 1B, og JBD₁₋₂₈₀ er GFP-vektoren koblet til hele JBD (aminosyre 1 – 280). Den GFP-JBD19-uttrykkende konstruksjonen forhindret IL-1-indusert bukspyttkjertelcelleapoptose like effektivt som hele JBD₁₋₂₈₀.

Eksempel 4: Cellulær import av TAT-IB1(s)-peptider

- Evnen til de L- og D-enantiomere formene av TAT- og TAT-IB1(s)-peptidene («TAT-IB-peptider») til å trenge inn i celler ble evaluert. L-TAT, D-TAT, L-TAT-IB1(s) og D-TAT-IB1(s) peptider (henholdsvis SEQ ID nr. 5, 6, 9 og 12) ble merket med N-terminal addisjon av en glysinrest konjugert til fluorescein. Merkede peptider (1 μ M) ble tilsatt til TC-3-cellekulturer, som ble opprettholdt som beskrevet i eksempel 3. Ved forhåndsbestemte tider ble celler vasket med PBS og fiksert i fem minutter i iskald metanol-aceton (1:1) før de ble undersøkt under et fluorescensmikroskop. Fluorescein-merket BSA (1 μ M, 12 mol/mol BSA) ble benyttet som kontroll. Resultater viste at alle de ovenfor fluoresceinmerkede peptidene effektivt og raskt (på mindre enn fem minutter) hadde trengt inn i cellene etter tilsetning i kulturmediet. I motsatt fall trengte ikke fluoresceinmerket bovint serumalbumin (1 μ M BSA, 12 mol fluorescein/mol BSA) inn i cellene.
- En tidsforløpstudie indikerte at intensiteten til fluorescenssignalet for de L-enantiomere peptidene minsket med 70 % etter en periode på 24 timer. Lite til ikke noe signal var til stede ved 48 timer. I motsetning var D-TAT og D-TAT-IB1(s) ekstremt stabile inne i cellene.
- Fluorescenssignaler fra disse kun D-retro-invers-peptidene var fremdeles ganske sterke 1 uke senere, og signalet var kun litt svakere ved 2 uker etter behandling.

Eksempel 5: *In vitro*-inhibering av c-JUN-, ATF2- og Elk1-fosforylering

- Effektene av peptidene på JNK-mediert fosforylering av deres måltranskripsjonsfaktorer ble undersøkt *in vitro*. Rekombinant og ikke-aktivert JNK1, JNK2 og JNK3 ble produsert ved å benytte et Transcription and Translation—kanin-reticulocyt-lysate sett (Promega) og benyttet i fastfase kinaseanalyser med c-jun, ATF2 og Elk1, enten alene eller fusjonert med glutathion-S-transferase (GST), som substrater. Doseringsstudier ble utført der L-TAT- eller L-TAT-IB1(s)-peptider (0-25 μ M) ble blandet med de rekombinante JNK1-, JNK2- eller JNK3-kinasene i reaksjonsbuffer (20 mM Tris-acetat, 1 mM EGTA, 10 mM p-nitrofenylfosfat (pNPP), 5 mM natriumpyrofosfat, 10 mM p-glyserofosfat, 1 mM ditiotritol) i 20 minutter. Kinasereaksjonene ble deretter satt i gang ved tilsetningen av 10 mM $MgCl_2$ og 5 pCi ^{33}P -dATP og 1 μ g med enten GST-Jun (aa 1-89), GST-ATF2 (aa 1-96) eller GST-ELK1 (aa 307-428). GST-fusjonsproteiner ble kjøpt fra Stratagene (La Jolla, CA).
- Til glutathion-agarosekuler ble også tilsatt til blandingen. Reaksjonsproduktene ble deretter separert ved SDS-PAGE på en denaturerende 10 % polyakrylamidgel. Geler ble tørket og deretter eksponert for røntgenfilmer (Kodak). Nesten komplett inhibering av c-Jun-, ATF2- og Elk1-fosforylering ved JNK ble observert ved TAT-

IB(s)-peptid-doser så lave som 2,5 μM . Likevel var et markert unntak fraværet av TAT-IB(s)-inhibering av JNK3-fosforylering av Elk1. Totalt sett viste TAT-IB1(s)-peptidet overlegne effekter i inhibering av JNK-familie-fosforylering av deres mål-transkripsjonsfaktorer. Evnen til D-TAT-, D-TAT-IB1(s)- og L-TAT-IB1(s)-peptider (0-250 μM doseringsstudie) i å inhibere GST-Jun (aa 1-73)-fosforylering ved rekombinant JNK1, JNK2 og JNK3 ble analysert som ovenfor. Totalt sett økte D-TAT-IB1(s)-peptid JNK-mediert fosforylering av c-Jun, men ved nivåer omtrent 10-20 ganger mindre effektivt enn L-TAT-IB1(s).

10 **Eksempel 6: Inhibering av c-JUN-fosforylering ved aktiverte JNK'er**

Effektene av L-TAT- eller L-TAT-IB1(s)-peptidene som definert her på JNK'er aktivert ved stressende stimuli ble evaluert ved å benytte GDT-Jun for å trekke ned JNK'er fra UV-lys-bestrålte HeLa-celler eller IL-1-behandlede PC-celler. PTC-celler ble dyrket som beskrevet ovenfor. HeLa-celler ble dyrket i DMEM-medium tilsatt 10 % føtalt kalveserum, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin, 100 enheter/ml Penicillin og 2 mM glutamin. Én time før de ble benyttet til celle-ekstraktklargjøring ble PTC-celler aktivert med IL-1 som beskrevet ovenfor, mens HeLa-celler ble aktivert med UV-lys (20 J/m^2). Celle-ekstrakter ble klargjort fra kontroll, UV-lys-bestrålte HeLa-celler og IL-1-behandlede TC3-celler ved å skrape cellekulturene i lysisbuffer (20 mM Tris-acetat, 1 mM EGTA, 1 % Triton X-100, 10 mM p-nitrofenyl-fosfat, 5 mM natriumpyrofosfat, 10 mM p-glyserofosfat, 1 mM ditiotreitol). Smuss ble fjernet ved sentrifugering i fem minutter ved 15 000 rpm i en SS-34 Beckman-rotor. Ett hundre μg ekstrakter ble inkubert i én time ved romtemperatur med ett μg GST-Jun (aminosyrene 1-89) og 10 μl glutation-agarosekuler (Sigma). Etter fire vaskinger med skrapebufferen ble kulene resuspendert i den samme bufferen tilsatt L-TAT- eller L-TAT-IB1(s)-peptider (25 μM) i 20 minutter. Kinasereaksjoner ble deretter satt i gang ved tilsetning av 10 mM MgCl_2 , og 5 pCi³³P-gamma-dATP og inkubert i 30 minutter ved 30 °C.

Reaksjonsprodukter ble deretter separert ved SDS-PAGE på en denaturerende 10 % polyakrylamidgel. Geler ble tørket og deretter eksponert overfor røntgenfilmer (Kodak). TAT-IB(s)-peptidene forhindret effektivt fosforylering av c-Jun ved aktiverte JNK'er i disse eksperimentene.

35 **Eksempel 7: In vivo-inhibering av c-JUN-fosforylering ved TAT-IB(s)-peptider som definert her**

For å bestemme hvorvidt de cellepermeable peptidene som definert her kunne blokkere JNK-signalisering in vivo benyttet vi et heterologt GAL4-sytem. HeLa-celler dyrket som beskrevet ovenfor ble ko-transfektet med 5xGAL-LUC-reportervektoren sammen med GAL-Jun-ekspresjonskonstruksjonen (Stratagene)

omfattende aktiveringsdomenet til c-Jun (aminosyrene 1-89) koblet til GAL4-DNA-bindingsdomenet. Aktivering av JNK ble oppnådd ved ko-transfeksjon av vektorer som uttrykker de umiddelbart oppstrøms kinasene MKK4 og MKK7 (se Whitmarsh et al., Science 285:1573 (1999)). Kort forklart ble 3×10^5 celler transfektert med plasmidene i 3,5 cm skåler ved å benytte DOTAP (Boehringer Mannheim) ved å følge instruksjonene fra produsenten. For eksperimenter som involverer GAL-Jun ble 20 ng av plasmidet transfektert med 1 µg av reporterplasmidet pFR-Luc (Stratagene) og 0,5 µg av enten MKK4- eller MKK7-uttrykkende plasmider. Tre timer etter transfeksjon ble cellemedium byttet og TAT- og TAT-IB1(s)-peptider (1 µM) ble tilsatt. Luciferaseaktivitetene ble målt 16 timer senere ved å benytte «Dual Reporter System» fra Promega etter normalisering til protein-innhold. Tilsetning av TAT-IB1(s)-peptid blokkerte aktivering av c-Jun etter MKK4- og MKK7-mediert aktivering av JNK. Fordi HeLa-celler uttrykker JNK1- og JNK2-isoformer men ikke JNK3 transfekterte vi celler med JNK3. Igjen inhiberte TAT-IB(s)-peptidet JNK2-mediert aktivering av c-Jun.

Eksempel 8: syntese av kun-D-retro-inverse IB(s)-peptider og varianter derav

Peptider ifølge oppfinnelsen kan være kun-D-aminosyrepeptider syntetisert i revers for å forhindre naturlig proteolyse (dvs., kun-D-retro-invers-peptider). Et kun-D-retro-invers-peptid ifølge oppfinnelsen vil tilveiebringe et peptid med funksjonelle egenskaper tilsvarende det native peptidet, der sidegruppene på aminosyrene i peptidet vil tilsvare de for det native peptidet, men vil ha en proteaseresistent grunnstruktur.

Retro-invers-peptider ifølge oppfinnelsen er analoger som er syntetisert ved å benytte D-aminosyrer ved å feste aminosyrene i en peptidkjede slik at sekvensen av aminosyrer i retro-invers-peptidanalogen er eksakt motsatt av den i det valgte peptidet som tjener som modell. For å illustrere, dersom det naturlig forekommende TAT-proteinet (dannet av L-aminosyrer) har sekvensen GRKKRRQRRR (SEQ ID nr. 5) så vil retro-invers-peptidanalogen av dette peptidet (dannet av D-aminosyrer) ha sekvensen RRRQRRKKRG (SEQ ID nr. 6). Prosedyrene for syntetisering av en kjede av D-aminosyrer for å danne retro-invers-peptidene er kjent på fagområdet (se f.eks. Jameson et al., Nature, 368, 744-746 (1994), Brady et al., Nature 368, 692-693 (1994), Guichard et al., J. Med. Chem., 39, 2030-2039 (1996)). Spesifikt ble retro-peptidene ifølge SEQ ID nr. 2, 4, 6, 8, 11-12, 18, 20, 22 og 25-26 produsert ved klassisk Fmoc-syntese og ytterligere analysert med massespektrometri. De ble til slutt rensset med HPLC.

Fordi et iboende problem med native peptider er degradering ved naturlige proteaser og iboende immunogenisitet så vil de heterobivalente eller heteromultivalente forbindelsene ifølge denne oppfinnelsen bli fremstilt for å inkludere «retro-invers-isomeren» av det ønskede peptidet. Beskyttelse av peptidet fra naturlig proteolyse

bør derfor øke effektiviteten til den spesifikke heterobivalente eller heteromultivalente forbindelsen, både ved å forlenge halveringstiden og minske omfanget av immunresponsen som er fokusert på å aktivt ødelegge peptidene.

5 **Eksempel 9: Biologisk langtids-aktivitet for kun-D-retro-invers IB(s)-peptider og varianter derav**

Biologisk langtidsaktivitet er predikert for det D-TAT-IB(s)-retro-invers-inneholdende peptid-heterokonjugatet (se kimær sekvens ovenfor) sammenlignet med den native L-aminosyreanalogen på grunn av beskyttelse av D-TAT-IB(s)-peptidet fra degradering ved native proteaser, som vist i eksempel 5.

Inhibering av IL-1-induserte bukspyttkjertel beta-celledød ved D-TAT-IB1(s)-peptidet ble analysert. YC-3-celler ble inkubert som beskrevet ovenfor i 30 minutter med én enkelt tilsetning av de indikerte peptidene (1 μ M), og deretter ble IL-1 (10 ng/ml) tilsatt.

15 Apoptotiske celler ble deretter talt etter to dager med inkubering med IL-1 ved anvendelse av propidiumjodid og Hoechst33342-nukleær farging. Et minimum av 1 000 celler ble talt for hvert eksperiment. Standardfeil for gjennomsnitt (SEM) er indikert, n=5. D-TAT-IB1-peptidet minsket IL-1-indusert apoptose til et tilsvarende omfang som L-TAT-IB-peptider.

20 Langtidsinhibering av IL-1P-indusert celledød ved D-TAT-IB1-peptidet ble også analysert. TC-3-celler ble inkubert i 30 minutter med én enkelt tilsetning av de indikerte peptidene (1 μ M), og deretter ble IL-1 (10 ng/ml) tilsatt, etterfulgt av tilsetning av cytokinet hver andre dag. Apoptotiske celler ble deretter talt etter 15 dager med inkubering med IL-1 ved anvendelse av propidium-jodid og Hoechst
25 33342-nukleær farging. Det bemerkes at én enkelt tilsetning av TAT-IB1-peptidet ikke gir langtidsbeskyttelse. Et minimum av 1 000 celler ble talt for hvert eksperiment. Som et resultat var D-TAT-IB1(s), men ikke L-TAT-IB1(s), i stand til å gi langtidsbeskyttelse (15 dager).

30 **Eksempel 10: Undertrykkelse av JNK-transkripsjonsfaktorer ved L-TAT-IB1(s)-peptidet som benyttet ifølge foreliggende oppfinnelse**

Gelforsinkingsanalyser ble utført med en AP-1-dobbeltmerket probe (5'-CGC TTG ATG AGT CAG CCG GAA-3' (SEQ ID nr. 101)). HeLa-cellenukleær-ekstrakter som var behandlet eller ikke med 5 ng/ml TNF- α , som indikert. TAT- og L-TAT-IB1(s)-peptider som benyttet ifølge foreliggende oppfinnelse ble tilsatt 30 minutter
35 før TNF-alfa. Kun den delen av gelen med det spesifikke AP-1-DNA-komplekset (som vist ved konkurranse-eksperimenter med ikke-merkede spesifikke og ikke-spesifikke konkurrenter) er vist.

L-TAT-IB1(s)-peptider som benyttet ifølge foreliggende oppfinnelse minsker dannelsen av AP-1-DNA-komplekset i nærværet av TNF-alfa.

Eksempel 11: Inhibering av endogen JNK-aktivitet i HepG2-celler ved å benytte en tilnærming med alt i én brønn (se figur 3)

- HepG2-celler ble sådd ut ved 3 000 celler/brønn dagen før eksperimentet. Deretter ble økende konsentrasjoner av enten interleukin-1 (IL-1beta-v) eller tumornekrosefaktor (TNFalfa (●)) (a) tilsatt for å aktivere JNK i 30 minutter. Celler ble lysert i 20 mM Hepes, 0,5 % Tween pH 7,4 og prosessert for alphascreen JNK. (b) Z' for JNK-aktiviteten indisert med 10 ng/ml IL-1 og målt i 384 brønner/plate (n=96). (c) inhibering av endogen IL-1beta-indusert JNK-aktivitet med kjemiske JNK-inhibitorer (staurosporin (°) og SP600125 (●)). (d) Effekt av peptidinhibitorer L-TAT-IB1(s) ifølge SEQ ID nr. 9 (her forkortet som L-JNKi (v)) og D-TAT-IB1(s) ifølge SEQ ID nr. 11 (her forkortet D-JNK1 (♦)) og JBD'er (●) (tilsvarende L-JNK1 uten TAT-sekvensen)) på IL-1-avhengig JNK-aktivitet. Alle paneler er representative for tre uavhengige eksperimenter (n=3).

Fremgangsmåter: Alfascreen-kinaseanalyse

- Prinsipp: AlphaScreen er en ikke-radioaktiv, kulebasert teknologi som benyttes for å studere biomolekylære interaksjoner i et mikropateformat. Akronymet ALPHA står for Amplified Luminescence Proximity Homogenous Assay (forsterket luminescens-proksimitetshomogen analyse) Den involverer en biologisk interaksjon som bringer en "donor"- og en «akseptor»-kule tett på hverandre, og deretter virker en kaskade med kjemiske reaksjoner for å produsere et forsterket signal. Ved lasereksitasjon ved 680 nm konverterer et fotosensitivt middel (ftalocyanin) i donorkulen omkringliggende oksygen til en eksitert singlett-tilstand. Innenfor sin halveringstid på 4 µsek kan singlett-oksygenmolekylet diffusere opp til 200 nm i løsning og dersom en akseptorkule er innenfor denne vastanden reagerer singlett-oksygenet med et tioksenderivat på akseptorkulen, og genererer kjemiluminescens ved 370 nm som ytterligere aktiverer fluorofores inneholdt i den samme akseptorkulen. De eksiterte fluorofores sender deretter ut lys ved 520-620 nm. I fraværet av en akseptorkule faller singlett-oksygen tilbake til grunntilstanden og ikke noe signal blir produsert.

- Kinasereagenser (B-GST-cJun, anti-P-cJun-antistoff og aktiv JNK3) ble først fortynnet i kinasebuffer (20 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 100 µM Na₃VO₄, 0,01 % Tween-20) og tilsatt brønner (15 µl). Reaksjonene ble deretter inkubert i nærvær av 10 µM ATP i 1 time ved 23 °C. Påvisning ble utført ved en tilsetning av 10 µl med kuleblanding (Protein-A-akseptor 20 µg/ml og streptavidin-donor 20 µg/ml) fortynnet i påvisningsbuffer (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 20 mM NaCl, 80 mM EDTA, 0,3 % BSA) etterfulgt av en annen én times inkubering ved 23

°C i mørke. For målinger av JNK-endogen aktivitet ble kinaseanalyser utført som beskrevet ovenfor bortsett fra at aktiv JNK3 ble erstattet med cellelysater og reaksjonskinasekomponenter ble tilsatt etter cellelysis. B-GST-cjun og P-cjun-antistoff ble benyttet ved de samme konsentrasjonene mens ATP ble benyttet ved 50 μM i stedet for 10 μM . AlphaScreen-signal ble analysert direkte på Fusion- eller EnVision-apparatene.

Eksempel 12: Bestemmelse av aktiviteten til kun-D-retro-invers-IB(s)-peptider og varianter derav i behandlingen av virusinfeksjoner – Varicella zoster-virus (VZV)

Bestemmelse av aktiviteten til IB(s)-peptidene og kun-D-retro-invers-(IB(s)-peptidene som benyttet ifølge foreliggende oppfinnelse ble testet ved å benytte JNK-inhibitorpeptidet XG-102 (SEQ ID nr. 11) som testforbindelse i dyrkede vertsceller (humane forhudfibroblaster (HFF)). Virus er obligate, intracellulære parasitter som krever et funksjonelt cellemiljø for å fullføre deres livssyklus, og døende celler understøtter ikke deres virusreplikasjon. I tillegg kan inhibitorer av cellefunksjoner være toksiske for celler, noe som ikke-spesifikt kan hindre virusvekst. Slik kan syke og døende vertsceller oppvise ikke-spesifikt reduserte virus titer. Fordi dette kan forfalske resultatene ble en cyto toksisitetsanalyse utført først, for å bestemme toleransen til de dyrkede cellene for testforbindelsen. Deretter ble en plakkreduksjonsanalyse utført og deretter ble aktiviteten til JNK-inhibitorpeptidet XG-102 (SEQ ID nr. 11) testet med hensyn på Varicella zoster.virus (VZV) i infiserte celler.

A) Bestemmelse av celletoksisiteten til kun-D-retro-invers-IB(s)-peptider:

For bestemmelse av toksisitet ble dyrkede celler (humane forhudfibroblaster (HFF)) sådd ut i 96-brønners vevskulturplater. Medium inneholdende DMSO (samme nivå som 5 μM XG-102 (SEQ ID nr. 11)), eller XG-102 (SEQ ID nr. 11) ble tilsatt ved flere konsentrasjoner (1, 2 og 5 μM) i 24 timer. Deretter ble en Neutral-Red-analyse utført. Neutral-Red-kolorimetriske analyser for celletoksisitetsanalyser (i sett på 6 replikater) ble benyttet for å sette den maksimale dosen for påfølgende virkningsevne-analyser (som utført i Taylor et al., 2004, J. Virology, 78:2853-2862). Levende celler absorberer Neutral Red og dermed er nivået av absorbans et kvantitativt mål på cellelevedyktighet og antall. Opptak av Neutral Red er direkte proporsjonalt med antallet celler og gjenspeiler også normal endocytose. Derfor ble en kort puls med Neutral Red tilsatt mediet ved 0 og 24 timer. Etter fiksering og ekstrahering ble fargestoff tilsatt og mengden fargestoff i hver prøve ble målt på en ELISA-plateavleser ved 540 nm (se figur 4). Ingen cytotoksisitet ble observert med noen mengde XG-102 (SEQ ID nr. 11), og cellevekst var ikke begrenset sammenlignet med DMSO-fortynningsmiddelet alene (kontroll). Slik hadde ikke

standardkonsentrasjonen på 1 μM noen synlige effekter på HFF-celler, og høyere doser vil også bli godt tolerert.

B) Plakkreduksjonsanalyse for å evaluere antiviruseffektene av XG-102 (SEQ ID nr. 11) mot Varicella zoster-virus (VZV).

- 5 For å bestemme hvorvidt XG-102 (SEQ ID nr. 11) hadde en doseavhengig antiviruseffekt ble en mengde konsentrasjoner rundt standarden på 1 μM testet. I denne plakkreduksjonsanalysen ble konfluente humane forhudfibroblaster (HFF) i 24-brønners plater inokulert med VZV-infiserte HFF'er ved et forhold på 1:100 (infeksjonsmultiplisitet $\text{MOI}=0,01$) og adsorbert på cellene i 2 timer. Overskuddet av virus ble vasket vekk, og medium inneholdende 0 (kun DMSO), 0,5, 1 eller 2 μM XG-102 (SEQ ID nr. 11) ble testet. Én prøve ble tatt på dette tidspunktet for å måle utgangsnivået for infeksjon, der hver brønn inneholdt omtrent 150 pfu. Etter 24 timer ble duplikate brønner trypsinert, og deretter ble celsuspensjonene titrert på MeWo-cellemonolag i triplikat for å bestemme antallet VZV-infiserte celler i hver prøve. Under ubegrenset vekst øker VZV vanligvis 10 ganger i løpet av 1 dag fordi det formeres ved spredning fra celle til celle. Det var dette som ble observert i 15 kulturene behandlet med kun DMSO, noe som ga 1200 $\pm$ 430 pfu (figur 5). Resultatene av bestemmelsen var som følger:

20

XG-102 (SEQ ID nr. 11)	Spredning av VZV (pfu) $\pm$ SD
0 μM	1233 $\pm$ 432
0,5 μM	260 $\pm$ 53
1,0 μM	212 $\pm$ 48
2,0 μM	312 $\pm$ 79

- 25 XG-102 (SEQ ID nr. 11) hadde slik en sterk antiviruseffekt ved alle konsentrasjoner som ble testet, med VZV-utbytter på nær 200-300 pfu. Ved å benytte grafen av disse resultatene for å interpolere EC_{50} ble det beregnet at omtrent 0,3 μM XG-102 (SEQ ID nr. 11) fikk VZV-utbytte til å synke med 50 %.

Fra celletoksisitets- og virkningsevnedataene ble en preliminær selektiv indeks ($\text{Tox}/\text{EC}_{50}$) på 5,0 $\mu\text{M}/0,3 \mu\text{M}$ beregnet, noe som gir en verdi på omtrent 17, der den faktiske SI er antatt å være enda høyere fordi konsentrasjonen av XG-102 (SEQ ID nr. 11) som ville drepe 50 % av cellene ikke ble tilnærmet.

C) Målinger av Varicella zoster-virus (VZV)-replikasjon i humane forhudfibroblaster (HFF) med XG-102 (SEQ ID nr. 11).

For å bestemme den minimale, effektive dosen av XG-102 som forhindrer Varicella zoster-virus (VZV)-replikasjon i humane forhudfibroblaster (HFF) med XG-102 (SEQ ID nr. 11) ble konfluente monolag av HFF'er inokulert med VZV-BAC-Luc-stamme i 2 timer, deretter behandlet i 24 timer med XG-102 (SEQ ID nr. 11) ved konsentrasjoner på 0,25, 0,5 eller 1,0 μM eller med negativ kontroll (XG-100, 1,0 μM). Virusutbytte ble målt ved luciferasanalyse. Prøver i triplikat og gjennomsnittlig luminescens er vist, feilsøyler representerer standardavviket av snittet.

Som et resultat var VZV-replikasjon normal i nærværet av den negative kontrollen (Tat-peptidet alene). XG-102 (SEQ ID nr. 11) forhindret VZV-replikasjon ved den laveste konsentrasjonen som ble testet, 0,25 μM . Den minimale, effektive dosen kunne ikke bli bestemt i dette eksperimentet. Mens det fremdeles ikke er kjent hvorfor VZV er avhengig av JNK-aktivitet under infeksjon så ser det ut til å være et avgjørende krav for dette enzymet. En lav konsentrasjon (0,25 μM) med XG-102 (SEQ ID nr. 11) er slik tilstrekkelig for fullstendig å blokkere VZV-spredning i kultur. Én mulig forklaring på denne effekten er at denne mengden med XG-102 (SEQ ID nr. 11) binder til alle JNK-molekylene i de infiserte cellene. Alternativt kan 0,25 μM XG-102 (SEQ ID nr. 11) redusere JNK-aktivitet til under et grensenivå som er optimalt for VZV-replikasjon. Resultatene av dette eksperimentet er oppsummert på figur 6.

Sammenligningseksempel 13: Bestemmelse av aktiviteten til kun-D-retro-invers-IB(s)-peptider og varianter derav i behandlingen av kronisk obstruktiv pulmonal sykdom (COPD)

For å bestemme aktiviteten til det eksemplarisk all-D-retro-invers-IB(s)-peptidet XG-102 (SEQ ID nr. 11) i behandlingen av kronisk obstruktiv pulmonal sykdom (COPD) er XG-102 (SEQ ID nr. 11) benyttet i en dyremodell for bleomycin-indusert akutt lungeinflammasjon og fibrose. Protokollen for bleomycin-indusert inflammasjon og fibrose har tidligere blitt beskrevet i litteraturen. Målet med eksperimentet var å undersøke effekten av XG-102 (SEQ ID nr. 11) ved subkutan (s.c.) rute på nøytrofilrekruttering i bronkoalveolær skylling (BAL) og lunge i bleomycin-indusert inflammasjon og fibrose:

- på dag 1 etter en enkelt administrering av bleomycin (10 mg/kg)
- og på dag 10 med utviklingen av fibrose.
-

1) Fremgangsmåte og eksperimentell tilnærming

- Testforbindelsen XG-102 (SEQ ID nr. 11) ved to doser og vehikkelkontroll ble gitt s.c. med en enkelt intranasal administrering av bleomycin og mus ble analysert etter 1 og 10 dager. Dyrene som ble benyttet i modellen var 10 C57BL/6-mus (8 uker gamle) per gruppe. De eksperimentelle gruppene inkluderte vehikkel, 0,001 mg/kg XG-102 (SEQ ID nr. 11) og 0,1 mg/kg XG-102 (SEQ ID nr. 11), og behandlingen besto i gjentatt subkutan administrering av XG-102 (SEQ ID nr. 11) før bleomycin-administrering hver tredje dag. Akutt lungeinflammasjon ved 24 timer ble overvåket ved BAL-skylling, cytologi, celletellinger og lunge-myeloperoksidaseaktivitet. Effekten av forbindelsen ble sammenlignet med vehikkel-kontroller. Lungefibrose ble undersøkt histologisk ved å benytte hematoxylin- og eosin-farging på dag 10 etter den single dosen med bleomycin.

1.1) Bleomycinadministrering

- Bleomycinsulfat i saltløsning (10 mg/kg kroppsvekt) fra Bellon Laboratories (Mountrouge, Frankrike) eller saltløsning ble gitt gjennom luftveiene ved nasal instillasjon i et volum på 40 µl under lett ketamin-xylasin-anestesi. Gruppene for bleomycin-administrering for både bleomycin-indusert inflammasjon og fibrose inkluderte: Vehikkel, 0,001 mg/kg XG-102 (SEQ ID nr. 11) og 0,1 mg/kg XG-102 (SEQ ID nr. 11). Ruten for bleomycin-indusert inflammasjon var subkutan (s.c.), og administrering foregikk ved en enkelt dose. Ruten for bleomycin-indusert fibrose var subkutan (s.c.), og administrering foregikk 3 ganger på 10 dager.

1.2) Bronkiealvøleært skyllefluid (BALF)

- Etter innsnitt i trachea ble en plastikkanyle satt inn og luftrom ble skylt ved å benytte 0,3 ml PBS-løsning, oppvarmet til 37 °C. Prøvene som ble samlet inn ble ekspedert i 2 fraksjoner: den første (1 ml tilsvarende de første 2 skyllingene) ble benyttet til mediatormåling og den andre til cellebestemmelse (4 ml). Den første fraksjonen ble sentrifugert (600 g i 10 minutter) og supernatant ble fraksjonert og holdt ved -80 °C inntil mediatorbestemmelse. Celle-pelletten ble deretter resuspendert i 0,4 ml steril NaCl 0,9 % og slått sammen med den andre fraksjonen og ble benyttet til celletellinger.

1.3) Lungehomogenisering

- Etter BAL ble hele lungen fjernet og plassert inne i et mikrorør (Lysing matrix D, Q Bio Gene, Illkrich, Frankrike) med 1 ml PBS, totalt lungevevsekstrakt ble klergjort ved å benytte et Fastprep®-system (FP120, Q Bio Gene, Illkrich, Frankrike), ekstraktet ble deretter sentrifugert og supernatanten lagret ved -80 ° før

mediatormåling og kollagenanalyse med Sircol Collagen Assay (France Biochem Division, Frankrike).

1.4) Celletelling og bestemmelse

5 Totalcelletelling ble bestemt i BAL-fluid ved å benytte et Malassez-hemocytometer. Forskjellige celletellinger ble utført på cytopspin-preparater (Cytospin-3, Thermo Shandon) etter farging med MGG Diff-quick (Dade Behring AG).

Forskjellige celletellinger ble gjort på 200 celler ved å benytte standard morfologiske kriterier.

10

1.5) TNF-måling

TNF-nivå i BALF ble bestemt ved å benytte ELISA-analysesett (Mouse DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, USA) i overensstemmelse med produsentens instruksjoner. Resultater er gitt som pg/ml.

15

1.6) MPO-måling

MPO-nivåer ble målt ved administrering av XG-102. MPO ble ikke signifikant induert etter bleomycin i dette eksperimentet. Videre hadde XG-102 ingen effekt på MPO-nivåer i lungene.

20

1.7) Histologi

Etter BAL og lungeperfusjon ble den store lappen fiksert i 4 % bufret formaldehyd for standard mikroskopanalyse. 3-µm seksjoner ble farget med hematoxylin og eosin (H&E).

25

2.) Resultater

A) Første studie: Bleomycin (BLM) induerte akutt lungeinflammasjon

Grupper: Vehikkel, XG-102 (SEQ ID nr. 11) 0,001 mg/kg og XG-102 (SEQ ID nr. 11) 0,1 mg/kg.

30

Rute: s.c.-rute, enkeltdose.

a) Cellerekuttering i bronkiealveolært skyllerom

Ved 0,1 mg/kg reduserer XG-102 (SEQ ID nr. 11) signifikant nøytrofilrekutteringen og antallet totale celler i det inflammatoriske stadiet. Ved

0,001 mg/kg har XG-102 (SEQ ID nr. 11) ingen effekt på nøytrofilrekruttering eller andre celletyper i det bronkiealveolære rommet (ett representativt eksperiment med $n=5$ mus per gruppe, *, $p<0,05$, **, $p<0,001$).

5 b) Cellerekruttering i lunge ved å benytte MPO i lungehomogenisering

Myeloperoksidase (MPO) spiller en viktig rolle i vertsforsvarssystemer. Dette 140 kDa proteinet, som er sammensatt av to tunge kjeder på 53 kDa og to lette kjeder på 15 kDa, ble først oppdaget i 1960-årene. Frigjøringen av MPO fra granulene i nøytrofiler og monocytter som respons på aktiveringen av leukocytter muliggjør konverteringen av hydrogenperoksid og kloridioner til hypoklorsyre (HOCl), som er et sterkt oksidasjonsmiddel. Selv om MPO har et viktig formål i forsvarssystemet så viser ulike studier at MPO også spiller en rolle i flere inflammatoriske tilstander, der et forhøyet MPO-nivå f.eks. har blitt koblet til koronar arteriesykdommer. Videre gjenspeiler vevs-MPO-nivåer tilstanden til aktivering av nøytrofiler og gir en indikasjon på vevsinfiltrering av nøytrofiler.

I foreliggende eksperiment ble ikke MPO signifikant induisert etter administrering av bleomycin. XG-102 (SEQ ID nr. 11) hadde slik ingen effekt på MPO-nivåene i lungene (se figur 7).

20 c) TNF-måling

Ved måling av TNF-nivåer ble det observert en trend mot reduksjon av TNF-nivået i BALF etter administrering av XG-102 (SEQ ID nr. 11), selv om TNF-nivåer var svært lave etter BLM-administrering (se figur 8).

25 d) konklusjon

Det kunne bli observert at 0,1 mg/kg XG-102 (SEQ ID nr. 11) minsker nøytrofil- og total cellerekruttering i det bronkiealveolære rommet og induserer en trend mot minskning av TNF-nivået. Videre viste undersøkelsen av de histologiske snittene en minskning av den inflammatoriske celleakkumuleringen i det peribronkiale rommet. Det kan slik bli konkludert med at XG-102 (SEQ ID nr. 11) reduserer den bleomycin-induserte inflammasjonen.

I overensstemmelse med de oppnådde resultatene ble eksperimentet i tillegg utført i en fibrosemodell.

35

B) Andre studie: Bleomycin (BLM)-indusert lungfibrose

Grupper: Vehikkel, XG-102 (SEQ ID nr. 11) 0,001 mg/kg og XG-102 (SEQ ID nr. 11) 0,1 mg/kg.

Rute: s.c. rute, 3 ganger på 10 dager.

5 a) Cellerekruttering i bronkoalveolærskyllingsrom

Ved 0,001 mg/kg reduserte XG-102 (SEQ ID nr. 11) signifikant lymfocyttrekrutteringen og antallet totale celler rekruttert i det inflammatoriske stadiet, ved dette tidspunktet kjennetegnet ved lymfocyttrekrutteringen. Ved 0,1 mg/kg hadde XG-102 (SEQ ID nr. 11) ingen effekt (n=5 mus per gruppe, *, $p<0,05$,
10 **, $p<0,001$) (se figur 9).

a) Histologi

Seksjoner av lunge på 3 μm ble farget med hematoxylin og eosin. Inflammatorisk cellakkumulering, fibrotiske områder, tap av lungearkitektur ble observert 10 dager
15 etter BLM-administrering. En minskning i disse parameterne ble observert etter administrering av XG-102 ved en lav dose (0,001 mg/kg) men ikke med den høye dosen (0,1 mg/kg) (se figur 10).

b) Konklusjon:

20 Det kan bli konkludert med at XG-102 (SEQ ID nr. 11) administrert 3 ganger ved den lave dosen på 0,001 mg/kg minsket den bleomycin-induserte senere inflammasjonen, spesielt lymfocyttrekrutteringen observert på dette tidspunktet. Videre stopper teststoffet administrert 3 ganger ved denne dosen den bleomycin-induserte fibrosen. Mindre omfattende fibrotiske områder med en mer konserververt
25 lungestruktur kunne bli observert.

Eksempel 14: Bestemmelse av aktiviteten til kun-D-retro-invers-IB(s)-peptider og varianter derav i behandlingen av Alzheimers sykdom

For å bestemme aktiviteten til det eksemplarisk all-D-retro-invers-IB(s)-peptidet
30 XG-102 (SEQ ID nr. 11) i Alzheimers sykdom ble XG-102 (SEQ ID nr. 11) evaluert i den hAPP-transgene musmodellen som overuttrykker APP751 med London- og Swedish-mutasjoner ved å benytte Morris-Water-Maze-atferdstesten i tillegg til immunhistologiske tester som måler plakkbelastning og ELISA-tester som måler β -amyloid₁₋₄₀- og β -amyloid₁₋₄₂-nivåer i hjernen til mus.

35

a) Fremgangsmåter

i) Introduksjon

Studien ble designet for å evaluere virkningsevnen til testforbindelsen XG-102 (SEQ ID nr. 11) på atferdsmessige, biokjemiske og histologiske markører ved å benytte 5 måneder gamle (+/- 2 uker) hAPP-Tg-hunnmus. Derfor ble mus behandlet hver andre eller tredje uke opp til 4 måneder og på slutten av behandlingsperioden ble adferd evaluert i Morris-Water-Maze. Ved avlivning ble hjerne, CSF og blod samlet inn. A β 40- og A β 42-nivåer ble bestemt i fire ulike hjernehomogenatfraksjoner i tillegg til i CSF fra Tg-mus. Plakkbelastning ble kvantifisert i cortex og hippocampus hos 8 Tg-dyr per behandlingsgruppe.

ii) Dyr

Tg-hunnmus med en C57BL/6xDBA-bakgrunn og en alder på 5 måneder (+/- 2 uker) ble tilfeldig tilordnet behandlingsgrupper 1 til 3 (n=12). Dyr ble utsatt for administrering av vehikkel eller XG-102 (SEQ ID nr. 11) i to ulike konsentrasjoner ved å begynne ved 5 måneders alder og fortsatte opp til 4 måneder med subkutane (s.c.) påføringer hver andre eller tredje uke. Alle dyr som ble benyttet i foreliggende undersøkelse hadde mørke øyne og ville sannsynlig fornemme menene på utsiden av MWM-samlingen. Dette måtte likevel ekskluderes at synsevnen til dyrene var dårlig, noe som ble kontrollert i den synlige plattformtreningen, den såkalte pretesten, før behandlingsstart for alle dyrene inkludert reserver inntatt i studien. I tilfellet der et synshandikap for et spesifikt dyr ville bli bekreftet ville musen måtte ha blitt ekskludert fra studien.

iii) Identifisering av dyr og oppbevaring

Mus ble individuelt identifisert med øremerking. De ble oppbevart i individuelle, ventilerte bur (IVC'er) på standardisert leie for gnagere, levert av Rettenmaier®. Hvert bur inneholdt maksimalt fem mus. Mus ble holdt i overensstemmelse med JSW Standard Operating Procedures (SOP GEN011) som er utarbeidet på basis av internasjonale standarder. Hvert bur ble identifisert med et farget kort som indikerer studienummer, kjønn, de individuelle registreringsnummer (IRN) for dyrene, dato for fødsel, i tillegg til screeningdatoen og behandlingsgruppeallokeringen. Temperaturen under studiet ble opprettholdt ved omtrent 24 °C og den relative fuktigheten ble opprettholdt ved omtrent 40-70 %. Dyr ble oppbevart under en konstant lyssyklus (12 timer lys/mørke). Normalt springvann var tilgjengelig for dyrene ad libitum.

iv) Behandling

Førti hAPP-transgene hunnmus ble behandlet med enten 0,1 mg/kg b.w./hver andre uke eller 10 mg/kg b.w./hver tredje uke av testforbindelsen XG-102 (SEQ ID nr. 11) i to ulike doseringer (n=12/gruppe) eller behandlet med vehikkel (n=12) s.c. én gang hver tredje uke over fire måneder.

5

v) Morris-Water-Maze

Morris-Water-Maze (MWM)-oppgaven ble utført i et svart, sirkulært basseng med diameter på 100 cm. Springvann ble fylt i med en temperatur på 22 +/- 1 °C og bassenget ble virtuelt delt i fire sektorer. En transparent plattform (8 cm i diameter) ble plassert omtrent 0,5 cm under vannoverflaten. Under hele testsesjonen, bortsett fra under pretesten, var plattformen lokalisert i den sydvestre kvadranten av bassenget. Én dag før den 4 dager lange treningssesjonen måtte dyrene utføre en såkalt «pretest» (to prøver som varte 60 sek) for å sikre at synsevne for hvert dyr var normal. Kun dyr som fullførte denne oppgaven ble tatt med i MWM-testingen. I MWM-oppgaven måtte hver mus utføre tre prøver på fire påfølgende dager. En enkelt prøve varte i maksimalt ett minutt. I løpet av denne tiden hadde musen muligheten til å finne frem til det skjulte, gjennomsiktige målet. Dersom dyret ikke kunne finne en «vei» ut av vannet ledet undersøkeren musen, eller plasserte den, på plattformen. Etter hver prøve ble musene tillatt å hvile på plattformen i 10-15 sekunder. I løpet av denne tiden hadde musene en mulighet til å orientere seg i omgivelsene. Undersøkelsene fant sted under dempede lysbetingelser, for å spare sporingssystemet for negativ påvirkning (Kaminski, PCS, Biomedical, Research Systems). På veggene rundt bassenget var plakater med svarte, tydelige geometriske symboler (f.eks. sirkler og kvadrater) festet som musene kunne benytte som landemerker til sin orientering. Én svømmegruppe per prøve besto av fem til seks mus, slik at en tid mellom hver prøve på omtrent fem til ti minutter var sikret. For kvantifisering av flukttid (tiden (sekund) – som musen behøvde for å finne den skjulte plattformen og derfor flykte fra vannet) banevalg (lengden av ruten (meter) for å nå målet) og for fastholdelse i målkvadranten ble et datasporingssystem benyttet. Datamaskinen var koblet til et kamera plassert over sentrum av bassenget. Kameraet detekterte et signal fra den lyseutsendende dioden (LED) som var festet med en liten hårspenne på musens hale. Én time etter siste prøve på dag 4 måtte musene gjennomføre en såkalt probeprobe. På dette tidspunktet ble plattformen fjernet fra bassenget og i løpet av den ett minutt lange probeprobeen talte eksperimentøren antallet krysninger over den tidligere målposisjonen. I tillegg ble fastholdelsen til denne kvadranten i tillegg til i de tre andre kvadrantene beregnet. Gjennom hele denne prøven kunne ikke musen få noen som helst hjelp fra plattformen.

40 vi) Vevsprøvetaking

Ved slutten av behandlingsperioden, og følgende all adferdstesting, så ble alle gjenværende mus avlivet (n=28). Derfor ble alle mus bedøvet ved standard inhaleringsanestetika (Isofluran, Baxter) som beskrevet i SOP MET030.

- 5 Cerebrospinalfluid (CSF) ble oppnådd ved ren eksponering og eksponering av foramen magnum. Ved eksponering ble en Pasteur-pipette ført inn til en dybde på omtrent 0,3-1 mm i foramen magnum. CSF ble samlet inn ved suging og kapillærvirkning inntil strømming stoppet helt opp. To volumer av hver prøve ble umiddelbart frosset ned og holdt ved -80 °C, inntil det var klart for ytterligere analyse med ELISA-teknikk. Etter CSF-prøvetagning ble hver mus plassert i
- 10 liggende på ryggen, thorax ble åpnet og en 26-gauge nål festet til en 1 cc-sprøyte ble ført inn i høyre ventrikulære hjertekammer. Lett sug ble brukt i nålen og blod ble samlet inn i EDTA og deretter benyttet for å oppnå plasma. For å få frem plasma ble blodprøver fra hver mus spunnet ved 1750 rpm (700 g) i 10 minutter i en sentrifuge (GS – 6R Beckmann) ved å benytte en rotor med svingende beholdere
- 15 (GH – 3.8 Becman). Plasma ble frosset og lagret ved – 20 °C inntil videre analyse. Etter blodprøvetagning ble transgene mus intrakardialt perfusert med 0,9 % natriumklorid. Hjerner ble raskt fjernet og cerebellum skåret av. Den høyre hjernehalvdelen fra alle mus ble immersjonsfiksert i frisk tillaget 4 % paraformaldehyd/PBS (pH 7,4) i én time ved romtemperatur. Deretter ble hjerner overført til en løsning av 15 % sukrose PBS i 24 timer for å sikre cryobeskyttelse.
- 20 På den neste dagen ble hjerner frosset i isopentan og lagret ved – 80 °C inntil de ble benyttet i histologiske undersøkelser (SOP MET042). Den venstre hjernehalvdelen ble veid og frosset i flytende nitrogen og lagret ved – 80 °C for biokjemisk analyse.

25 vii) Bestemmelse av A β ₁₋₄₀ og A β ₁₋₄₂

- I fire ulike hjernehomogenatfraksjoner fra hver Tg-mus i tillegg til i CSF-prøver ble nivåene av A β ₁₋₄₀ og A β ₁₋₄₂ evaluert med ELISA-teknikk. Svært sensitive testsett for A β ₁₋₄₀ og A β ₁₋₄₂ ble kjøpt fra The Genetics Company™, Sveits (SOP MET058). CSF ble klargjort som beskrevet ovenfor. For hjernehomogenater ble frosne
- 30 hjernehalvdeler homogenisert i Tris-bufret saltløsning (TBS)-buffer (5 ml) inneholdende proteaseinhibitor-coctail. 1,25 ml av dette hjerne-TBS-homogenatet ble lagret ved -80 °C, 1,25 ml har blitt undersøkt videre. Det gjenværende hjernehomogenatet (2,5 ml) ble sentrifugert og den resulterende supernatanten (= TBS-fraksjon) ble delt opp og holdt ved -20 °C inntil ELISA-bestemmelse. Pelleten
- 35 ble suspendert i Triton X-100 (2,5 ml), sentrifugert og supernatanten (= Triton X-100-fraksjon) ble delt opp og holdt ved -20 °C. Disse trinnene ble repetert med SDS (2,5 ml). Pelleten ut av SDS-fraksjonen ble suspendert i 70 % maursyre (0,5 ml) før påfølgende sentrifugering.

- Den oppnådde supernatanten ble nøytralisert med 1 M Tris (9,5 ml) delt opp og
- 40 holdt ved -20 °C (= FA-fraksjon). Prøver av de fire hjernehomogenatfraksjonene

(TBS, Triton X-100, SDS og FA) ble benyttet til bestemmelse av $A\beta_{1-40}$ og $A\beta_{1-42}$ med ELISA-teknikk. ELISA-testsett ble kjøpt fra The Genetics Company™, Sveits (SOP MET062). Den kan bli antatt at TBS og Triton X-100 løseliggjør monomere til oligomere strukturer. Polymerer slik som protofibriller og vannuløselige fibriller kan bli løst i SDS og FA. I så henseende tilveiebringer undersøkelsen av alle fire også innsyn i A-polymeriseringsstatus.

viii) Evaluering av hjernemorfologi

Hjernevev fra alle Tg-dyr som ble undersøkt ble håndtert på eksakt samme måte for å unngå tendenser som skyldes variasjon i denne prosedyren. Fra hjernehalvdeler fra 24 Tg-mus (8 i hver gruppe) ble 20 cryo-seksjoner per lag (totalt 5 lag), hver 10 μm tykk (Leica CM 3050S) ble pilformet kuttet og 5 (én fra hvert lag) ble prosessert og evaluert for kvantifisering av plakkbetlastning. De fem pilformede lagene tilsvarer figurene 104 til 105, 107 til 108, 111 til 112, 115 til 116 og 118 til 119 ifølge det morfologiske atlaset «The mouse brain» fra Paxinos og Franklin (2.utgave). Det første laget var spesifisert ved kravet om å inkludere hele hippocampus med dens regioner CA1, CA2, CA3, GD1b og GDmb. Immunreaktivitet ble kvantitativt evaluert i hippocampus og i cortex ved å benytte det monoklonale, humane $A\beta$ -spesifikke antistoffet 6E10 (Signet) i tillegg til ThioflavinS-farging. Gjenværende hjernehalvdeler eller vev som ikke ble benyttet ble tatt vare på og lagret ved JSW CNS inntil slutten av prosjektet.

b) Evaluering

i) Adferd

I Morris-Water-Maze-prøvene ble svømt lengde, fluktlatens, svømmehastighet, og i probeprøvene, kryssing over den tidligere plattformposisjonen og tid for opphold i hver kvadrant i bassenget, målt for hvert Tg-dyr med en spesiell programvare.

ii) Biokjemisk evaluering

Fra alle Tg-mus ble CSF-prøver i tillegg til prøver fra hjernepreparatene analysert med kommersielt tilgjengelige ELISA-tester for $A\beta_{1-40}$ og $A\beta_{1-42}$. Målinger av adekvate standarder ble utørt samtidig. Prøver fra hjernepreparater ble analysert i duplikater. På grunn av den lille prøvemengden ble CSF-prøver analysert i kun en enkelt måling.

iii) Histologi

i1) Måling av amyloid-deponeringer og plakkbetlastning

For 6E10-immunohistokjemi ble den følgende evalueringsprosedyren benyttet:

- aa) Kontrastering av bildet for visualisering av snittgrenser uten påføring av kontrasten på bildet.
- 5 bb) Interaktiv tegning av cortex-konturene og den følgende målingen av cortex-arealet (=regionareal).
- cc) Interaktiv tegning av området av interesse (AOI) der fargede objekter blir påvist over en viss intensitet basert på grensenivå (det samme for hvert bilde) og over en størrelse på $8 \mu\text{m}^2$.
- 10 dd) Måling av arealet til objektet, summen av farget areal i AOI i tillegg til antall objekter etter jevn kontrastering for å forsterke forholdet signal/støy (det samme for hvert bilde).
- ee) Repetisjon av aa)-dd) for hippocampus.
- ff) Beregning av den gjennomsnittlige plakkstørrelsen (= sum areal for
15 plakk/antall plakk), det relative plakkantallet og arealet (= antall plakk/regionareal og sum areal av plakk/regionareal * 100).
- gg) Automatisert dataeksport inn i et Excel-ark, inkludert parameterne «bildetittel, regionareal, antall plakk, sum av plakkareal, relativt plakkantall, relativt plakkareal og gjennomsnittlig plakkstørrelse. Et felt for bemerkninger ble benyttet
20 for å registrere henholdsvis bildekvalitet og eksklusjonskriterier. Eksklusjonskriterier var manglende deler av snittet, mange rynker, dominante mangler eller ikke-konsistent farging (f.eks. på grunn av utbulinger som kan forstyrre den fulle reaksjonen av blokkeringsreagens).
- hh) Lukke vinduet uten å lagre (for å beholde rådataene rå).

25

Resultater

i) Generelle observasjoner

Totalt 40 hAPP-Tg-hunnmus ble inntatt i studien. Fra disse musene døde 12 mus av ukjente grunner før behandlingsperioden var ferdig.

30 ii) Adferdsresultater

Spatial læring i MWM forble i stor grad upåvirket av XG-102 (SEQ ID nr. 11)-behandling. Mus behandlet med 0,1 mg/kg viste en tendens til å ha dårligere læringsevne mellom dag 1 og dag 4. En toveis-ANOVA av den gjennomsnittlige evnen på dag 1 og 4 avslørte svært signifikant læring for alle grupper ($p < 0,001$),
35 men også en signifikant påvirkning av faktorbehandling ($p = 0,045$). Likevel nådde ikke Bonferronis post-test signifikans.

iii) Biokjemiske resultater

aa) A β -nivåer i hjernehomogenatfraksjoner

En behandling med testforbindelsen XG-102 (SEQ ID nr. 11) påvirket ikke hjernehomogenatnivåer av A β ₁₋₄₀ (se figur 11). Gruppeforskjeller i A β ₁₋₄₂-nivåer forekom kun i Triton X-100-fraksjon. Der viste dyr behandlet med den lave dosen av testforbindelsen XG-102 (SEQ ID nr. 11) (0,1 mg/kg) en signifikant reduksjon sammenlignet med vehikkelgruppen ($p < 0,05$) og sammenlignet med høydosegruppen ($p < 0,01$).

bb) CSF-A β -nivåer

Etter behandling med testforbindelsen XG-102 (SEQ ID nr. 11) var nivåer av A β ₁₋₄₀ og A β ₁₋₄₂ signifikant minsket i CSF sammenlignet med vehikkelgruppe. For både A β ₁₋₄₀ og A β ₁₋₄₂ var p-verdier $p < 0,01$ for den høye dosen (10 mg/kg) og $< 0,05$ for den lave dosen av XG-102 (SEQ ID nr. 11) (se figur 12).

iv) Resultater av hjernehistologi og immunhistokjemi

aa) Amyloid-deponeringer og plakkbelastning

Plakkbelastning ble kvantifisert med to ulike fremgangsmåter. På den ene siden ble en IHC-farging med 6E10 primært rettet mot AA1-17 på det humane amyloide peptidet utført, på den andre siden ble en ThioflavinS-farging som markerer beta-falte-strukturer og kjerner for modne, neuritiske plakk utført. Først av alt var målte regionarealer, cortex og hippocampus svært konstante i alle grupper, noe som indikerer at problemer i kutting og IHC-prosedyrer kan bli ekskludert og til en viss grad også en behandlingsindusert atrofi (endringer på > 5 % ville vært påviselige med denne fremgangsmåten). 6E10- og ThioflavinS-kvantifiseringer avslørte en selektiv reduksjon av beta-flatestrukturer i sentrum av plakkene etter behandling med XG-102 (SEQ ID nr. 11), mens humant amyloid forble upåvirket av behandling eller litt økt. I detalj var cortex-6E10-IR-plakkbelastning økt i forhold til vehikkel hos musene behandlet med 10 mg/kg XG-102 (SEQ ID nr. 11), likevel ble signifikansnivå nådd for antallet plakk i hippocampus. Figurene 13 og 14 viser, i kontrast til 6E10-IHC. At behandling med XG-102 (SEQ ID nr. 11) førte til en negativ doseavhengig reduksjon av antallet ThioflavinS-positive plakk i hippocampus, i tillegg til arealprosentandel (antall plakk: $p < 0,05$ for 10 mg/kg, $p < 0,01$ for 0,1 mg/kg XG-102 (SEQ ID nr. 11)). Behandling med 0,1 mg/kg XG-102 (SEQ ID nr. 11) reduserte også plakkstørrelse, men denne effekten nådde ikke signifikant nivå i ANOVA (uparet, tohalet T-test: $p = 0,074$). Disse effektene ble ikke gitt for cortex-plakk, et forhold som mest sannsynlig skyldes den senere

fremkomsten av plakk-patologi i hippocampus enn i cortex. Behandlingsstart ved 5 måneders alder treffer nøyaktig tidspunktet for plakkdeponering i hippocampus, mens cortex-plakk begynner å bli synlige ved anvendelse av forstørrelse for kvantifisering ved tre måneders alder. Kvalitativt øker andelen 6E10- i forhold til ThioflavinS-fargede plakk, og beta-flateplakk-kjernene, som det fremgår på dobbeltmerkede snitt, blir mindre i størrelse. Oppsummert underbygger disse dataene at behandling med XG-102 (SEQ ID nr. 11) virker mot beta-flatedannelse i de tidlige fasen av plakkdeponering og beta-flatedannelse i plakkjerner.

d) Oppsummering av effekter og konklusjoner.

- Spatial navigasjon målt i Morris-Water-Maze forble i stor grad upåvirket av behandling. Behandling med 0,1 mg/kg XG-102 (SEQ ID nr. 11) førte til litt dårligere læreevne mellom første og siste treningsdag.
- Bortsett fra en minskning i Triton X-100-fraksjonen i 0,1 mg/kg XG-102 (SEQ ID nr. 11)-gruppen forble hjernenivåer av $A\beta_{1-40}$ og $A\beta_{1-42}$ stabile.
- En minskning i $A\beta$ -nivåer var påvisbar i CSF for begge doseringer og fragmenter.
- Behandling med XG-102 (SEQ ID nr. 11) førte til en tendensiøs økning av humant amyloid beta i den høyere doserte gruppen i 6E10-kvantifiseringene, som er i overensstemmelse med data oppnådd i $A\beta$ -ELISA.
- I motsetning til dette var hippocampus-beta-flate-belastningen som ble påvist med ThioflavinS-farging doseavhengig redusert etter behandling med XG-102 (SEQ ID nr. 11), i en høyere grad enn ved lavere dose på 0,1 mg/kg XG-102 (SEQ ID nr. 11), mens cortex-plakkbelastning forble uendret. I overensstemmelse med den aldersavhengige fremkomsten av plakkdeponering i hippocampus ved behandlingsstart hinter dette mot en tidlig virkning på beta-flatedannelse i den tidlige fasen av plakkdeponering.

Sammenligningseksempel 15: Bestemmelse av aktiviteten til kun-D-retro-invers-IB(s)-peptider og varianter derav i behandlingen av diabetes type 2

Eksempel 15 er designet for å bestemme aktiviteten til IB(s)-peptider og kun-D-retro-invers-IB(s)-peptider og varianter derav i behandlingen av diabetes type 2, spesielt for å bestemme effekten av kronisk behandling med XG-102 (SEQ ID nr.

11) i db/db-musemodell for type-2 diabetes ved evaluering av fastende blodglukosenivåer hver tredje dag (28 dager).

a) Materialer og fremgangsmåter

5 i) Dyr

Totalt 20 db/db-hannmus (8 uker gamle) ble oppnådd fra Charles River (Tyskland). Ved ankomst ble dyrene holdt i grupper (n = 6-7/gruppe) og gitt regulært gnagerfor (Altromin standard #1324-for, C. Petersen, Ringsted, Danmark) og vann ad libitum dersom ikke annet er opplyst.

10 Musene ble holdt under en syklus på 12:12 L/D (lys på kl 04:00 og lys av kl. 16:00) og i temperatur- og fuktighetskontrollerte rom.

ii) Grupper og randomisering

15 På dag -4 ble dyr randomisert i overensstemmelse med blodglukosenivå (fastet, blodglukose målt på Biosen S-line analysator (EKF Diagnostic, Tyskland) for å delta i én av de følgende legemiddelbehandlingsgruppene (n=6):

- 1) Vehikkelkontroll, S.C. (fysiologisk saltløsning)
- 2) XG-102 (SEQ ID nr. 11), 1 mg/kg, s.c.
- 3) XG-102 (SEQ ID nr. 11), 10 mg/kg, s.c.

20

Alle doser som er listet opp ble beregnet for den frie basen. Legemiddelrenhet: 95, 28 %, peptidinnhold: 78,0 %. Alle forbindelser ble administrert subkutan (s.c.) i et volum på 3 ml/kg. Formuleringsinstruksjonene for vehikkelkontroll og XG-102 (SEQ ID nr. 11) var som følger:

25 Først ble XG-102 (SEQ ID nr. 11) løst i vehikkelen. Formuleringene (konsentrasjoner på 0,3 og 3,3 mg/ml, tilsvarende doser på henholdsvis 1 og 10 mg/kg) ble klargjort i overensstemmelse med prosedyren som er beskrevet i detalj nedenfor. Konsentrasjoner ble beregnet og uttrykt ved å ta hensyn til testforbindelsesrenhet og peptidinnhold (multiplikatorcoeffisient var 1,346).

30 - Klargjøring av stock-løsning: den frysetørkede testforbindelsen XG-102 (SEQ ID nr. 11) blir tint i én time minimum og klargjort som stock-løsning i vehikkelen ved 1 mM (tilsvarende 3,823 mg/ml). Volumer ble klargjort for hver behandlingsdag og lagret ved omtrent -80 °C.

35 Fortynninger av denne stock-løsningen til de ønskede konsentrasjonene blir utført på hver behandlingsdag,

- Lagring av stock-løsningene: ved omtrent -80 °C,

- Lagring av de fortynnede preparatene: ved romtemperatur i 24 timer maksimalt.

5 Før løseliggjøring ble pulveret lagret ved -20 °C. Stabiliteten til stock-løsningen er 3 måneder ved omtrent -80 °C, stabiliteten til de fortynnede formuleringene for dyredosering er 24 timer ved romtemperatur. Ubrukt, fortynnet materiale kan bli lagret i opptil 7 dager dersom det oppbevares ved 4-8 °C.

Eksperimentell prosedyre

10 Etter 8 dager med akklimatisering ble musene behandlet daglig kl. 08:00 i 21 dager ved SC-dosering 8 timer før lysene slukkes kl. 16:00 i overensstemmelse med gruppene. Deretter, på studiedag 21, så ble dosering av den høyeste konsentrasjonen av XG-102 (SEQ ID nr. 2) (10 mg/kg) stoppet, mens daglig dosering av
15 vehikkelkontroll og XG-102 (SEQ ID nr. 2) (1 mg/kg) ble fortsatt inntil studiedag 28. Fra dag 28 inntil terminering på dag 111 ble de vehikkel- og XG-102 (SEQ ID nr. 2) (10 mg/kg)-behandlede musene observert i en utvaskingsperiode (ingen dosering), mens musene behandlet med XG-102 (SEQ ID nr. 2) (1 mg/kg) ble terminert etter 28 dager med behandling.

i) Blodglukose

20 Blodglukose ble målt fra 7 timers fastende dyr 6 timer etter dosering ved innsamling av blodprøver på 10 µl fra halevenen i hematokrittrør og påfølgende analyse på en Biosen s-line analysator (EKF-diagnostic, Tyskland).

ii) Metabolske bur

25 Gruppene 1+3: Mus ble plassert i metabolske bur for registrering av 24 timers for- og vanninntak i tillegg til 24 timers urin- og fecesproduksjon. Mus ble stratifisert i to undergrupper på n = 6-7 og deretter ble den metabolske karakteriseringen utført på studiedagene 71-72.

iii) Adipokinpanel

30 Gruppene 1+3: Ved tre tilfeller (studiedagene 57, 66 og 108) ble blod samlet fra halevenen ved å benytte EDTA-belagte hematokrittrør (100 µl). Etter sentrifugering av blod ble plasma samlet og lagret ved -20 °C inntil måling. Deretter ble det følgende panelet av adipokiner/cytokiner bestemt ved å benytte Luminex-basert 7-plex: leptin, resistin, MCP-1, PAI-1, TNF, insulin og interleukin-6 (IL-6).

35 iv) Terminering

Gruppene 1+3 (dag 111): De følgende organene ble fjernet og veid: subkutan lyskefett, epididymalt fett, retroperitonealt fett, hjerne, lever, nyre, milt og

hjerne. Alle organer beskrevet ovenfor var prøver i 4 % PFA for eventuell fremtidig histopatologisk undersøkelse. Prøver av pankreas (en bloc) ble også tatt for eventuell stereologisk og immunhistokjemisk analyse, og prøver av øyne ble tatt for eventuell senere analyse av retinopati. Gruppe 2 (dag 28): Ikke noe vev eller plasma ble samlet inn.

c) Resultater

i) Generelle observasjoner

Under den akutte doseringsperioden viste dyr normale nivåer av årvåkenhet og aktivitet og det var ingen tegn på sedatering hos de legemiddelbehandlede dyrene. For- og vanninntak lå innenfor normale grenser hos vehikkelbehandlede dyr. Etter omtrent to uker med dosering ble likevel nodulær fibrose observert i det subkutane vevet som en reaksjon på XG-102 (SEQ ID nr. 2)-forbindelse i den høye dosen, og disse utviklet seg til åpne sår hos alle musene i gruppe C. I gruppe B ble mild nodulær fibrose observert. Som en konsekvens ble en endring av injeksjonsstedet foretatt. Etter slutten på dosering av dyrene ble dyrene helet og den nodulære fibrosen forsvant gradvis. Vi observerte ingen kliniske effekter hos de vehikkelbehandlede dyrene.

ii) Blodglukose

Fastende blodglukosenivåer (absolutte og relative) er vist på figur 15. Fastende blodglukose ble målt hver tredje dag inntil dag 68 og på en regulær basis inntil terminering på dag 111 i gruppene A og C. Vi observerte en klar og signifikant ($p < 0,001$) minskning i nivået av fastende blodglukose hos de diabetiske db/db-musene behandlet med XG-102 (SEQ ID nr. 2) (10 mg/kg) sammenlignet med vehikkelkontroll. De fastende blodglukosenivåene hos musene behandlet med XG-102 (SEQ ID nr. 2) (10 mg/kg) nådde et lavt platå på omtrent 5 mmol/L. Denne effekten var tydelig etter 14 dager med dosering og vedvarte gjennom hele studien, og slik gjennom hele utvaskingsperioden fra dag 21 til dag 111. I motsetning til dette observerte vi ingen effekt med lavdose XG-102 (SEQ ID nr. 2) (1 mg/kg) gjennom 28 dager med dosering.

iii) Kroppsvekt

Kroppsvektbestemmelser (absolutte og relative) er vist på figur 16. Vi observerte en klar og signifikant ($p < 0,001$) forebygging av kroppsvektøkning hos mus behandlet med XG-102 (SEQ ID nr. 2) (10 mg/kg) sammenlignet med vehikkelkontroll. Denne effekten var åpenbar fra dag 28 med dosering og vedvarte inntil terminering på dag 111. I motsetning til dette observerte vi ingen effekt med lavdose av XG-102 (SEQ ID nr. 2) (1 mg/kg) på kroppsvekt i løpet av de 28 dagene med dosering.

iv) Metabolske bur

Effekten av vehikkel eller XG-102 (SEQ ID nr. 2) (10 mg/kg) på 24 timers for- og vanninntak, og urin- og fecesproduksjon som målt i metabolske bur på studiedag 28 er vist på figurene 17 (g) og 18 (normalisert til g kroppsvekt). Vi observerte ingen signifikante effekter av XG-102 (SEQ ID nr. 2) (10 mg/kg) på noen av de målte parameterne sammenlignet med vehikkelkontroll selv om en trend mot minskning i matinntak og urinproduksjon ble observert.

v) Adipokiner

Effekten av vehikkel eller XG-102 (SEQ ID nr. 2) (10 mg/kg) som målt på dagene 57, 77 og 108 på plasmanivåer av insulin, MCP-1 og IL-6 er vist på figur 19, på plasmanivåer av tPAI-1, TNF og resistin på figur 20. Vi observerte ingen signifikante effekter av XG-102 (SEQ ID nr. 2) (10 mg/kg) på noen av de målte parameterne sammenlignet med vehikkelkontroll, bortsett fra nivåene for plasma-resistin som var signifikant høyere i XG-102 (SEQ ID nr. 2)-behandlede dyr på dag 77 og 108.

vi) Vevsvekt og terminering

Effekten av vehikkel eller XG-102 (SEQ ID nr. 2) (10 mg/kg) på vevsvekt av epididymalt, lyske-subkutant og retroperitonealt fett er vist på figur 21. Vi observerte en signifikant minskning av epididymal ($p < 0,05$) og retroperitoneal ($p < 0,01$) fettmasse hos mus behandlet med XG-102 sammenlignet med vehikkelkontroll. Effekten av vehikkel eller XG-102 (SEQ ID nr. 2) (10 mg/kg) på vevsvekt av hjerne, milt og hjerte er vist på figur 22. Vi observerte signifikante effekter av XG-102 (SEQ ID nr. 2) (10 mg/kg) på disse parameterne sammenlignet med vehikkelkontroll. Til slutt er effekten av XG-102 (SEQ ID nr. 2) (10 mg/kg) på vevsvekt av nyre og lever vist på figur 23. Vi observerte en signifikant minskning av nyremasse ($p < 0,05$) og levermasse ($p < 0,01$) i musene behandlet med XG-102 (SEQ ID nr. 2) sammenlignet med vehikkelkontroll.

Som en oppsummering av resultatene ser det ut til at administrering av XG-102 (SEQ ID nr. 11) (10 mg/kg) fører til en signifikant senkning av blodglukosenivåer og derfor ser XG-102 (SEQ ID nr. 11) ut til å være et lovende nytt verktøy for behandling av diabetes og forhøyede blodglukosenivåer.

PATENTKRAV

1. JNK-inhibitorpeptid bestående av en aminosyresekvens ifølge SEQ ID nr. 2 eller kimært peptid bestående av et første domene og et andre domene forbundet med en kovalent binding, der det første domenet omfatter en trafikkeringssekvens, og det andre domenet består av en JNK-inhibitorsekvens ifølge SEQ ID nr. 2, for anvendelse i en fremgangsmåte for behandling av kreftsykdommer valgt fra Kaposis sarkom, akutt myeloid leukemi, inkludert erytroleukemi, melanomer, maligne melanomer, kolonkarsinomer, lymfomer, blastomer, nyrekarsinomer, gastrointestinaltumor, gliomer, prostatatumorer, blærekreft, rektaltumor, magekreft, øsofaguskreft, pankreaskreft, leverkreft, brystkarsinomer (= brystkreft), livmorkreft, livmorhalskreft, akutt myeloid leukemi (AML), akutt lymfoid leukemi (ALL), kronisk myeloid leukemi (CML), kronisk lymfocytteleukemi (CLL), hepatomer, ulike virusinduserte tumor, slik som f.eks. papillomvirusinduserte karsinomer (f.eks. livmorhalskarsinom = livmorhalskreft), adenokarsinomer, herpesvirusinduserte tumor (f.eks. Burkitts lymfom, EBV-indusert B-cellelymfom), hepatitt-B-induserte tumor (hepatocellekarsinomer), HTLV-1- og HTLV-2-induserte lymfomer, akustisk neurinom, lungekarsinomer (= lungekreft = bronkiekarsinom), småcellede lungekarsinomer, strupekreft, analkarsinom, glioblastom, rektumkarsinom, astrocytom, hjernetumor, retinoblastom, basaliom, hjernemetastaser, medulloblastomer, vaginalkreft, testikkelkreft, skjoldbruskkjertelkreft, Hodgkins syndrom, meningeomer, Schneeborgers sykdom, hypofysetumor, mycosis fungoides, karsinoider, neurinom, spinaliom, Burkitts lymfom, strupekreft, nyrekreft, tymom, corpus-karsinom, benkreft, non-Hodgkins lymfomer, urinveiskreft, CUP-syndrom, hode-/nakketumor, oligodendrogliom, vulvakreft, tarmkreft, kolonkarsinom, øsofaguskarinom (= øsofaguskreft), vortetilstander, tynntarmtumor, kraniofaryngomer, ovariekarsinom, bløtvevstumor, ovariekreft (= ovariekarsinom), pankreaskarsinom (= pankreaskreft), endometriekarsinom, levermetastaser, peniskreft, tungekreft, galleblærekreft, leukemi, plasmocytom, lid-tumor, og prostatakreft (= prostatatumor).
2. Kimært peptid for anvendelse ifølge krav 1, der det første domenet er koblet til den C-terminale enden av det andre domenet.
3. Kimært peptid for anvendelse ifølge krav 1 eller 2, der det første domenet og det andre domenet er direkte koblet med hverandre via en linkersekvens som omfatter 1 til 10 aminosyrer.

4. Kimært peptid for anvendelse ifølge ethvert av kravene 1 til 3, der trafikkeringssekvensen omfatter aminosyresekvensen til et humant immunsviktvirus-TAT-polypeptid.
5. Kimært peptid for anvendelse ifølge ethvert av kravene 1 til 4, der trafikkeringssekvensen består av eller omfatter aminosyresekvensen ifølge SEQ ID nr. 5, 6, 7, 8, 21 eller 22.
6. Kimært peptid for anvendelse ifølge ethvert av kravene 1 til 5, der trafikkeringssekvensen forsterker cellulært opptak av peptidet og/eller styrer nukleær lokalisering av peptidet.
7. Kimært peptid for anvendelse ifølge ethvert av kravene 1 til 6, der det kimære peptidet består av aminosyresekvensen ifølge SEQ ID nr. 11.
8. JNK-inhibitorpeptid for anvendelse ifølge krav 1 eller kimært peptid for anvendelse ifølge ethvert av kravene 1 til 7, der JNK-inhibitorpeptidet eller det kimære peptidet skal bli administrert ved en administreringsrute som er valgt fra gruppen som består av parenterale ruter, inkludert intravenøst, intramuskulært, subkutant, intradermalt, transdermalt, enteralt, inkludert oralt, rektalt, topisk, inkludert nasalt, intranasalt og andre ruter, inkludert epidermal levering eller plasterlevering.
9. JNK-inhibitorpeptid for anvendelse ifølge krav 1 eller 8, eller kimært peptid for anvendelse ifølge ethvert av kravene 1 til 8, der en dose (per kg kroppsvekt) av JNK-inhibitorpeptidet eller det kimære peptidet er i området på opp til 10 mmol/kg, fortrinnsvis opp til 1 mmol/kg, mer foretrukket opp til 100 µmol/kg, enda mer foretrukket opp til 10 µmol/kg, enda mer foretrukket opp til 1 µmol/kg, enda mer foretrukket opp til 100 nmol/kg, mest foretrukket opp til 50 nmol/kg.
10. JNK-inhibitorpeptid for anvendelse ifølge krav 1, 8 eller 9, eller kimært peptid for anvendelse ifølge ethvert av kravene 1 til 8, der en dose av JNK-inhibitorpeptidet eller det kimære peptidet er i området fra omtrent 1 pmol/kg til omtrent 1 mmol/kg, fra omtrent 10 pmol/kg til omtrent 0,1 mmol/kg, fra omtrent 10 pmol/kg til omtrent 0,01 mmol/kg, fra omtrent 50 pmol/kg til omtrent 1 µmol/kg, fra omtrent 100 pmol/kg til omtrent 500 nmol/kg, fra omtrent 200 pmol/kg til omtrent 300 nmol/kg, fra omtrent 300 pmol/kg til omtrent 100 nmol/kg, fra omtrent 500 pmol/kg til omtrent 50 nmol/kg, fra omtrent 750 pmol/kg til omtrent 30 nmol/kg, fra omtrent 250 pmol/kg til omtrent 5 nmol/kg, fra omtrent 1 nmol/kg til omtrent 10 nmol/kg, eller en kombinasjon av enhver av to av nevnte verdier.

Peptidsekvenser, human, mus og rotte

A	IB2	:	IPSPSVEEPHKHRPTTLRL--TTLGAQDS
	IB1	:	PGTGCGDTYRPKRPTTLNLFPPQVPRSQDT
	c-Jun	:	GAYGYSNPKILKQSMTLNLADPVGNLKPH
	ATF2	:	TNEDHLAVHKHKHEMTLKFGPARNDSVIV
:: **::			
B	L-IB1(s)	:	: . . ***** * **: --RPKRPTTLNLFPPQVPRSQD
	L-IB1	:	DTYRPKRPTTLNLFPPQVPRSQDT o o o
C	L-TAT:	:	NH ₂ -GRKKRRQRRR-COOH
	L-TAT-IB1(s)	:	NH ₂ -GRKKRRQRRRPP---RPKRPTTLNLFPPQVPRSQD-COOH
	L-TAT-IB1	:	NH ₂ -GRKKRRQRRRPPDTYRPKRPTTLNLFPPQVPRSQDT-COOH
	D-TAT	:	NH ₂ -RRRQRRKKRG-COOH
	D-TAT-IB1(s)	:	NH ₂ ---DQSRPVQPFNLTTTERKPR---PFRRRQRRKKRG-COOH
	D-TAT-IB1	:	NH ₂ -TDQSRPVQPFNLTTTPRKPRYTDPFRRRQRRKKRG-COOH

Fig. 1

EP 2 489 361 A1

Genetiske sekvenser, human, mus og rotte

L-generic-TAT(s) :	$\text{NH}_2\text{-X}_n^b\text{-RKKRRQRRR-X}_n^b\text{-COOH}$
L-TAT-IB (generic) (s):	$\text{NH}_2\text{-X}_n^b\text{-RKKRRQRRR-X}_n^b\text{-X}_n^a\text{-RPTTLXLXXXXXXXXQD-X}_n^b\text{-COOH}$
L-TAT-IB (generic) :	$\text{NH}_2\text{-XXXXXXXXKKRRQRRRXXXXXXXXXXXXXXXXRPTTLXLXXXXXXXXQDS/TX-COOH}$
D-generic-TAT(s) :	$\text{NH}_2\text{-X}_n^b\text{-RRRQRRKKR-X}_n^b\text{-COOH}$
D-TAT-IB (generic) (s):	$\text{NH}_2\text{-X}_n^b\text{-DQXXXXXXXXLXLTTTPR-X}_n^a\text{-X}_n^b\text{-RRRQRRKKR-X}_n^b\text{-COOH}$
D-TAT-IB (generic) :	$\text{NH}_2\text{-XT/SDQXXXXXXXXLXLTTTPRXXXXXXXXXXXXXXXXRRRQRRKKRXXXXXXXXXX-COOH}$

Fig. 2

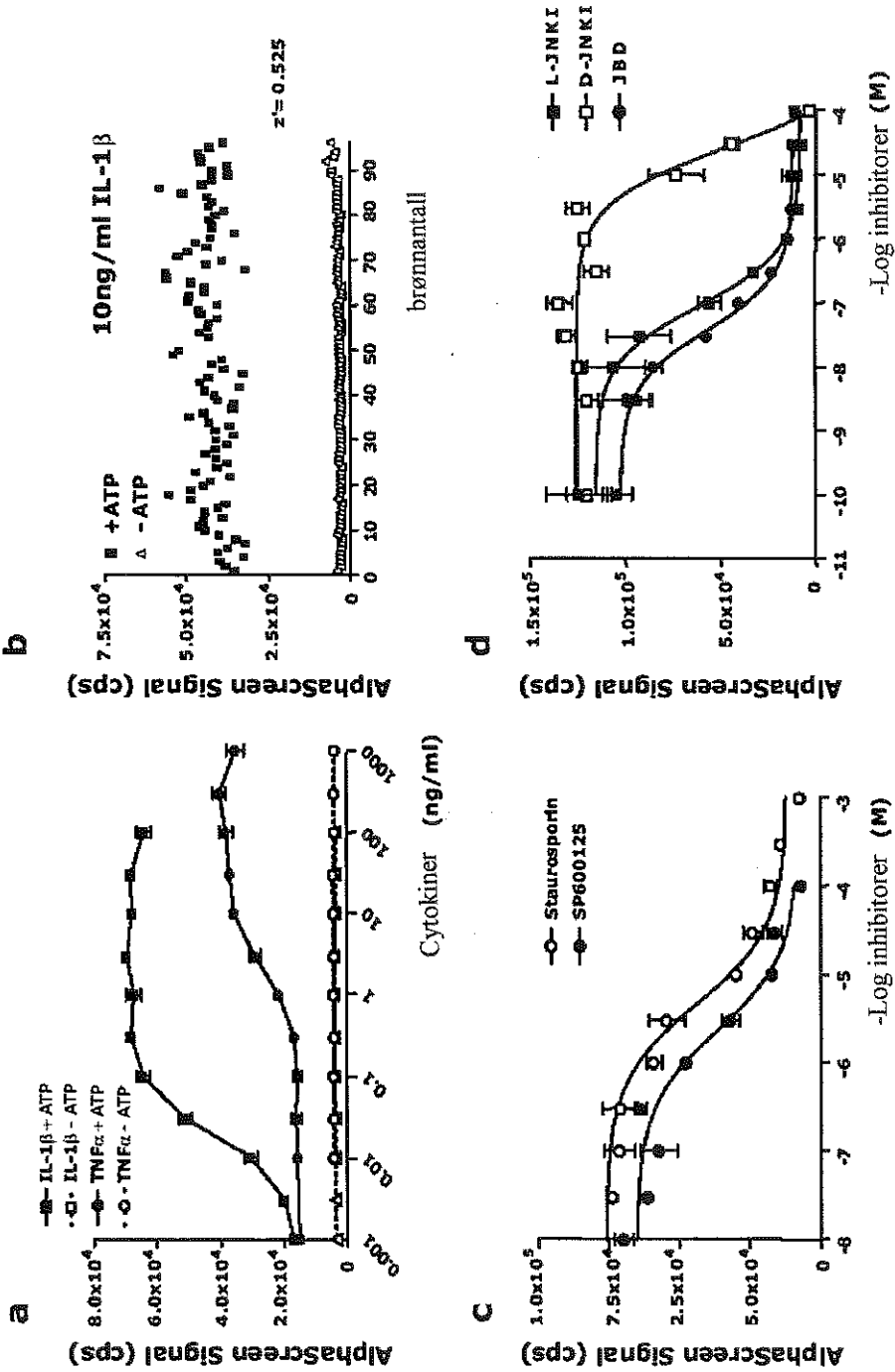


Fig. 3

EP 2 489 361 A1

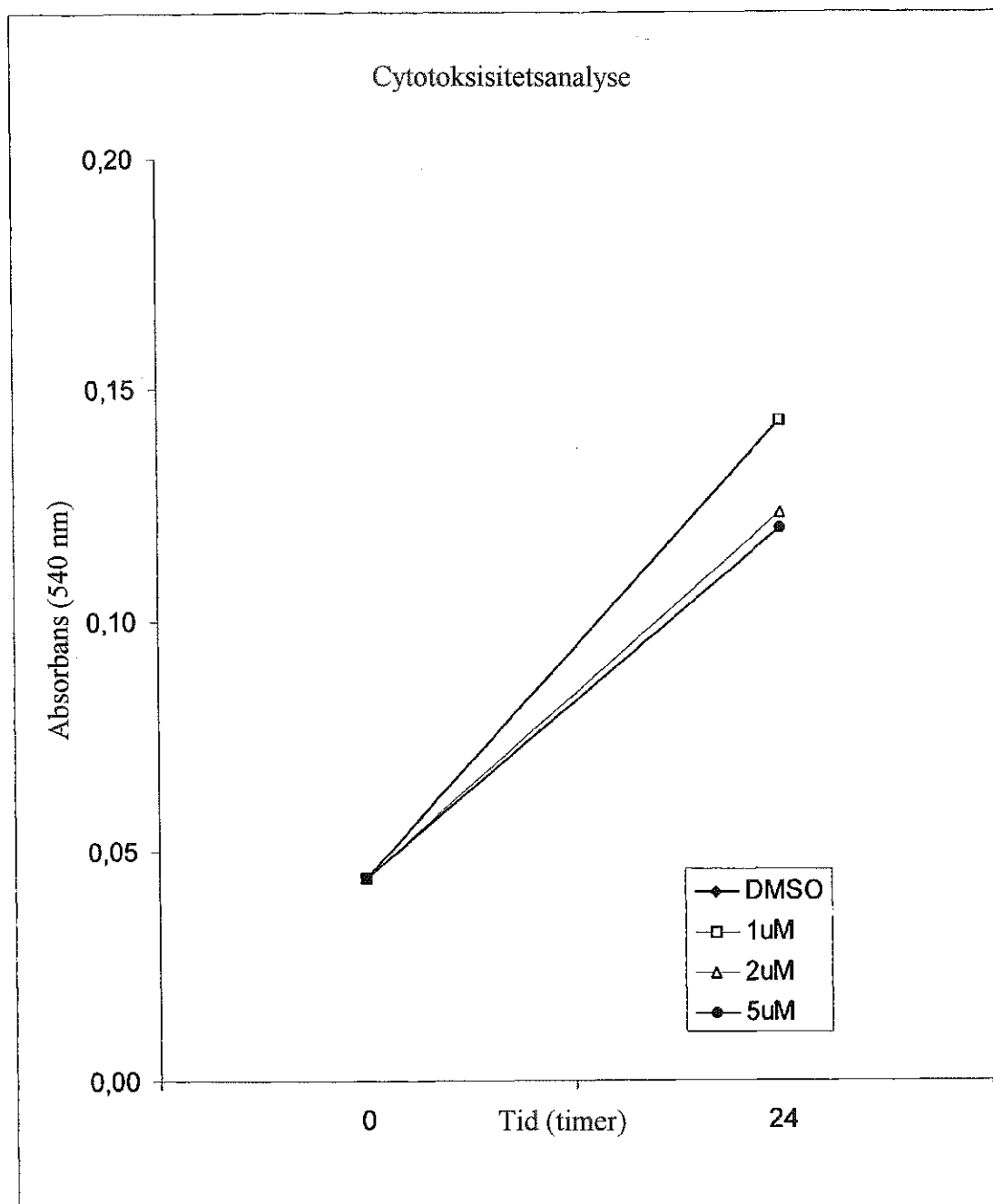


Fig. 4

EP 2 489 361 A1

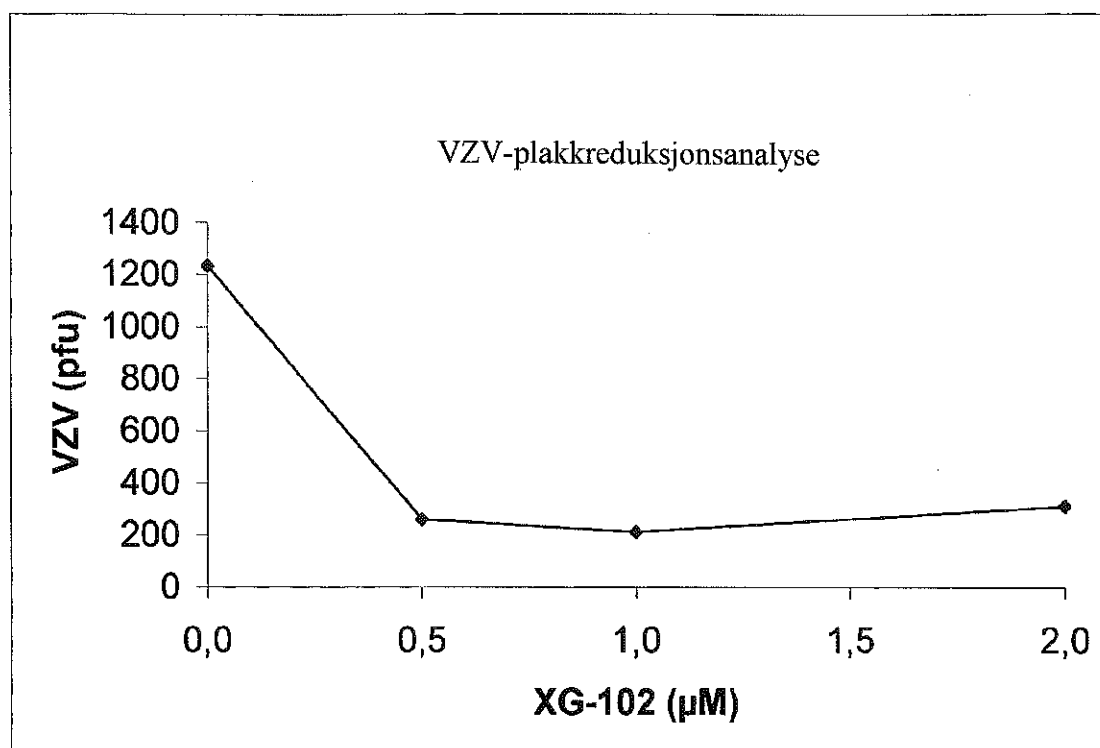


Fig. 5

EP 2 489 361 A1

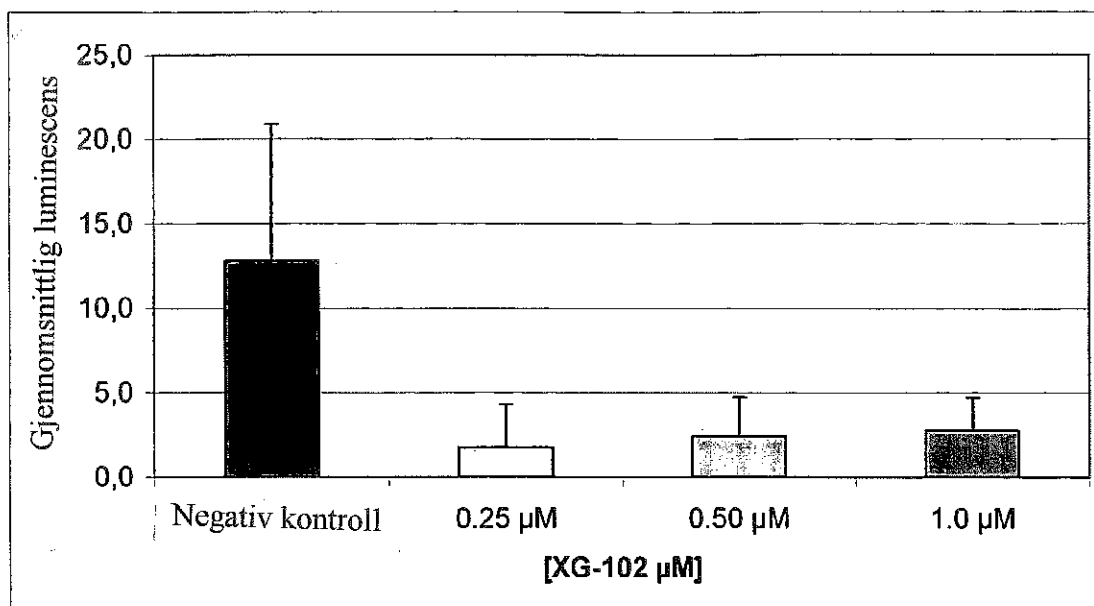


Fig. 6

EP 2 489 361 A1

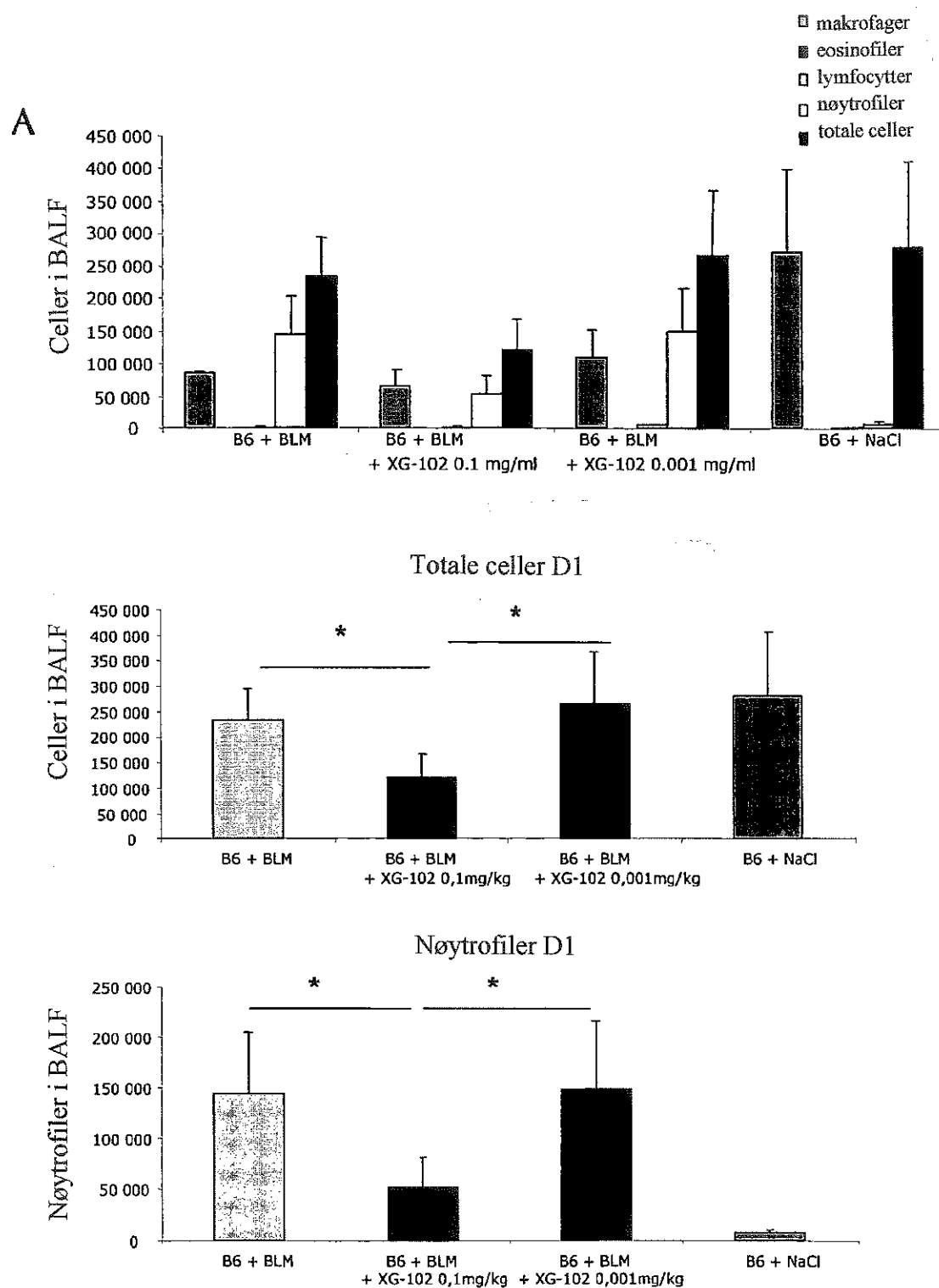


Fig. 7

EP 2 489 361 A1

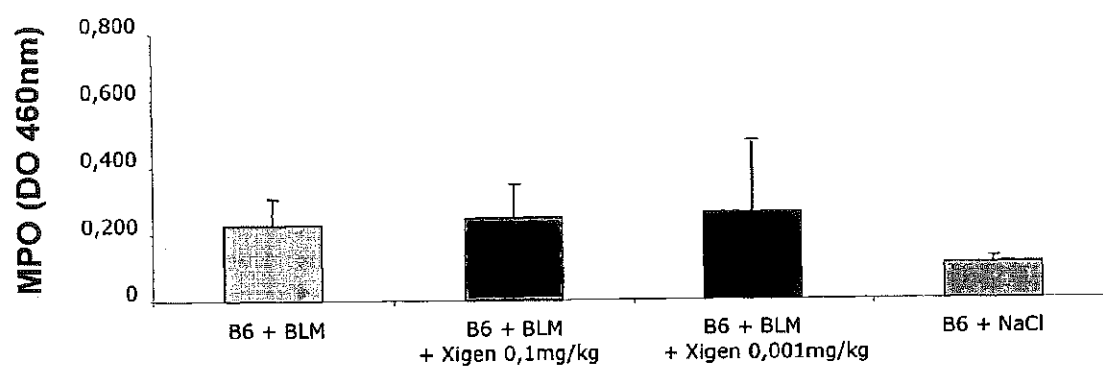


Fig. 8

EP 2 489 361 A1

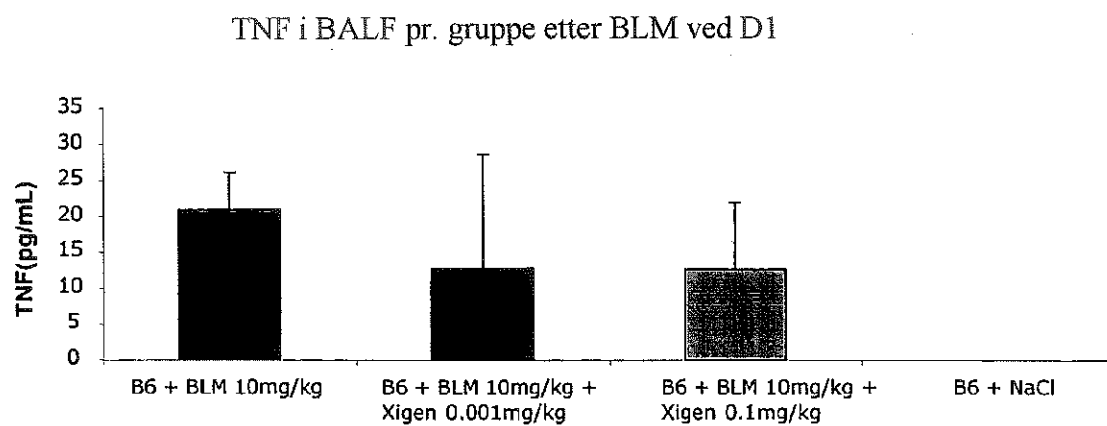


Fig. 9

EP 2 489 361 A1

A

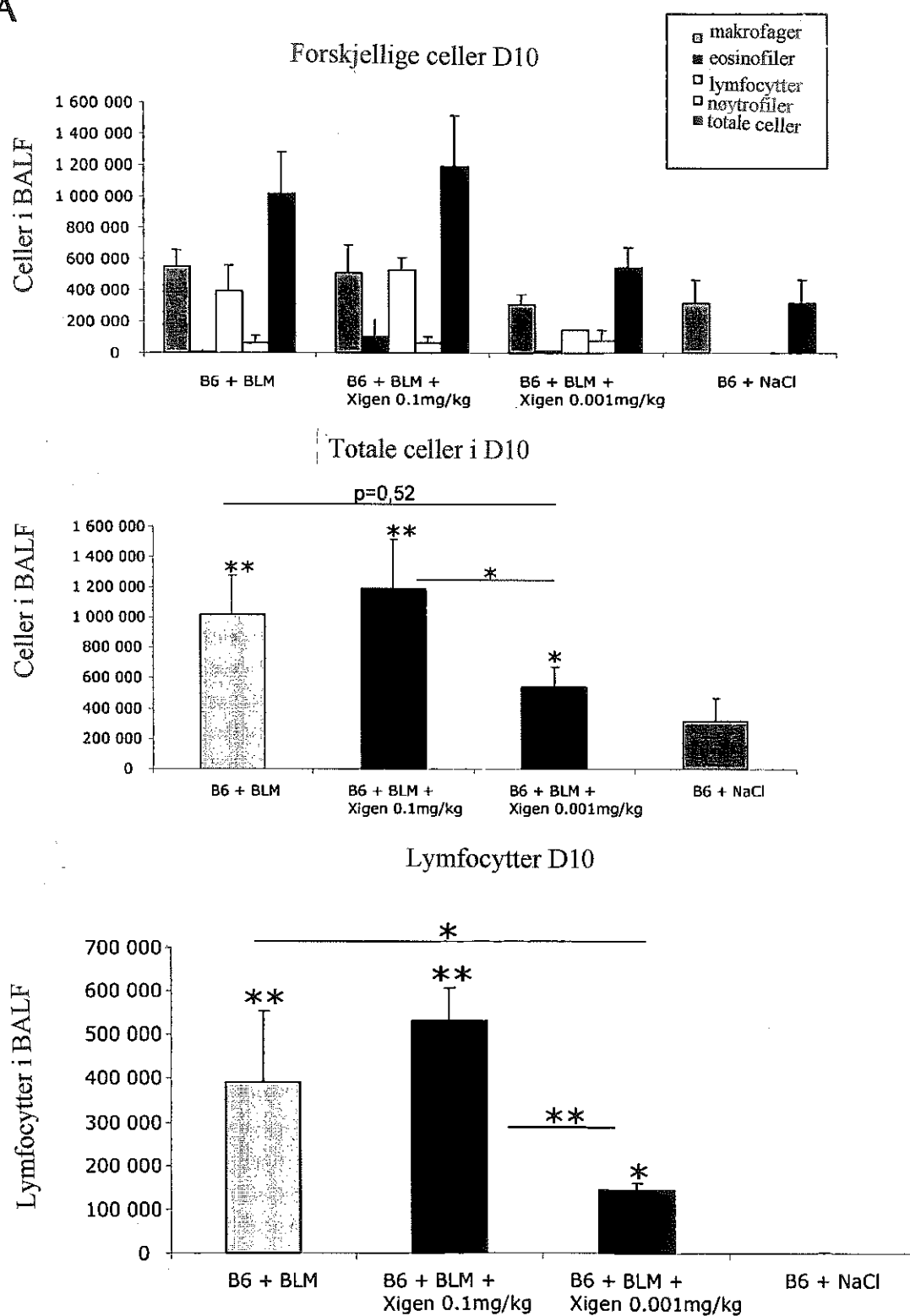


Fig. 10

EP 2 489 361 A1

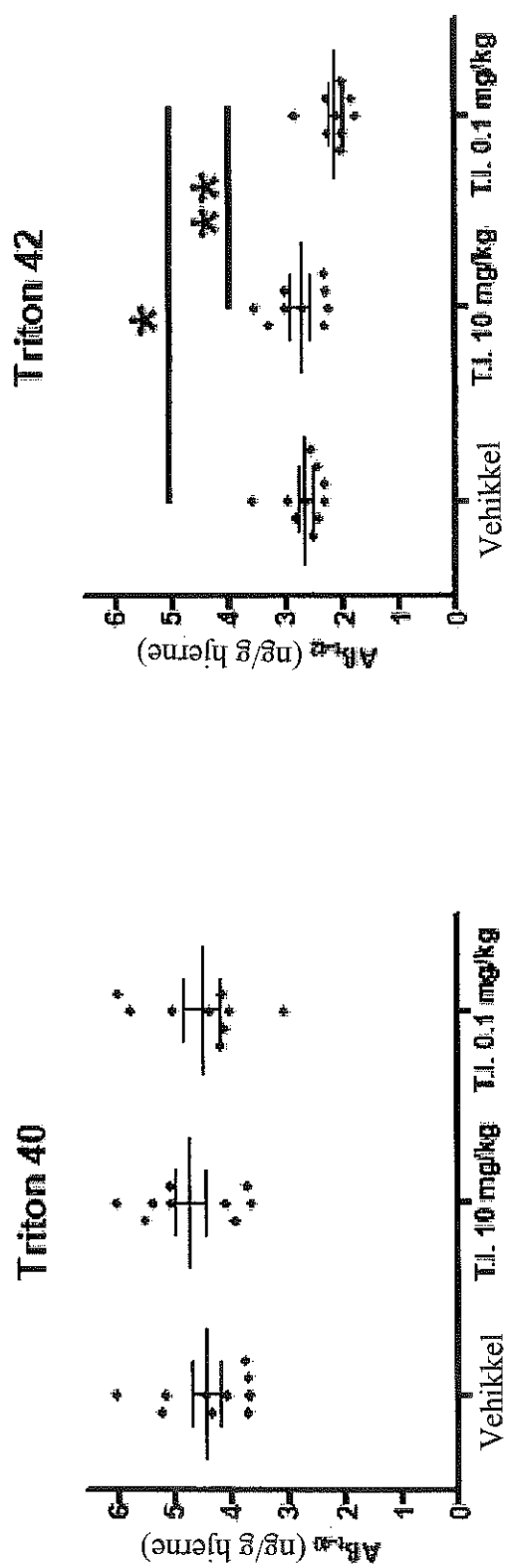


Fig. 11

EP 2 489 361 A1

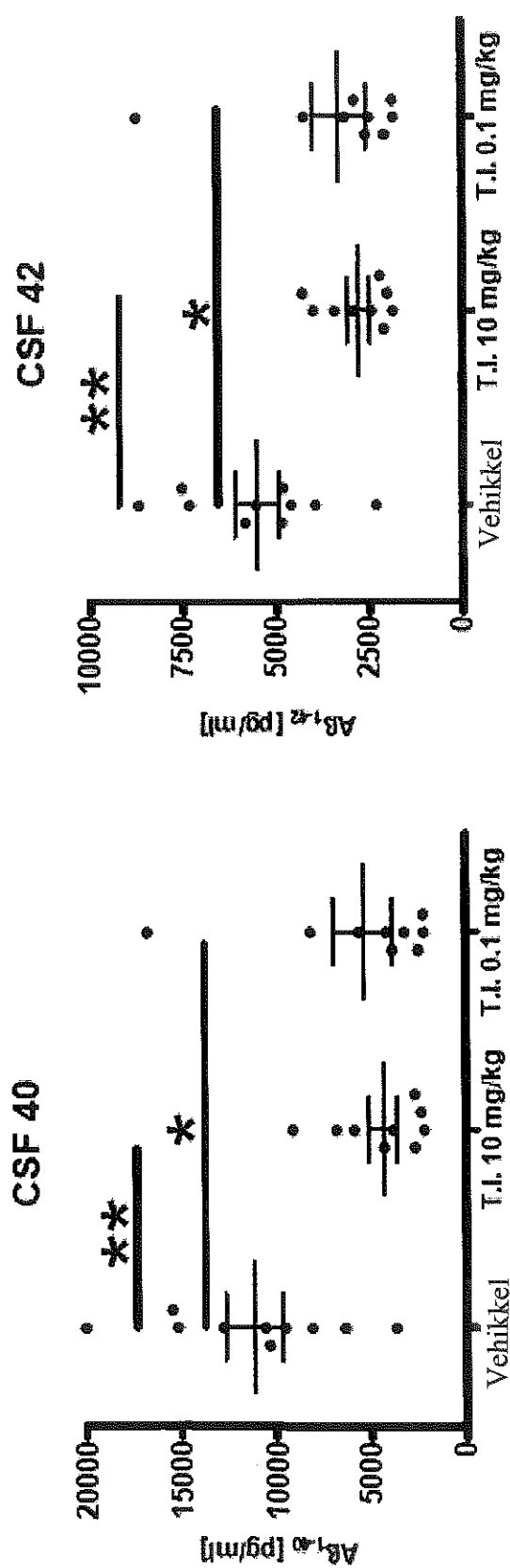


Fig. 12

EP 2 489 361 A1

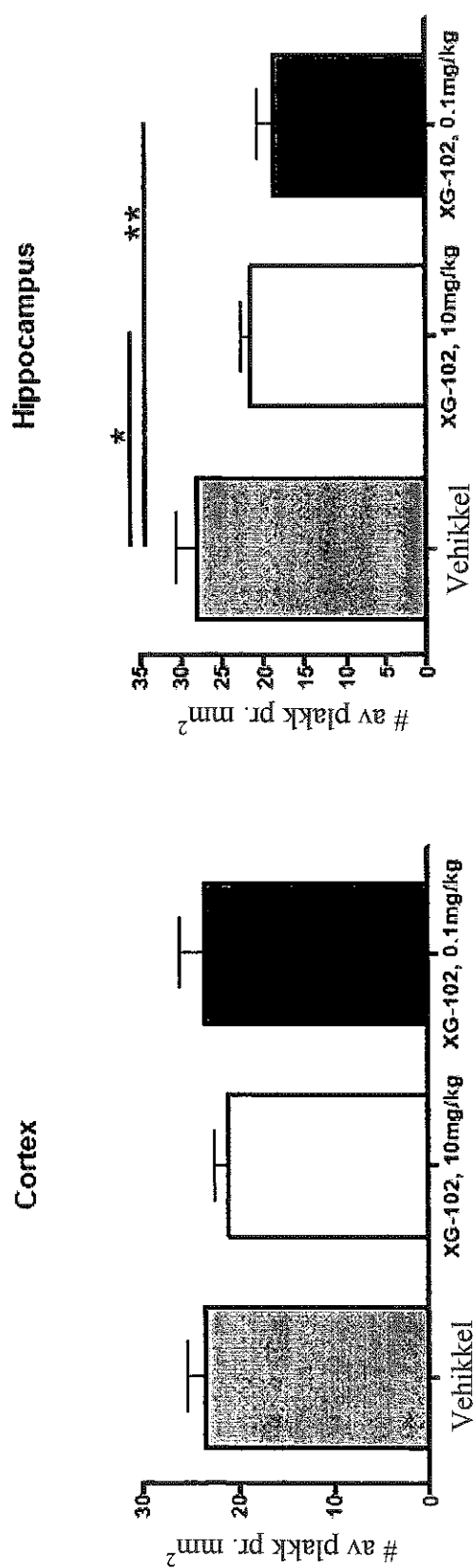


Fig. 13

EP 2 489 361 A1

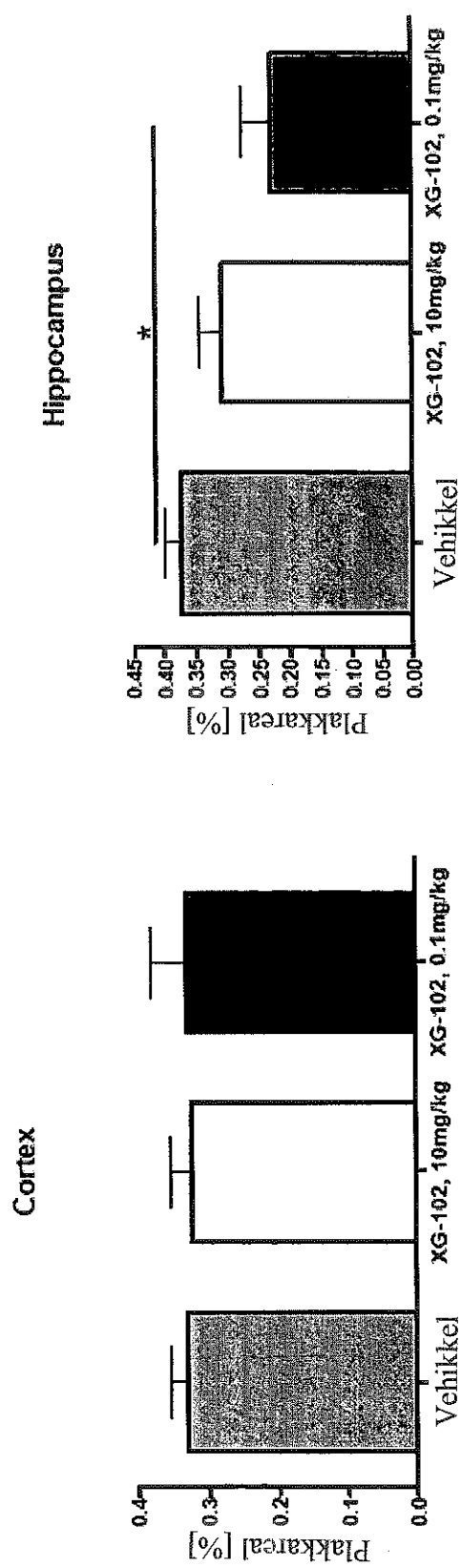


Fig. 14

EP 2 489 361 A1

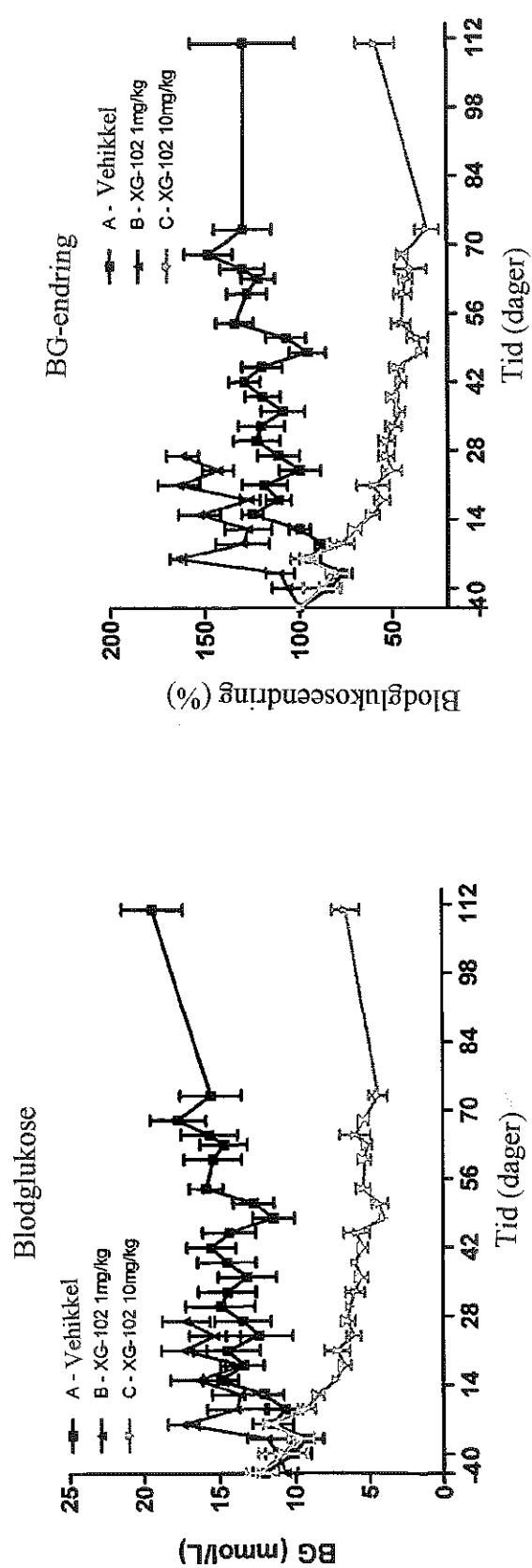


Fig. 15

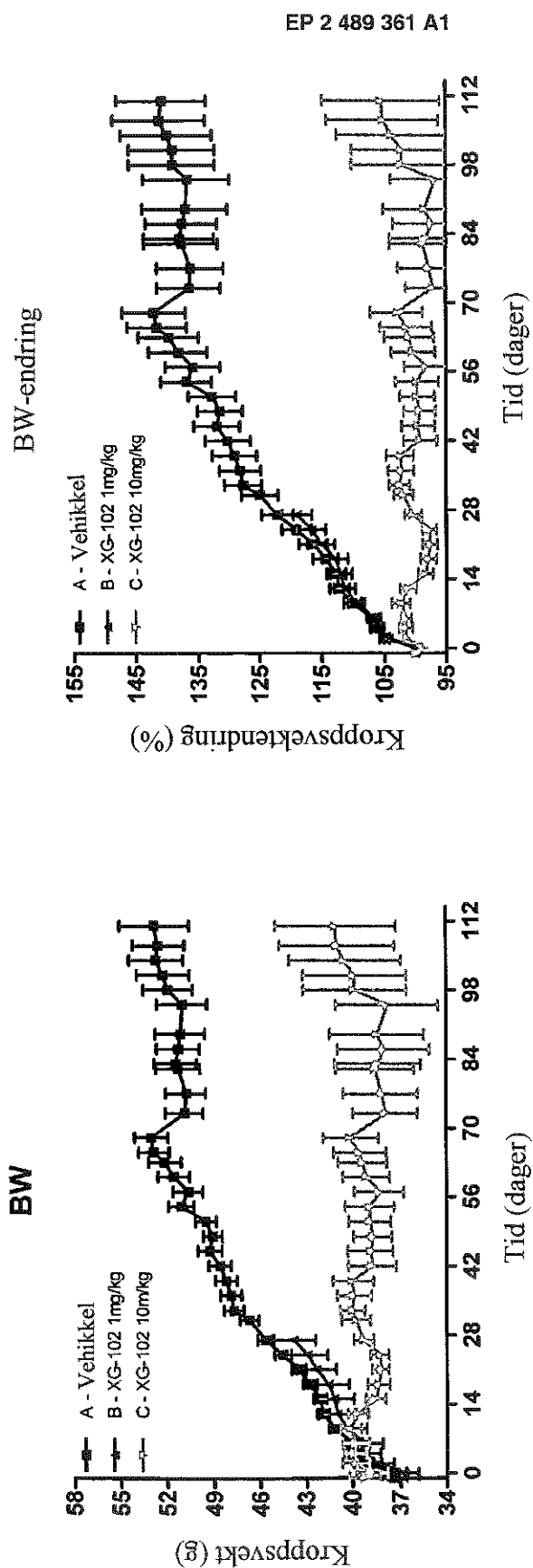


Fig. 16

EP 2 489 361 A1

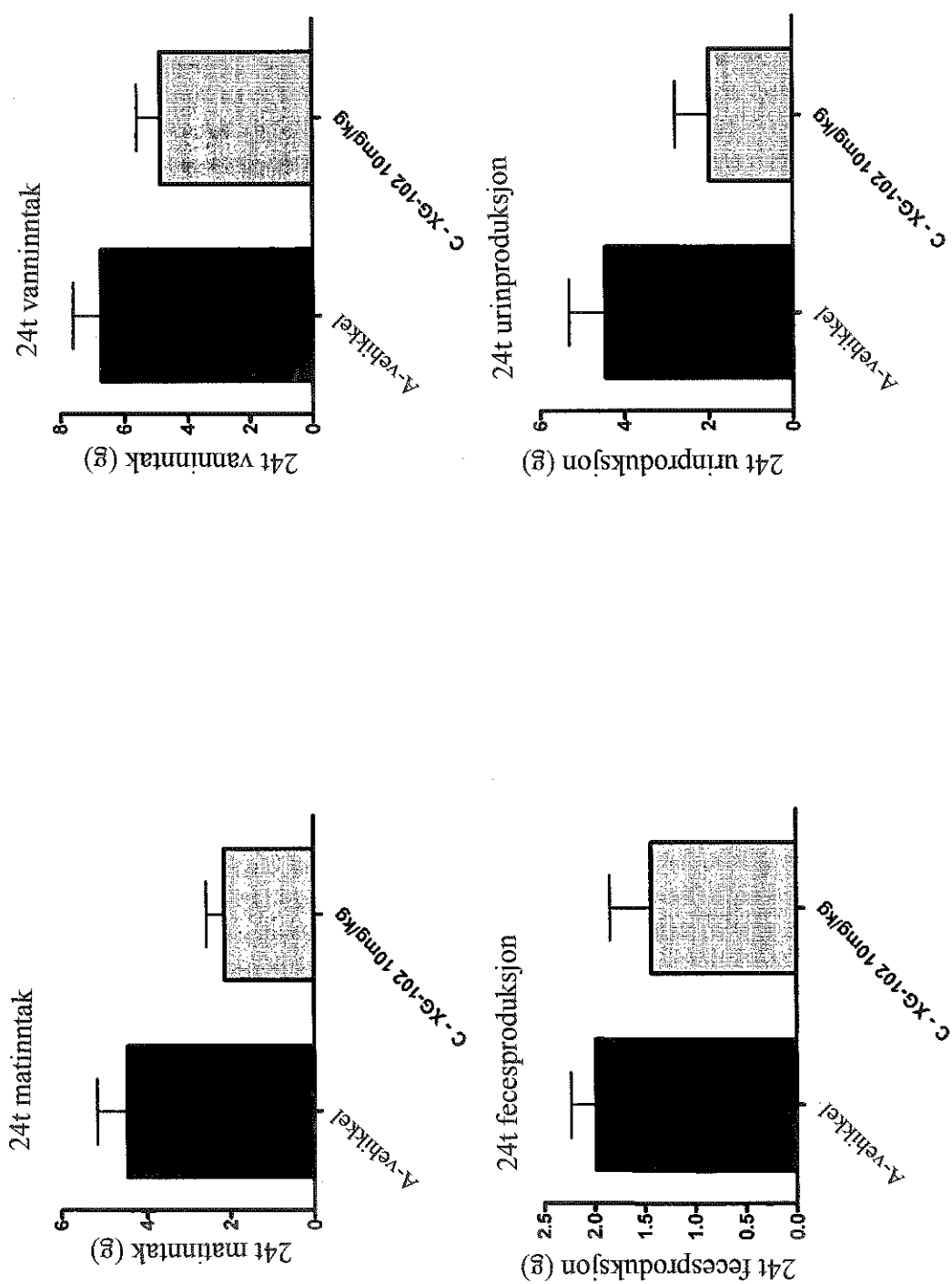


Fig. 17

EP 2 489 361 A1

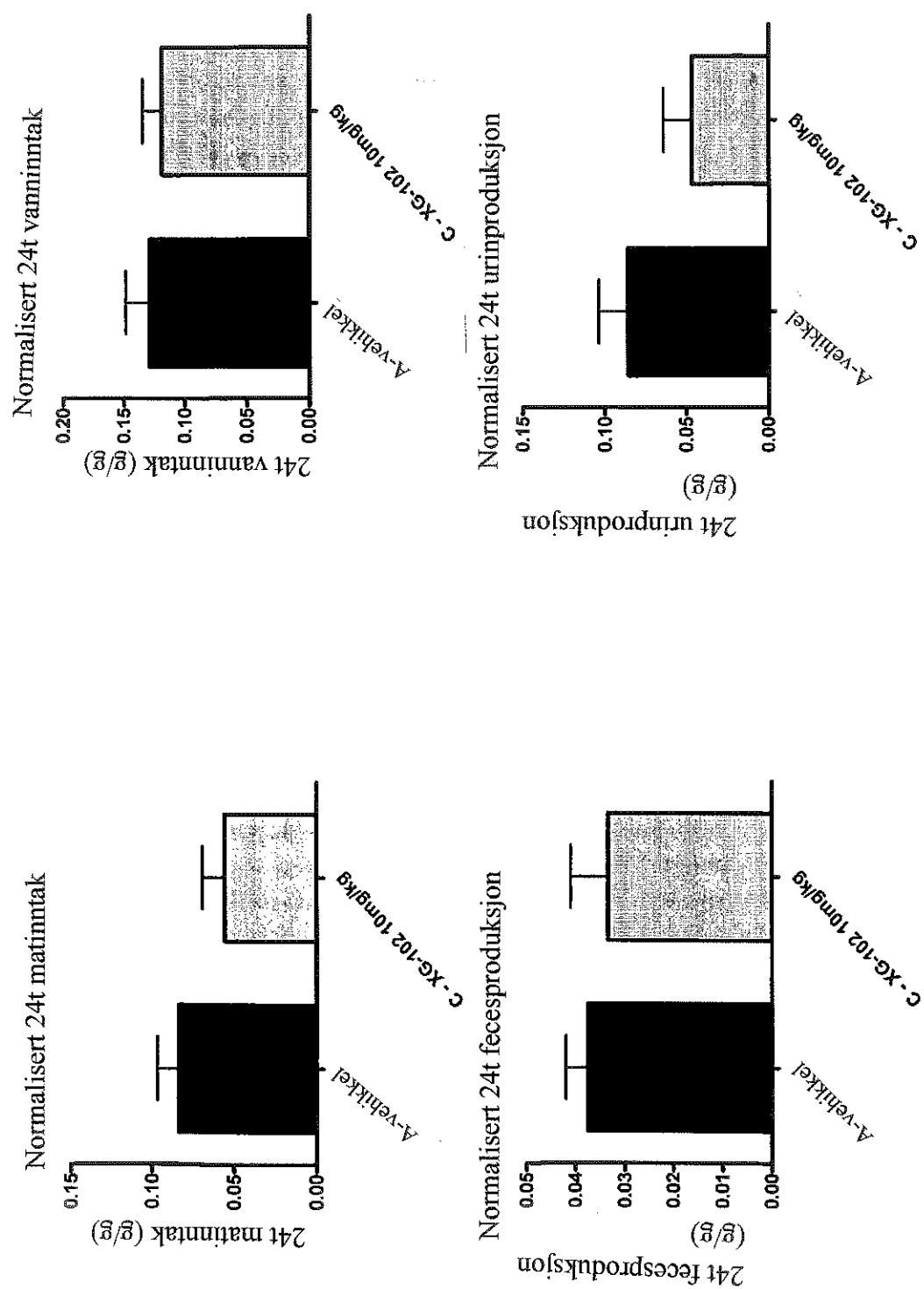
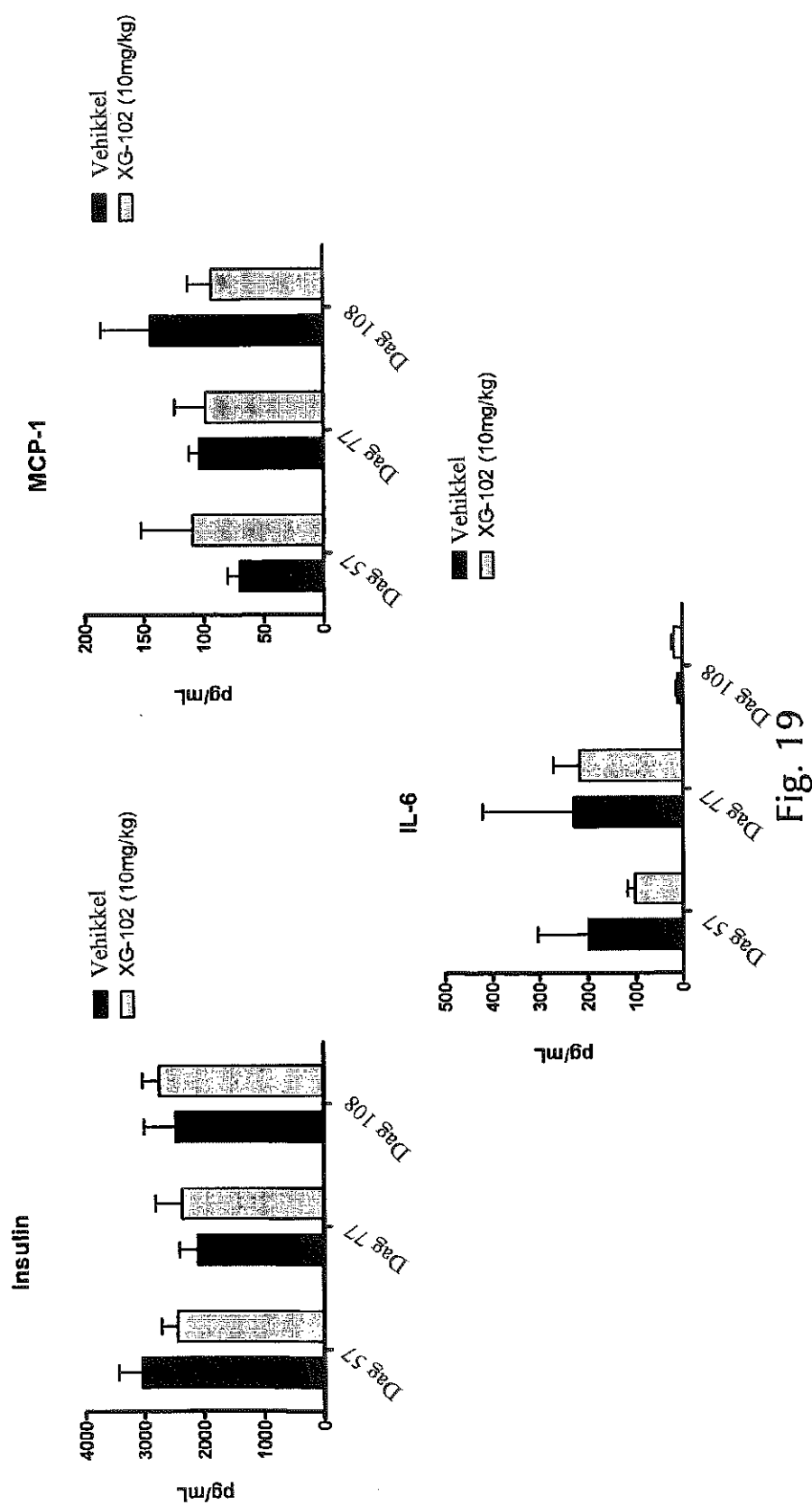


Fig. 18

EP 2 489 361 A1



EP 2 489 361 A1

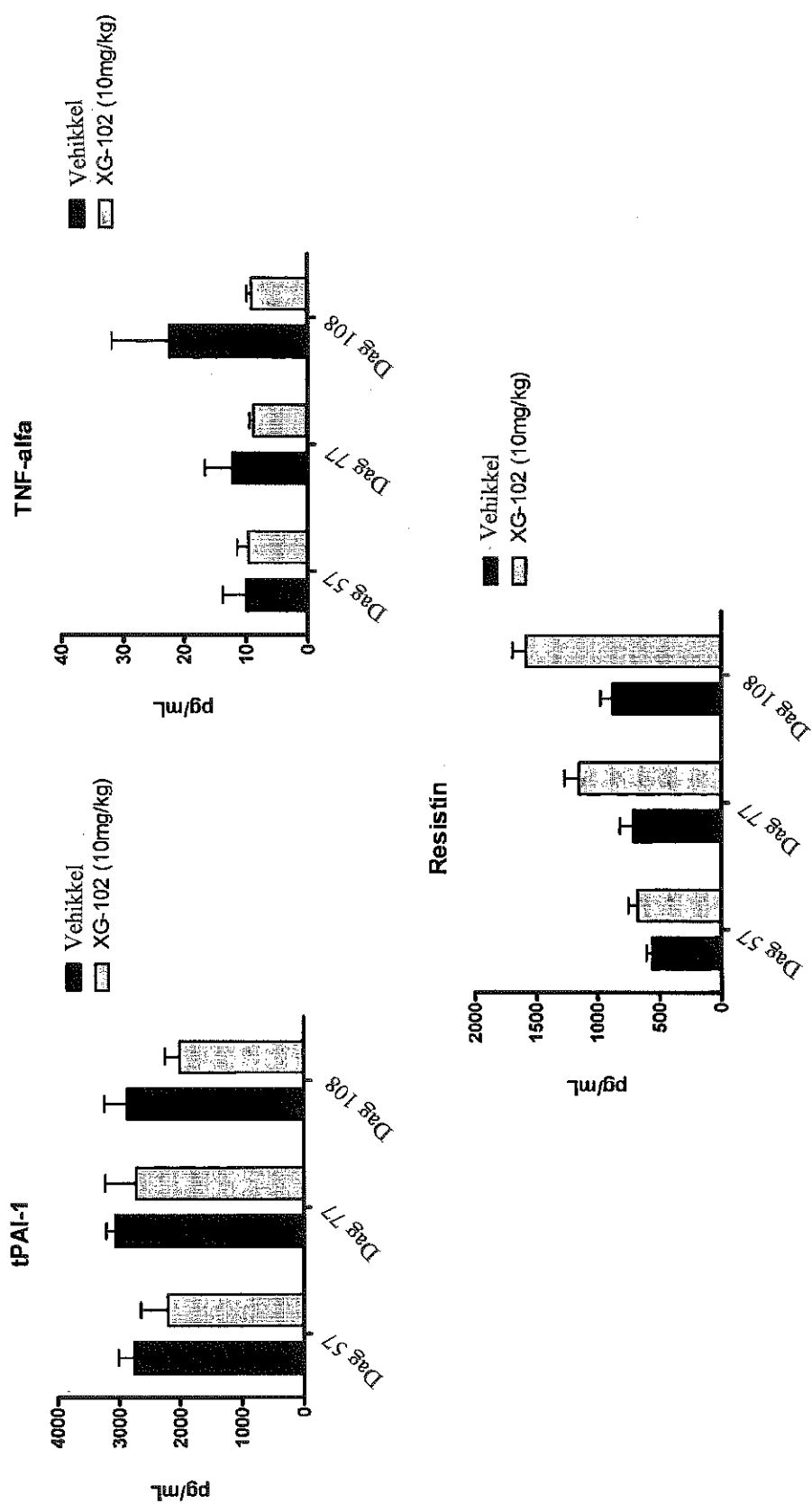


Fig. 20

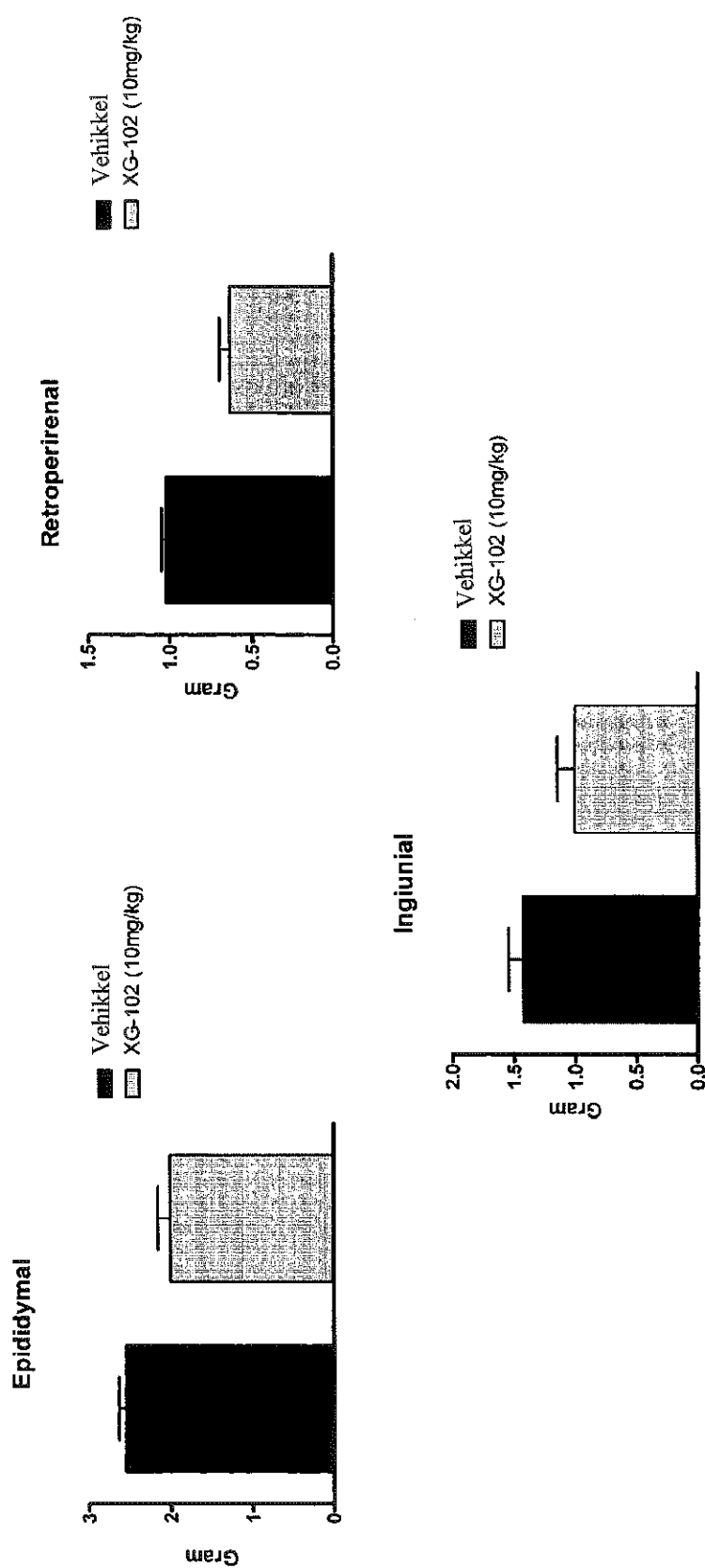


Fig. 21

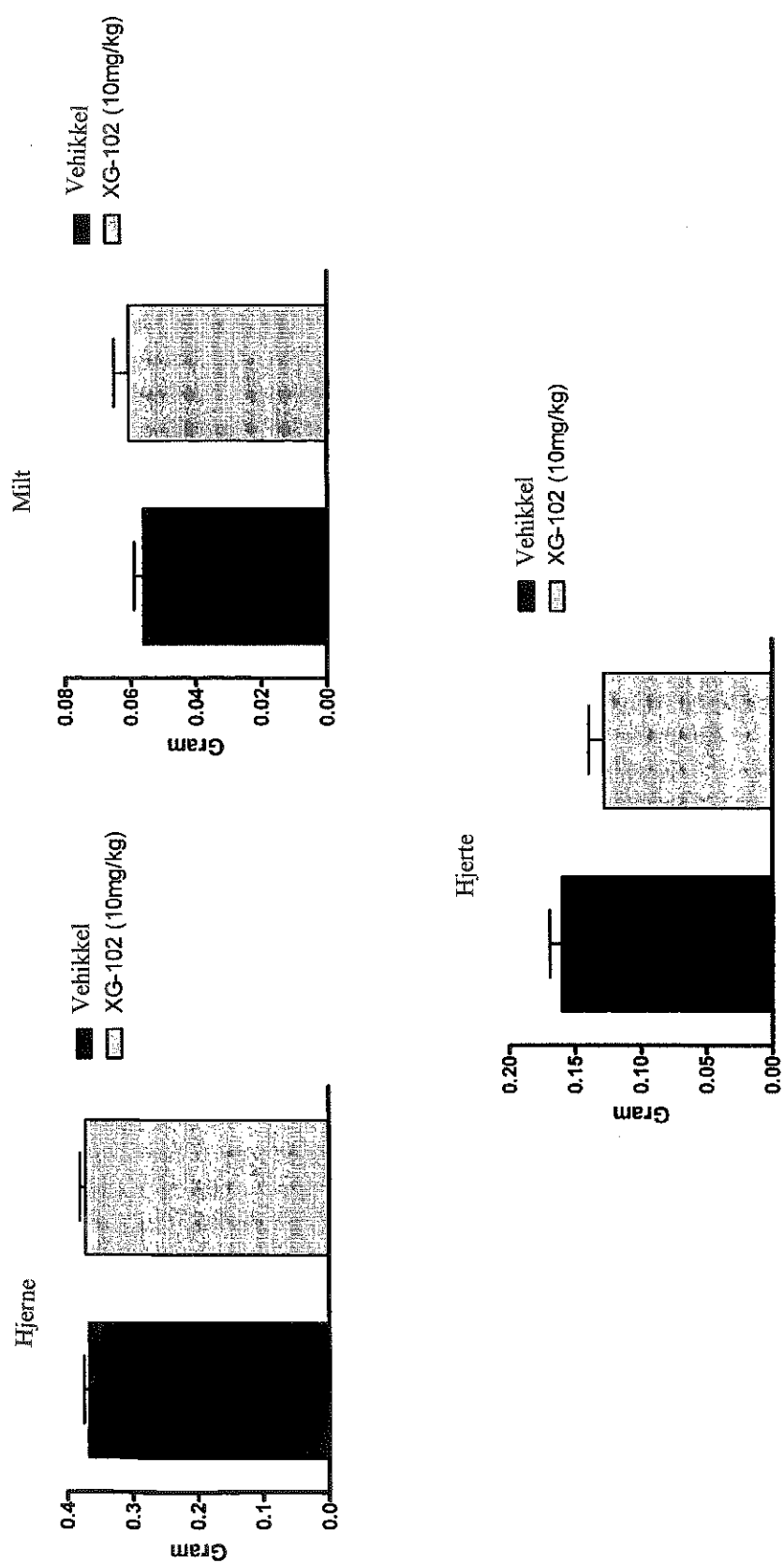


Fig. 22

EP 2 489 361 A1

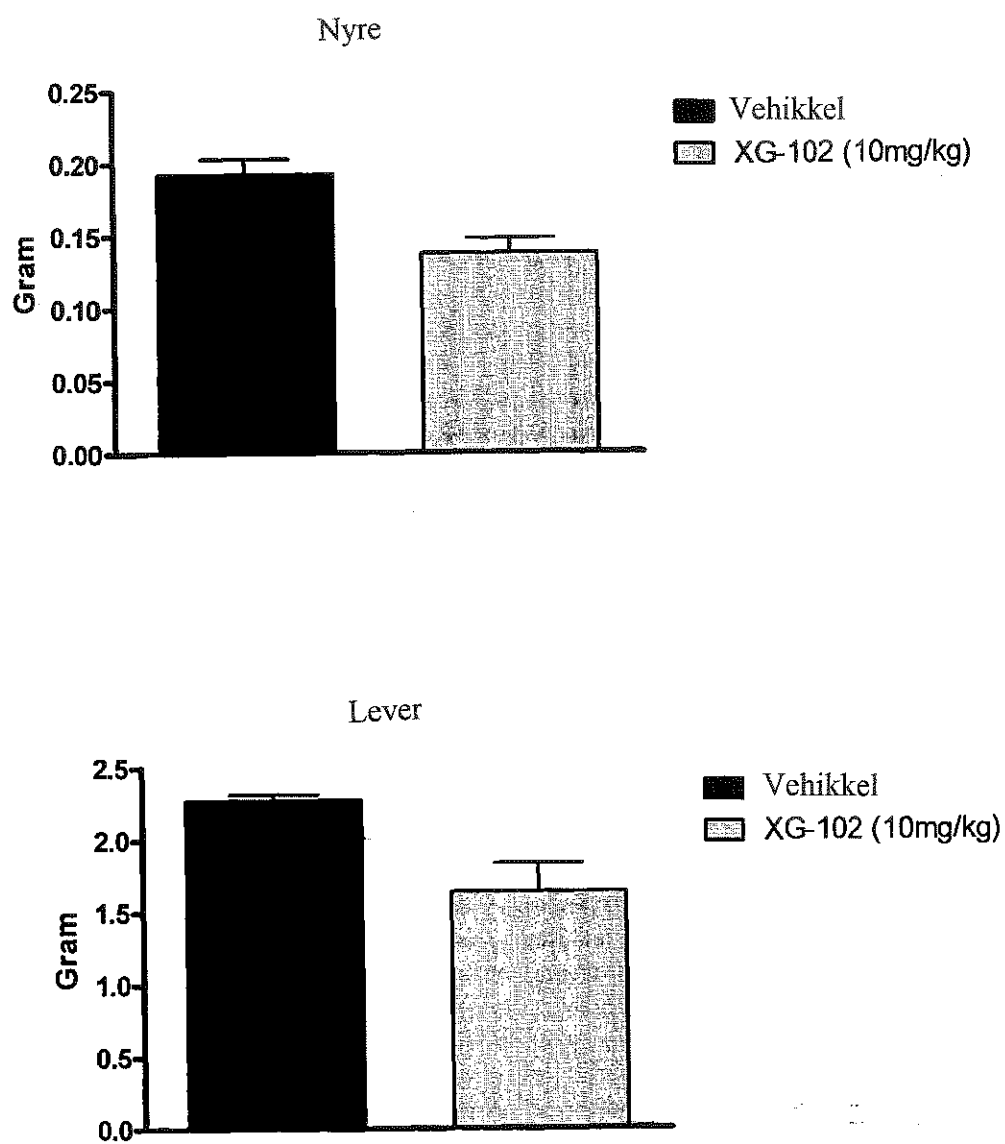


Fig. 23

EP 2 489 361 A1

Makrofag



DMEM-kontroll



XG-102

Fig. 24

EP 2 489 361 A1

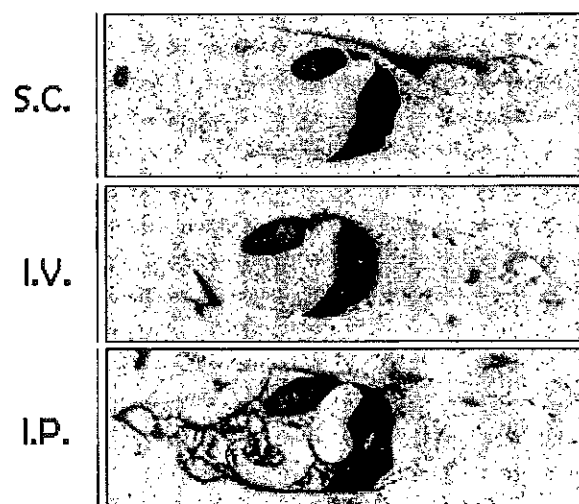
 ^{14}C -XG-102

Fig. 25

EP 2 489 361 A1

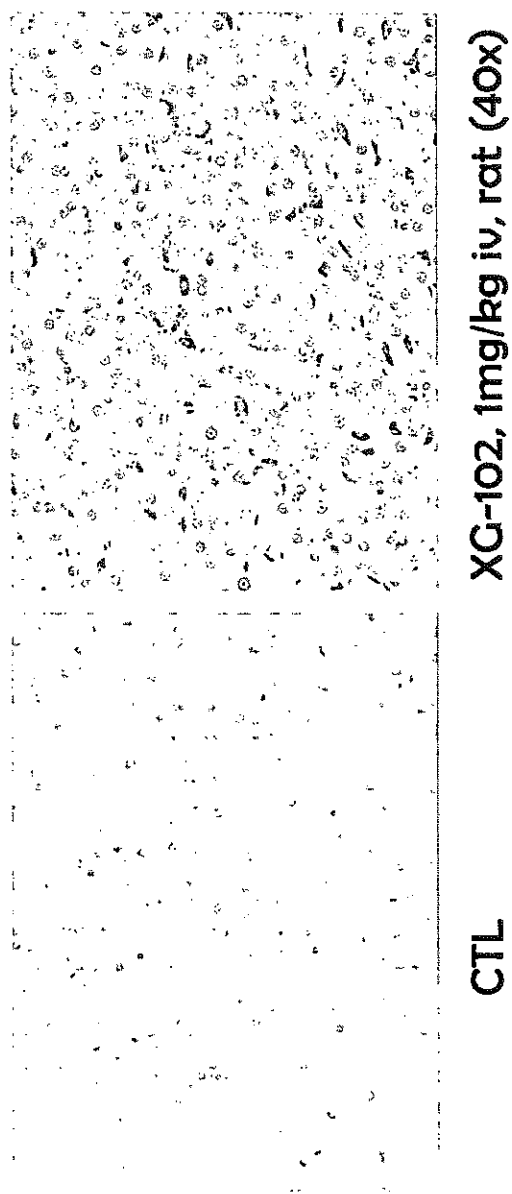


Fig. 26

EP 2 489 361 A1

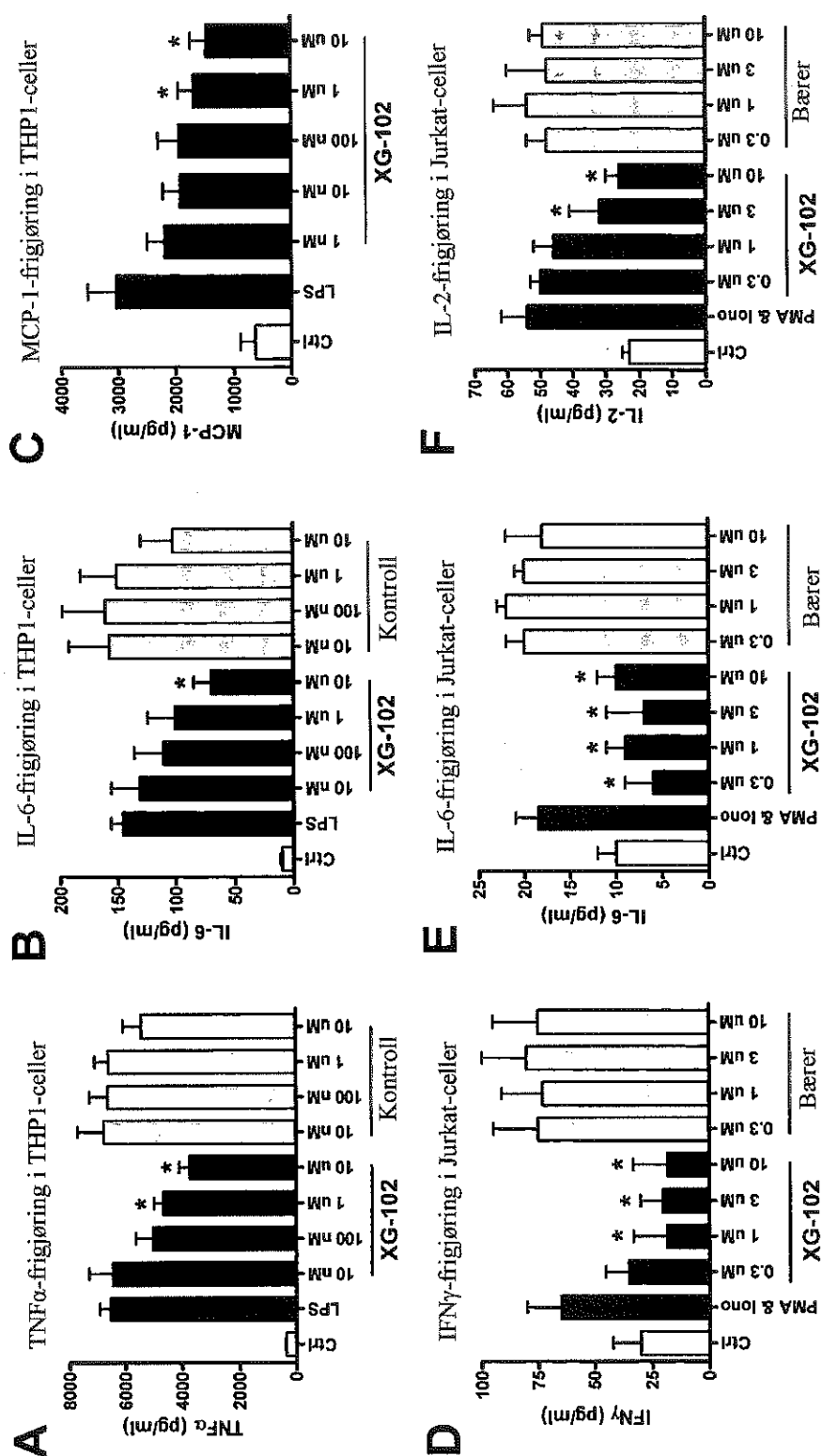


Fig. 27

EP 2 489 361 A1

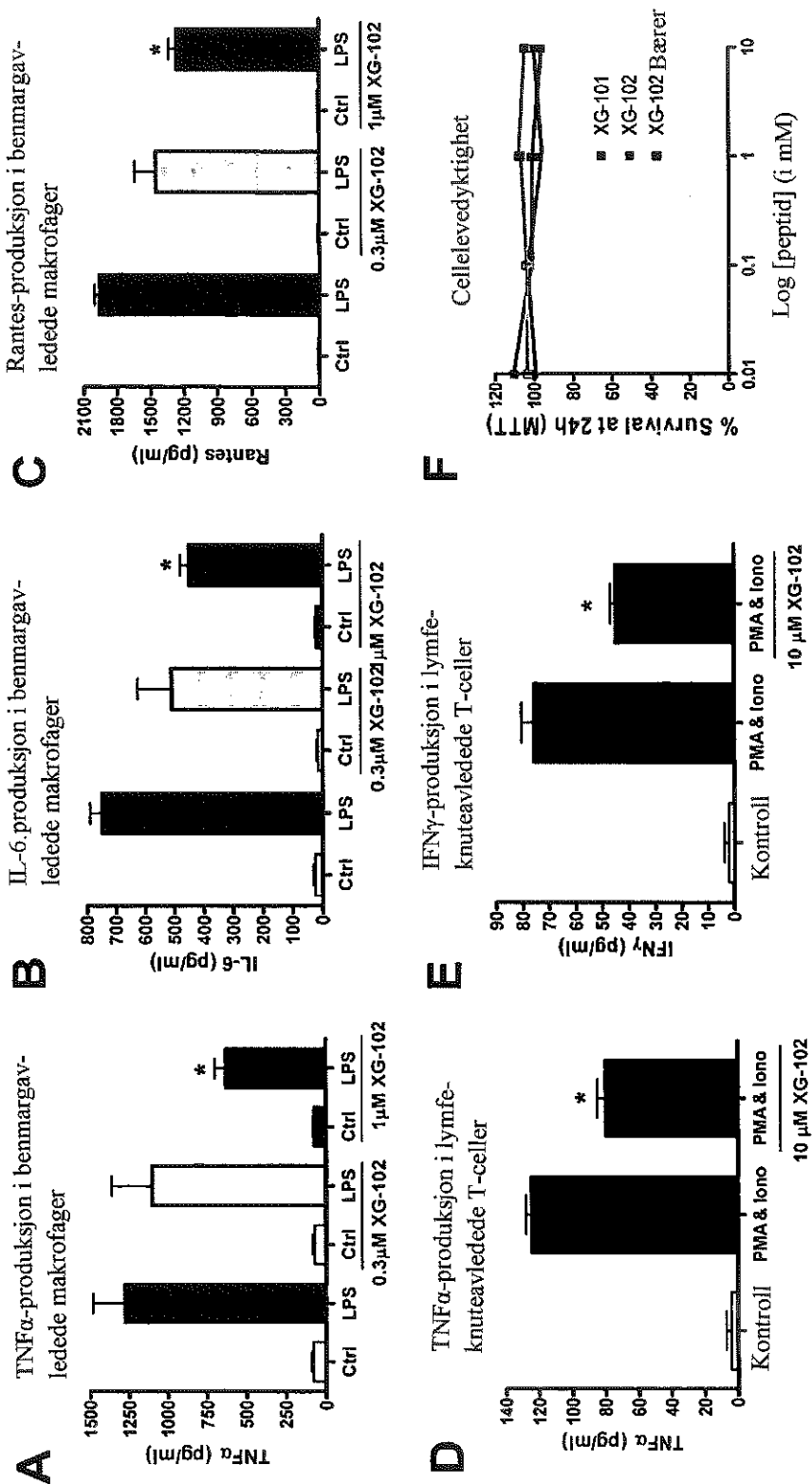


Fig. 28

EP 2 489 361 A1

ccgccccagc tcagtccgaa ccccgcgggc gcggcggcct cctccacacg cctccacctc	60
cgccgcccgc gccgcccgcg ccgcctcccg cgccgctctc cgcccggatg gccaggctga	120
gccccggaat ggcgggagcga gagagcggcc tgagcggggg tgccgcgtcc ccaccggccg	180
cttccccatt cctgggactg cacatcgctg cgctcccaa tttcaggctc acccatgata	240
tcagcctgga ggagtttgag gatgaagacc tttcgagat cactgatgag tgtggcatca	300
gcctgcagtg caaagacacc ttgtctctcc ggcccccgcg cgccgggcta ctgtctgcgg	360
gtagcagcgg tagcgcgggg agccggctgc aggcggagat gctgcagatg gacctgatcg	420
acgcggcaag tgacactccg ggcgcccagg acgacgaaga ggacgacgac gagctcgctg	480
cccaacggcc aggagtgggg ctttccaaag ccgagtctgg ccaggagccg gcgtctcgca	540
gccaggggtca gggccagggc cccggcacag gctgcggaga cacctaccgg cccaagaggc	600
ctaccacgct caaccttttc ccgcaggtgc cgcggtctca ggacacgctg aataataact	660
ctttaggcaa aaagcacagt tggcaggacc gtgtgtctcg atcatcctcc cctctgaaga	720
caggggagca gacgcctcca catgaacata tctgcctgag tgatgagctg ccgccccagg	780
gcagtcctgt tcccaccag gatcgtggca cttccaccga cagcccttgt cgccgtactg	840
cagccacca gatggcacct ccaagtggtc cccctgccac tgcacctggt ggccggggcc	900
actcccatcg agatcggctc atatcagcag atgtgcggtc cgaggcgact gaggagatct	960
acctgacccc agtgagagg cccccagacc ctgcagaacc cacctccacc ttcttgccac	1020
ccactgagag ccgatgtct gtcagctcgg atcctgacct tgccgcttac tctgtaactg	1080
cagggcgacc gcaccttcc atcagtgaag aggatgaggg cttcgactgt ctgtcatccc	1140
cagagcaagc tgagccacca ggtggagggt ggcggggaag cctcggggag ccaccaccgc	1200
ctccacgggc ctactgagc tcggacacca gcgcactgtc ctacgactct gtcaagtaca	1260
actggtggt ggatgagcat gccagcttg agttggtgag cctgcggcca tgttttgag	1320
attacagtga cgaaagcgac tctgccactg tctatgacaa ctgtgcctct gcctcctcg	1380
cctacgagtc agccattggt gaggaatatg aggaggcccc tcaaccccgg cctccacct	1440
gcctgtcaga ggactccaca ccgatgagc ctgacgtcca cttctctaag aagtttctga	1500
atgtcttcat gagtggccgc tctcgttctt ccagtgccga gtcccttggt ctgttctcct	1560
gtgtcatcaa tggggaggag catgagcaaa cccatcgggc tatattcagg tttgtgcctc	1620
ggcatgaaga tgaacttgag ctggaagtgg acgacctct gctggtggag ctgcaggcag	1680

Fig. 29

EP 2 489 361 A1

aagactattg gtatgaggcc tataacatgc gcactggagc cctgggtgtc tttcctgcct	1740
actatgccat tgaggtcacc aaggagcctg agcacatggc agcccttgcc aaaaacagcg	1800
actggattga ccagttccgg gtgaagtcc tgggctcigt ccaggttcct tatcacaagg	1860
gcaatgatgt cctctgtgct gctatgcaaa agatcgccac caccgcccgg ctcaccgtgc	1920
actttaaccc gccctccagc tgtgtccttg aaatcagcgt taggggtgtc aagatagggtg	1980
tcaaagctga tgaagctcag gaggccaagg gaaataaatg tagccacttt ttccagctaa	2040
aaaacatctc tttctgtggg taccatccaa agaacaacaa gtactttggg tttatcacta	2100
agcaccctgc tgaccaccgg tttgcctgcc atgtctttgt gtctgaagat tccaccaaaag	2160
ccctggcaga gtctgtgggg cgtgcatttc agcagttcta caagcaattt gtggaatata	2220
cctgtcctac agaagatata tacttggagt agcagcaacc cccctctctg cagccccctca	2280
gccccaggcc agtactagga cagctgactg ctgacaggat gttgtactgc cagagagaa	2340
tgggggagtg agggctgttg gggtcggggg gcaggggttt ggggagaggc agatgcagtt	2400
tattgtaata tatggggtta gattaatcta tggaggacag tacaggctct ctcggggctg	2460
gggaagggca gggctggggg gggggtcagg catctggcca caaaggggtc ccctagggac	2520
agaggcgctg caccatcctg ggcttgtttc atactagagg ccctggcttt ctggctcttg	2580
ggtcctgcct tgacaaagcc cagccacctg gaagtgtcac cttcccttgt ccacctcacc	2640
cagtgccttg agctcatgct gagccaagc acctccgaag gactttccag taaggaaatg	2700
gcaacatgtg acagtgagac cctgttctca tctgtggggc tccggcagct ccgaccccca	2760
gcctggccag cacgtgacc ctggcaagct tgttgtttca aagaaggaga gggccacagc	2820
aagccctgcc tgccagggaa ggttccctct cagctggccc cagccaactg gtcactgtct	2880
tgtcacctgg ctactactat taaagtgcc tttcttgtct gaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	2940
aaaaaaactc gag	2953

Fig. 29 (forts.)

EP 2 489 361 A1

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

Fig. 30

EP 2 489 361 A1

Ala Thr Ala Pro Gly Gly Arg Gly His Ser His Arg Asp Arg Ser Ile
 260 265 270
 Ser Ala Asp Val Arg Leu Glu Ala Thr Glu Glu Ile Tyr Leu Thr Pro
 275 280 285
 Val Gln Arg Pro Pro Asp Pro Ala Glu Pro Thr Ser Thr Phe Leu Pro
 290 295 300
 Pro Thr Glu Ser Arg Met Ser Val Ser Ser Asp Pro Asp Pro Ala Ala
 305 310 315 320
 Tyr Ser Val Thr Ala Gly Arg Pro His Pro Ser Ile Ser Glu Glu Asp
 325 330 335
 Glu Gly Phe Asp Cys Leu Ser Ser Pro Glu Gln Ala Glu Pro Pro Gly
 340 345 350
 Gly Gly Trp Arg Gly Ser Leu Gly Glu Pro Pro Pro Pro Pro Arg Ala
 355 360 365
 Ser Leu Ser Ser Asp Thr Ser Ala Leu Ser Tyr Asp Ser Val Lys Tyr
 370 375 380
 Thr Leu Val Val Asp Glu His Ala Gln Leu Glu Leu Val Ser Leu Arg
 385 390 395 400
 Pro Cys Phe Gly Asp Tyr Ser Asp Glu Ser Asp Ser Ala Thr Val Tyr
 405 410 415
 Asp Asn Cys Ala Ser Ala Ser Ser Pro Tyr Glu Ser Ala Ile Gly Glu
 420 425 430
 Glu Tyr Glu Glu Ala Pro Gln Pro Arg Pro Pro Thr Cys Leu Ser Glu
 435 440 445
 Asp Ser Thr Pro Asp Glu Pro Asp Val His Phe Ser Lys Lys Phe Leu
 450 455 460
 Asn Val Phe Met Ser Gly Arg Ser Arg Ser Ser Ser Ala Glu Ser Phe
 465 470 475 480
 Gly Leu Phe Ser Cys Val Ile Asn Gly Glu Glu His Glu Gln Thr His
 485 490 495
 Arg Ala Ile Phe Arg Phe Val Pro Arg His Glu Asp Glu Leu Glu Leu
 500 505 510

Fig. 30 (forts.)

EP 2 489 361 A1

Glu Val Asp Asp Pro Leu Leu Val Glu Leu Gln Ala Glu Asp Tyr Trp
 515 520 525
 Tyr Glu Ala Tyr Asn Met Arg Thr Gly Ala Arg Gly Val Phe Pro Ala
 530 535 540
 Tyr Tyr Ala Ile Glu Val Thr Lys Glu Pro Glu His Met Ala Ala Leu
 545 550 555 560
 Ala Lys Asn Ser Asp Trp Ile Asp Gln Phe Arg Val Lys Phe Leu Gly
 565 570 575
 Ser Val Gln Val Pro Tyr His Lys Gly Asn Asp Val Leu Cys Ala Ala
 580 585 590
 Met Gln Lys Ile Ala Thr Thr Arg Arg Leu Thr Val His Phe Asn Pro
 595 600 605
 Pro Ser Ser Cys Val Leu Glu Ile Ser Val Arg Gly Val Lys Ile Gly
 610 615 620
 Val Lys Ala Asp Glu Ala Gln Glu Ala Lys Gly Asn Lys Cys Ser His
 625 630 635 640
 Phe Phe Gln Leu Lys Asn Ile Ser Phe Cys Gly Tyr His Pro Lys Asn
 645 650 655
 Asn Lys Tyr Phe Gly Phe Ile Thr Lys His Pro Ala Asp His Arg Phe
 660 665 670
 Ala Cys His Val Phe Val Ser Glu Asp Ser Thr Lys Ala Leu Ala Glu
 675 680 685
 Ser Val Gly Arg Ala Phe Gln Gln Phe Tyr Lys Gln Phe Val Glu Tyr
 690 695 700
 Thr Cys Pro Thr Glu Asp Ile Tyr Leu Glu
 705 710

Fig. 30 (forts.)

EP 2 489 361 A1

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

Fig. 31

EP 2 489 361 A1

Gly Gly Arg Gly His Ser His Arg Asp Arg Ile His Tyr Gln Ala Asp
 260 265 270
 Val Arg Leu Glu Ala Thr Glu Glu Ile Tyr Leu Thr Pro Val Gln Arg
 275 280 285
 Pro Pro Asp Ala Ala Glu Pro Thr Ser Ala Phe Leu Pro Pro Thr Glu
 290 295 300
 Ser Arg Met Ser Val Ser Ser Asp Pro Asp Pro Ala Ala Tyr Pro Ser
 305 310 315 320
 Thr Ala Gly Arg Pro His Pro Ser Ile Ser Glu Glu Glu Glu Gly Phe
 325 330 335
 Asp Cys Leu Ser Ser Pro Glu Arg Ala Glu Pro Pro Gly Gly Gly Trp
 340 345 350
 Arg Gly Ser Leu Gly Glu Pro Pro Pro Pro Pro Arg Ala Ser Leu Ser
 355 360 365
 Ser Asp Thr Ser Ala Leu Ser Tyr Asp Ser Val Lys Tyr Thr Leu Val
 370 375 380
 Val Asp Glu His Ala Gln Leu Glu Leu Val Ser Leu Arg Pro Cys Phe
 385 390 395 400
 Gly Asp Tyr Ser Asp Glu Ser Asp Ser Ala Thr Val Tyr Asp Asn Cys
 405 410 415
 Ala Ser Val Ser Ser Pro Tyr Glu Ser Ala Ile Gly Glu Glu Tyr Glu
 420 425 430
 Glu Ala Pro Arg Pro Gln Pro Pro Ala Cys Leu Ser Glu Asp Ser Thr
 435 440 445
 Pro Asp Glu Pro Asp Val His Phe Ser Lys Lys Phe Leu Asn Val Phe
 450 455 460
 Met Ser Gly Arg Ser Arg Ser Ser Ser Ala Glu Ser Phe Gly Leu Phe
 465 470 475 480
 Ser Cys Ile Ile Asn Gly Glu Glu Gln Glu Gln Thr His Arg Ala Ile
 485 490 495
 Phe Arg Phe Val Pro Arg His Glu Asp Glu Leu Glu Leu Glu Val Asp
 500 505 510

Fig. 31 (forts.)

EP 2 489 361 A1

Asp Pro Leu Leu Val Glu Leu Gln Ala Glu Asp Tyr Trp Tyr Glu Ala
 515 520 525

Tyr Asn Met Arg Thr Gly Ala Arg Gly Val Phe Pro Ala Tyr Tyr Ala
 530 535 540

Ile Glu Val Thr Lys Glu Pro Glu His Met Ala Ala Leu Ala Lys Asn
 545 550 555 560

Ser Asp Trp Val Asp Gln Phe Arg Val Lys Phe Leu Gly Ser Val Gln
 565 570 575

Val Pro Tyr His Lys Gly Asn Asp Val Leu Cys Ala Ala Met Gln Lys
 580 585 590

Ile Ala Thr Thr Arg Arg Leu Thr Val His Phe Asn Pro Pro Ser Ser
 595 600 605

Cys Val Leu Glu Ile Ser Val Arg Gly Val Lys Ile Gly Val Lys Ala
 610 615 620

Asp Asp Ser Gln Glu Ala Lys Gly Asn Lys Cys Ser His Phe Phe Gln
 625 630 635 640

Leu Lys Asn Ile Ser Phe Cys Gly Tyr His Pro Lys Asn Asn Lys Tyr
 645 650 655

Phe Gly Phe Ile Thr Lys His Pro Ala Asp His Arg Phe Ala Cys His
 660 665 670

Val Phe Val Ser Glu Asp Ser Thr Lys Ala Leu Ala Glu Ser Val Gly
 675 680 685

Arg Ala Phe Gln Gln Phe Tyr Lys Gln Phe Val Glu Tyr Thr Cys Pro
 690 695 700

Thr Glu Asp Ile Tyr Leu Glu
 705 710

Fig. 31 (forts.)

EP 2 489 361 A1

atggcggagc gagaaagcgg cggcctggga gggggggccg cgtccccgcc cgccgcctcc	60
ccgttcctgg ggctgcacat cgcttcgcct cccaatttca ggctcaccca tgacatcagc	120
ctggaggagt ttgaggatga agacctctcg gagatcactg atgagtgtgg catcagctta	180
cagtgcaaag acacctgtc cttacggccc cegcgcccg ggctgctctc tgcgggcggc	240
ggcggcgcg ggagccggtt gcaggccgag atgtgtcaga tggacctgat cgacgcgacg	300
ggggacactc ccggggccga ggacgacgag gaggacgacg acgaggagcg cgcgggcccg	360
cggccgggag cggggccgcc caaggccgag tccggccagg agccggcgtc ccgcggccag	420
ggccagagcc aaggccagag ccaggggccg ggcagcgggg acacgtaccg gcccaagcgg	480
cccaccacgc tcaacctctt tccgcagggt cgcgggtctc aggacacact gaataataat	540
tctctgggca aaaagcacag ttggcaggat cgggtgtctc gatcatctc acccctgaag	600
acaggggagc agacaccacc gcatgaacac atctgcctga gcgatgagct gccccccag	660
agcggccccg cccccaccac agatcgaggc acctccaccg acagcccttg ccgcccagc	720
acagccaccc agatggcacc tccgggtggt cccctgctg cccgcctgg gggtcggggc	780
cactcgcacg gagaccgaat ccactaccag gccgatgtgc gactagaggc cactgaggag	840
atctacctga cccagtgca gaggccccca gacgctgcag agcccacctc cgccttctg	900
ccgcccactg agagccggat gtcagtcagc tccgatccag accctgccgc ctaccctcc	960
acggcagggc ggccgcaccc ctccatcagt gaagaggaag agggcttcga ctgcctgtcg	1020
tccccagagc gggctgagcc cccaggcggg ggggtggcgg ggagcctggg ggagccgccc	1080
ccacctccac gggcctctct gagctcggac accagcgccc tgtcctatga ctctgtcaag	1140
tacacgctgg tggtagatga gcatgcacag ctggagctgg tgagcctgcg gccgtgcttc	1200
ggagactaca gtgacgagag tgactctgcc accgtctatg acaactgtgc ctccgtctcc	1260
tcgccctatg agtcggccat cggagaggaa tatgaggagg ccccgcggcc ccagccccct	1320
gcctgcctct ccgaggactc cagcctgat gaacccgacg tccatttctc caagaaattc	1380
ctgaacgtct tcatgagtgg ccgctccccg tcctccagtg ctgagtcctt cgggctgttc	1440
tcctgcatca tcaacgggga ggagcaggag cagaccaccc gggccatatt caggtttgtg	1500
cctcgacacg aagacgaact tgagctggaa gtggatgacc ctctgctagt ggagctccag	1560
gctgaagact actggtacga ggcctacaac atgcgcactg gtgcccgggg tgtctttcct	1620
gcctattacg ccatcgaggc caccaaggag cccgagcaca tggcagccct ggccaaaaac	1680
agtgactggg tggaccagtt ccgggtgaag ttcctgggct cagtccaggt tccctatcac	1740

Fig. 32

EP 2 489 361 A1

aagggcaatg acgtcctctg tgctgctatg cagaagattg ccaccacccg ccggctcacc	1800
gtgcacttta acccgccctc cagctgtgtc etggagatca gcgtgcgggg tgtgaagata	1860
ggcgtcaagg ccgatgactc ccaggaggcc aaggggaata aatgtagcca cttttccag	1920
ttaaaaaaca tctctttctg cggatatcat ccaagaaca acaagtactt tgggttcac	1980
accaagcacc ccgccgacca ccggtttgcc tgccacgtct ttgtgtctga agactccacc	2040
aaagccctgg cagagtccgt ggggagagca ttccagcagt tctacaagca gtttgtggag	2100
tacacctgcc ccacagaaga tatctacctg gagtag	2136

Fig. 32 (forts.)