



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 697 36 351 T4 2009.07.23

(12) Berichtigte Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 898 580 B2

(21) Deutsches Aktenzeichen: 697 36 351.1

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/GB97/01250

(96) Europäisches Aktenzeichen: 97 920 857.6

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 1997/042222

(86) PCT-Anmeldetag: 08.05.1997

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 13.11.1997

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 03.03.1999

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 19.07.2006

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 23.07.2009

(51) Int Cl.⁸: C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

9609521 08.05.1996 GB
9621314 09.10.1996 GB

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

Cyclacel Ltd., London, GB

(72) Erfinder:

BALL, CRC Cell Transform. Res. Group, Kathryn
L., Dundee DD1 4HN, GB; LANE, CRC Cell
Transform. Res. Group, David P., Dundee DD1
4HN, GB

(74) Vertreter:

LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(54) Bezeichnung: METHODEN UND MITTEL ZUR HEMMUNG DER CDK4-AKTIVITÄT

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die berichtigte Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 4 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden.
Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Substanzen und ihre therapeutische Verwendung sowie im Besonderen die Identifizierung von Regionen von p21^{WAF1}, die an cyclinabhängige Kinasen, besonders Cdk4, und/oder Cyclin-D1 binden, sowie Substanzen, Fragmente und Mimetika, die auf dieser Region basieren. Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls pharmazeutische Zusammensetzungen, die diese Moleküle umfassen, sowie deren Verwendung in therapeutischen Anwendungen zur Behandlung von Hyperproliferationsstörungen, wie z. B. Krebs und Psoriasis, und Zusammensetzungen, die diese Moleküle umfassen, und deren Verwendung in Anwendungen, die sich auf das Wachstum in eukaryotischen Zellen beziehen. Die Erfindung betrifft ebenso Testverfahren und Mittel zur Identifizierung von Substanzen, die zur Störung der p21/Cdk4/Cyclin-Wechselwirkung nützlich sind und vorzugsweise die Cdk4-Aktivität hemmen.

[0002] Die Tumorsuppressionsfunktion von p53 wird mit einem durch DNA-Schaden induzierbaren Zellzyklus-Checkpoint-Stoffwechselweg in Verbindung gebracht (Kastan et al. (1991)), in dem p53 in den beschädigten Zellen entweder zu einem Stillstand des Wachstums (Agarwal et al. (1995)) oder zu Apoptose (Clarke et al. (1993); Lowe et al. (1993); Merritt et al. (1994)) führen kann. Die biochemische Aktivität von p53, die am engsten mit Tumorsuppression und einem Stillstand des Wachstums assoziiert wird, umfasst eine ionisierende, strahlungsabhängige Aktivierung von sequenzspezifischer transkriptionaler Aktivität (Kastan et al. (1991); Lu & Lane (1993); Pietenpol et al. (1994)). p53 induziert die Transkription in einer Reihe von Genen, deren Produkte eine direkte Rolle bei der Vermittlung des Wachstumsstillstands spielen. Diese p53-induzierbaren negativen Regulatoren der Zellproliferation umfassen: den cyclinabhängigen Kinase-Inhibitor (CKI), p21^{WAF1} (El-Deiry et al. (1993); Harper et al. (1993); Xiong et al. (1993); Gu et al. (1993)); ein apoptoseförderndes Protein, Bax (Miyashita & Reed (1995)); das Insulinwachstumsfaktor-Bindungsprotein IGF-BP3 (Buckbinder et al. (1995)) und Gadd45 (Kastan et al. (1992)), einen leistungsstarken Hemmer der Zellproliferation mit einer zur Zeit noch unklaren biochemischen Funktion (Kearsey et al. (1995)).

[0003] Ein häufiges Ereignis in der Entwicklung menschlicher Neoplasie ist die Inaktivierung eines durch DNA-Schaden induzierbaren Zellzyklus-Checkpoint-Stoffwechselwegs, der durch p53 reguliert wird (Hollstein et al. (1991); Lane (1992); Agrawal et al. (1995)). Eine Reihe an Mechanismen können zur funktionalen Inaktivierung des p53-Wegs führen, unter anderem: Fehlsinnmutationen innerhalb oder Deletionen des p53-Gens, Inaktivierung der Funktion des Wildtyp-p53-Proteins durch Wech-

selwirkung mit dem onkogenen zellulären Protein mdm-2 (Momand et al. (1992)) oder die Unfähigkeit, stromab liegende Effektormoleküle, wie z. B. p21^{WAF1}, zu induzieren (Deng et al. (1995); Waldman et al. (1995)).

[0004] Das wachsende Wissen der Erfinder über die molekularen Mechanismen, die der Transformation von Säugetierzellen zugrunde liegen, bietet die Möglichkeit, um zweckmäßig geschaffene Inhibitoren spezifischer biochemischer Prozesse zu kreieren, die für unkontrollierte Zellproliferation oder Krebs essentiell sind. Jüngste Entwicklungen haben gezeigt, dass die Reaktivierung des p53-Wegs in einigen menschlichen Tumoren theoretisch folgendermaßen herbeigeführt werden kann: (i) Aktivierung der biochemischen Funktion von mutiertem p53-Protein (Halazonetis & Kandil (1993); Hupp et al. (1993)), möglicherweise unter Verwendung kleiner Peptide, wie dies im Wirkstoffdesign meist der Fall ist (Hupp et al. (1995)); (ii) Unterbrechen der Wechselwirkung des Onkogens mdm-2 und des Wildtyp-p53 durch die Verwendung von peptidmimetischen Inhibitoren komplexer Formationen (Picksley et al. (1994)); (iii) Wiederherstellen oder Imitieren der Funktion des stromab gelegenen Effektormoleküls p21^{WAF1}, welches allein fähig ist, eine Wachstumssuppression zu vermitteln (El-Deiry et al. (1993); Eastham et al. (1995)).

[0005] p21^{WAF1} ist ein Inhibitor sowohl für die G1-cyclinabhängigen Proteinkinasen (CDKs; die das Fortschreiten von G1- in die S-Phase steuern) (Harper et al. (1995)) als auch für das Kernantigen-proliferierende Zellenprotein (PCNA; ein essentieller DNA-Replikationsfaktor) (Florez-Rozas et al. (1994); Waga et al. (1994)). Daher stellt eine Hemmung der Funktion von entweder CDKs oder PCNA theoretisch zwei verschiedene Wege für die Entwicklung von Wirkstoffentdeckungsprogrammen, die auf der Aktivität von p21^{WAF1} basieren, bereit. Die PCNA-bindende Funktion von p21^{WAF1} kann von einem 20-Aminosäurepeptid, das von der C-terminalen Domäne von p21^{WAF1} abstammt, nachgeahmt werden, und dieses Peptid ist ausreichend, um die SV40-Replikation in vitro partiell zu inhibieren (Warbrick et al. (1995)).

[0006] Trotz seiner PCNA-bindenden Rolle scheint die Hauptfunktion des p21^{WAF1}-Proteins als Wachstumssuppressor die Hemmung des G1-Cyclin-CDK-Komplexes zu sein (Chen et al. (1995); Harper et al. (1995); Luo et al. (1995); Nakanishi et al. (1995b)). Luo et al. (1995) berichteten davon, dass die N-terminale Domäne von p21, bestehend aus den Resten 1-75, in vitro als ein CDK-Inhibitor wirken und Cyclin-E-Cdk2 inhibieren würde.

[0007] Die vorliegende Erfindung betrifft (i) die Aufklärung des molekularen Mechanismus der Cyclin-D1-Cdk4-Komplexinhibition durch p21^{WAF1} und (ii) die Identifikation von Peptidmimetika mit

p21^{WAF1}-hemmender Aktivität durch die Untersuchung der Bindungs- und Inhibitionseigenschaften einer Reihe von synthetischen Peptiden, die auf der Aminosäuresequenz von p21^{WAF1} basieren. Die Studien der Erfinder haben ergeben, dass zwei Peptide, die von der N-terminalen Domäne von p21^{WAF1} abstammen, biochemische Aktivität aufweisen; ein Peptid 4 (Reste 46-65) bildet einen stabilen Komplex mit Cdk4, hat jedoch keine hemmende Aktivität, während ein Peptid 2 (Reste 16-35) an Cyclin-D1 bindet und die Cdk4-Aktivität mit einem I_{0,5} von 2 µM hemmt.

[0008] Diese Daten definieren eine Cyclinbindungsstelle auf p21^{WAF1} und legen nahe, dass ein in die CDK-hemmende Wirkung von p21^{WAF1} involvierter Mechanismus eine Bindung an die Cyclin-Untereinheit des CDK-Holoenzymes verwendet. Dies hat zu dem Vorschlag der Erfinder geführt, p21^{WAF1} könnte die Cdk4-Aktivität allosterisch durch Konformations- oder (ii) Störung der Cyclin-Cdk-Wechselwirkung oder (iii) Störung der Cyclin-Cdk-Substrat-Wechselwirkungsveränderungen in der Struktur von Cyclin-D1 hemmen. Weiters Wechselwirken die auf der C-terminalen Sequenz von p21^{WAF1} basierenden Peptide sowohl mit Cyclin-D1 als auch mit Cdk4 und sind leistungsstarke Inhibitoren der Cdk4-Aktivität, wobei ein Peptid (hierin Peptid 10) aus den Resten 141-160 zusammengesetzt ist und einen I_{0,5} von 0,1 µM aufweist. Die Erfinder zeigen, dass beide der hemmenden Peptide an den physiologisch relevanten Stellen auf Cyclin-D1 und/oder Cdk4 binden und dass sie eine Spezifität aufweisen, die jene von p21^{WAF1} voller Länge nachahmt. Es ist wichtig, anzumerken, dass die Wirksamkeit des C-terminalen Peptides durch eine einzige Aminosäuresubstitution (D-A an Position 149) verbessert wird. Die Erfinder haben die hemmende Komponente dieses Peptids unter Verwendung der Alaninmutations-Anlayse kartiert und zeigen, dass sie sich von der PCNA-Wechselwirkungsdomäne, die sich ebenso in der C-terminalen Region des p21^{WAF1}-Proteins befindet, unterscheidet.

[0009] Bemerkenswerterweise enthält ein Abschnitt von lediglich fünf Aminosäuren das Cdk4-hemmende Motiv, und eine einzelne konservative Mutation an einem beliebigen der beiden hydrophoben Aminosäurereste hebt die hemmende Wirkung des Peptids vollständig auf. Diese Daten haben aufregende Implikationen für den Wirkungsmechanismus des p21^{WAF1}-Proteins und stellen einen Startpunkt für ein Wirkstoffdesignprogramm dar, das darauf abzielt, synthetische Moleküle zu produzieren, die stromab von p53 als Tumorsuppressoren funktionieren.

[0010] Demgemäß stellt die Erfindung in einem Aspekt wie in den Ansprüchen definiert eine Substanz, welche die Eigenschaft aufweist, Cdk4 zu hemmen, zur Anwendung in einem Verfahren zur medizinischen Behandlung bereit.

[0011] In einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung wie in den Ansprüchen definiert die Verwendung einer Substanz, welche die Eigenschaft aufweist, Cdk4 zu hemmen, bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer Hyperproliferationsstörung bereit.

[0012] In einer bevorzugten Ausführungsform wurde herausgefunden, dass der C-terminale Abschnitt von p21^{WAF1}, der aus dem Peptidmotiv KRRLIFSK bestand, die Cyclin-Cdk4-Aktivität vollständig inhibierte und die Phosphorylierung von pRb verhinderte (siehe [Fig. 6](#)).

[0013] In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung wie in den Ansprüchen definiert eine Substanz, die die Eigenschaft aufweist, Cyclin-D zu binden und/oder Cdk4 zu hemmen, zur Verwendung in einem medizinischen Behandlungsverfahren bereit.

[0014] In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung wie in den Ansprüchen definiert die Verwendung einer Substanz, die die Eigenschaft aufweist, Cyclin-D zu binden und/oder Cdk4 zu hemmen, bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer Hyperproliferationsstörung bereit.

[0015] Basierend auf experimentellen Beweisen, die unten stehend angeführt sind und Reste zeigen, die in die Bindung von Peptid 2 (Reste 16-35) involviert sind, und der Kristallstruktur, die für p27 (verwandt mit p21) erhältlich ist, wird folgende allgemeine Formel für Peptide, die im Einklang mit verschiedenen Aspekten der vorliegenden Erfindung nützlich sind, bereitgestellt:

KxxRRyFzP

worin x jede beliebige Aminosäure sein kann, y und z hydrophob sein können und jeder der unterstrichenen Reste fehlen oder unterschiedlich sein kann, d. h. eine andere Aminosäure sein kann. Hydrophobe Reste können Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Prolin, Phenylalanin, Tryptophan, Methionin sein. Jede oder beide der Aminosäuren R können durch andere basische Reste, insbesondere Lysin (K) oder Histidin (H), ersetzt werden.

[0016] In der vorliegenden Erfindung bedeutet "ein aktiver Teil" ein Peptid, das kleiner als das Fragment der p21^{WAF1}-Aminosäuresequenz ist und trotzdem die oben erwähnte relevante Eigenschaft beibehält.

[0017] In der vorliegenden Erfindung bedeutet "funktional nachahmend" eine Substanz, die unter Umständen keinen aktiven Teil der p21^{WAF1}-Aminosäuresequenz enthält und wahrscheinlich gar kein Peptid ist, die jedoch trotzdem die oben erwähnte relevante Eigenschaft aufweist.

[0018] In der vorliegenden Erfindung bedeutet "ein

Derivat" ein Peptid, das durch Variieren seiner Aminosäuresequenz modifiziert wurde, z. B. durch Manipulation der für das Peptid kodierenden Nucleinsäure oder durch Verändern des Peptids selbst. Solche Derivate der natürlichen Aminosäuresequenz können eine Insertion, eine Addition, eine Deletion oder eine Substitution einer oder mehrerer Aminosäuren umfassen, ohne die essentielle Aktivität der Peptide wesentlich zu verändern. Ein Beispiel für ein Derivat ist der p21WAF1-Mutant, bei dem D an der Position 149 des Proteins voller Länge durch A ersetzt wurde, wobei dieser Mutant eine erhöhte Cyclin-D1-Cdk4-hemmende Aktivität aufweist.

[0019] Bevorzugte Substanzen gemäß bestimmten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung binden PCNA nicht und/oder stören die p21-Wechselwirkung oder das Binden mit PCNA nicht.

[0020] Zellzyklusstillstand kann durch verschiedene Aspekte gemäß der vorliegenden Erfindung in Rb-negativen und/oder Rb-positiven Zellen induziert werden, wie in den unten angeführten Experimenten dargestellt wird.

[0021] Die vorliegende Erfindung kann Verbindungen verwenden, die eine beliebige der oben genannten Substanzen umfassen, die an Trägermoleküle gekoppelt sind, was eine In-vivo-Zufuhr der Verbindungen in Zellen ermöglicht. In einer Ausführungsform ist das Trägermolekül eine 16-aa-Peptidsequenz, die von der Homodomäne von Antennapedia (z. B. wie unter dem Namen "Penetratin" verkauft) abstammt, die durch einen terminalen Cys-Rest an eine der oben genannten Sequenzen gekoppelt sein kann. Alternativ dazu kann, wie in den unten stehend beschriebenen Beispielen, ein Trägerpeptid (mit der Sequenz RQIKIWFQNRRMKWKK) synthetisiert werden, sodass es direkt an Peptidfragmente gebunden ist. Das "Penetratin"-Molekül und seine Eigenschaften werden in der WO 91/18981 beschrieben.

[0022] Daher sorgt die vorliegende Erfindung in verschiedenen Aspekten für eine Störung oder ein Unterbrechen der Wechselwirkung zwischen p21 und Cyclin-D1 und/oder Cdk4 unter Verwendung eines geeigneten Agens.

[0023] Solch ein Agens kann fähig sein, eine Bindung zwischen einer Stelle zu blockieren, die sich an Aminosäureresten befindet, die hierin identifiziert wurden, dass sie in die Bindung oder Wechselwirkung mit Cyclin-D1 und/oder Cdk4 involviert und/oder dafür von Bedeutung sind.

[0024] Die vollständige Sequenz des Proteins p21 wurde erklärt und wird in der WO 95/13375, WO 93/12251 und WO 95/06415, die hierin durch Verweis aufgenommen sind, dargelegt.

[0025] Solche Agenzien können durch Screeningverfahren identifiziert werden, die das Bestimmen umfassen, ob ein getestetes Agens die Bindung des Proteins p21 oder eines geeigneten Fragments, Derivats, Analogons oder einer funktionalen Mimetika davon mit Cyclin-D1 und/oder Cdk4 oder einem relevanten Fragment, Derivat, Analogon oder einem funktionalen Mimetikum davon inhibiert oder unterbricht.

[0026] Geeignete Fragmente von p21 umfassen jene, die wie hierin identifizierte Reste umfassen. Kleinere Fragmente sowie Derivate, Analoga und funktionale Mimetika dieses Fragments können auf ähnliche Weise verwendet werden, z. B. Peptide, die unter Verwendung eines Verfahrens, wie z. B. Alaninscanen, identifiziert wurden.

[0027] In einem weiteren Aspekt der Erfindung, wobei Versuche, welche die hierin beschriebenen Peptide verwenden, sowie die Verwendung der Peptide im Kontext der Modulierung der Wechselwirkung von p21 mit Cyclin-D1 und/oder Cdk4 beschrieben werden, können diese Peptide auch als p21-Mimetika nützlich sein, um die Wechselwirkung von p21 und anderen Cyclin-Cdk-Wechselwirkungen, insbesondere von G1-Komplexen wie etwa Cyclin-E-Cdk2, zu hemmen. Die verschiedenen oben stehend und unten stehend beschriebenen Ausführungsformen der Erfindung in Bezug auf Cyclin-D1 und/oder Cdk4 ist mit den nötigen Abänderungen auf diese anderen Cycline bzw. Cdks anwendbar.

[0028] Screeningverfahren und -tests werden unten stehend ausführlicher beschrieben.

[0029] Eine Klasse an Agenzien, die verwendet werden kann, um die Bindung von p21 und Cyclin-D1 und/oder Cdk-4 zu zerstören, sind auf Sequenzmotiven von p21 basierende Peptide, die mit Cyclin-D1 und/oder Cdk4 wechselwirken. Solche Peptide tendieren dazu, kleine Moleküle zu sein, und können etwa 40 oder weniger Aminosäuren lang sein, vorzugsweise sind sie etwa 35 oder weniger Aminosäuren lang, noch bevorzugter etwa 30 oder weniger Aminosäuren lang, noch bevorzugter etwa 25 oder weniger Aminosäuren lang, noch bevorzugter etwa 20 oder weniger Aminosäuren lang, noch bevorzugter etwa 15 oder weniger Aminosäuren lang, noch bevorzugter etwa 10 oder weniger Aminosäuren lang oder 9, 8, 7, 6, 5 oder weniger Aminosäuren lang. Die vorliegende Erfindung umfasst auch Peptide, die Sequenzvarianten oder Derivate einer Wildtyp-p21-Sequenz sind.

[0030] Vorzugsweise weist die Aminosäuresequenz eine Homologie mit einem Fragment der relevanten p21-Fragmentsequenz auf, die vorzugsweise mit zumindest etwa 30% oder 40% oder 50% oder 60% oder 70% oder 75% oder 80% oder 85% Homologie

oder zumindest mit etwa 90% oder 95% Homologie gezeigt wird. Ein Peptidfragment von p21 kann daher 1, 2, 3, 4, 5, mehr als 5 oder mehr als 10 Aminosäureänderungen, wie z. B. Substitutionen im Hinblick auf die Wildtypsequenz, umfassen.

[0031] Ein Derivat eines Peptids, für das die spezifische Sequenz hierin offenbart wird, kann in bestimmten Ausführungsformen die gleiche Länge wie das spezifische Peptid haben oder kürzer als dieses sein. In anderen Ausführungsformen kann die Peptidsequenz oder eine Variante davon in einem größeren Peptid, wie oben beschrieben, inkludiert sein, das einen zusätzlichen Abschnitt von p21 umfassen kann oder auch nicht. 1, 2, 3, 4 oder 5 oder mehr zusätzliche Aminosäuren, neben dem relevanten spezifischen Peptidfragment in p21, oder heterolog dazu können an einem oder beiden Enden des Peptids inkludiert sein.

[0032] Wie allgemein bekannt ist, bewegt sich die Homologie auf Aminosäureniveau im Allgemeinen im Bereich der Aminosäure-Ähnlichkeit oder -Identität. Ähnlichkeit ermöglicht eine "konservative Variation", d. h. Substitution eines hydrophoben Rests, wie z. B. Isoleucin, Valin, Leucin oder Methionin, für einen anderen oder Substitution eines polaren Rests für einen anderen, wie z. B. Arginin für Lysin, Glutaminsäure für Asparaginsäure oder Glutamin für Asparagin. Ähnlichkeit kann wie vom TBLASTN-Programm von Altschul et al., J. Mol. Biol. 215, 403-10 (1990), das in Standardverwendung auf den Gebiet der Erfindung ist, definiert und festgelegt werden. Die Homologie kann sich über die volle Länge des relevanten Peptids erstrecken oder über eine zusammenhängende Sequenz von etwa 5, 10, 15, 20, 25, 30 oder 35 Aminosäuren im Vergleich zu der relevanten Wildtyp-Aminosäuresequenz.

[0033] Wie festgestellt, können verschiedene Peptidsequenzen und Peptide und nichtpeptidartige Analoga und Mimetika verwendet werden, wie weiter unten beschrieben.

[0034] Verschiedene Aspekte der vorliegenden Erfindung verwenden eine Substanz, die ein einzelnes Molekül oder eine Zusammensetzung sein kann, die zwei oder mehr Komponenten umfasst, das bzw. die ein Peptidfragment von p21 umfasst, das eine wie oben beschriebene und/oder anderwärts hierin offenbare Sequenz umfasst, ein Peptid, das im Wesentlichen aus so einer Sequenz besteht, ein Peptid, das eine Sequenzvariante, eine Derivat- oder analoge Sequenz umfasst, oder ein nichtpeptidartiges Analogon oder ein Mimetikum, welches die Fähigkeit aufweist, Cyclin-D1 und/oder Cdk4 zu binden und/oder die Wechselwirkung zwischen p21 und Cyclin-D1 und/oder Cdk4 zu unterbrechen oder zu stören.

[0035] Varianten umfassen Peptide, in denen einzelne Aminosäuren durch andere Aminosäuren ersetzt werden können, die, wie auf dem Gebiet der Erfindung bekannt und oben angegeben ist, eng miteinander verwandt sind.

[0036] Nichtpeptidartige Mimetika werden unten stehend weiter beschrieben.

[0037] Wie bekannt ist, kann ein Peptid gemäß der vorliegenden Erfindung und zur Verwendung in verschiedenen Aspekten der vorliegenden Erfindung ein Fragment von p21 wie offenbart umfassen oder im Wesentlichen daraus bestehen, wie z. B. ein Fragment, dessen Sequenz oben stehend angeführt wird. Wenn eine oder mehrere zusätzliche Aminosäuren umfasst sind, so können diese Aminosäuren von p21 sein oder heterolog zu p21 sein oder gegenüber p21 fremd sein. Ein Peptid kann auch in einem größeren Fusionsprotein inkludiert sein, insbesondere in Fällen, in denen das Peptid an eine Nicht-p21-Sequenz (d. h. heterolog oder fremd), wie z. B. ein Polypeptid oder eine Proteindomäne, fusioniert ist.

[0038] Die Erfindung verwendet auch Derivate der Peptide, unter anderem ein Peptid, das an einen Bindungspartner gebunden ist, z. B. ein Effektormolekül, eine Markierung, einen Wirkstoff, ein Toxin und/oder ein Träger- oder Transportmolekül. Verfahren, um die Peptide der Erfindung sowohl an Peptidyl- und Nicht-peptidyl-Bindungspartner zu binden, sind auf dem Gebiet der Erfindung gut bekannt. In einer Ausführungsform ist das Trägermolekül eine 16-aa-Peptidsequenz, die von der Homodomäne von Antennapedia (z. B. wie unter dem Namen "Penetratin" verkauft) abstammt, die durch einen terminalen Cys-Rest an ein Peptid gekoppelt werden kann. Das "Penetratin"-Molekül und seine Eigenschaften werden in der WO 91/18981 beschrieben.

[0039] Peptide können ganz oder teilweise durch chemische Synthese erzeugt werden. Die Verbindungen der vorliegenden Erfindung können gemäß den gut-etablierten, Standard-Flüssig- oder, vorzugsweise, -Festphasen-Peptidsyntheseverfahren leicht hergestellt werden, wobei allgemeine Beschreibungen davon großflächig erhältlich sind (siehe z. B. J. M. Stewart & J. D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 2. Auflage, Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois (1984); M. Bodanzsky & A. Bodanzsky, The Practice of Peptide Synthesis, Springer Verlag, New York (1984), und Applied Biosystems 430A User's Manual, ABI Inc., Foster City, Kalifornien), oder durch das Flüssigphasenverfahren oder jede Kombination von Festphasen-, Flüssigphasen- und Lösungsschemie, z. B. durch zuerst Vervollständigen des jeweiligen Peptidabschnitts und dann, falls gewünscht und geeignet, nach Entfernung jeglicher Schutzgruppen, die vorhanden sein können, durch das Einführen des Restes X durch Reaktion der jeweiligen Kohlenstoff-

säure oder Sulfonsäure oder eines reaktiven Derivats davon, in Lösung hergestellt werden.

[0040] Eine weitere bequeme Art, ein Peptidylmolekül (Peptid oder Polypeptid) herzustellen, ist durch Expression der dafür kodierenden Nucleinsäure durch Verwendung von Nucleinsäure in einem Expressionssystem.

[0041] Im Allgemeinen wird Nucleinsäure als ein Isolat bereit gestellt, in isolierter und/oder gereinigter Form oder frei von oder im Wesentlichen frei von Materialien, mit denen es natürlich assoziiert ist, wie z. B. frei von oder im Wesentlichen frei von Nucleinsäure, die das Gen im menschlichen Genom flankiert, mit Ausnahme der Möglichkeit einer oder mehrerer regulatorischen Sequenz(en) zur Expression. Nucleinsäure kann ganz oder teilweise synthetisch sein und kann genomische DNA, cDNA oder RNA umfassen. In Fällen, in denen Nucleinsäure RNA umfasst, sollte der Verweis auf die gezeigte Sequenz als Verweis auf das RNA-Äquivalent verstanden werden, mit T durch U ersetzt.

[0042] Nucleinsäuresequenzen, die für ein Polypeptid oder Peptid kodieren, können vom Fachmann unter Verwendung der hierin enthaltenen Informationen und Literaturverweise sowie der auf dem Gebiet der Erfindung bekannten Verfahren (siehe z. B. Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), und Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1992)) in Anbetracht der erhältlichen Nucleinsäuresequenz und Klone leicht hergestellt werden. Diese Verfahren umfassen (i) die Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), um Proben solcher Nucleinsäuren, z. B. aus genomischen Quellen, zu amplifizieren, (ii) chemische Synthese oder (iii) Herstellung von cDNA-Sequenzen. Für p21-Fragmente kodierende DNA kann auf jede geeignete Art, die dem Fachmann bekannt ist, hergestellt und verwendet werden, unter anderem durch Aussuchen kodierender DNA, Identifikation geeigneter Restriktionsenzym-Erkennungsstellen auf beiden Seiten des Abschnitts, der exprimiert werden soll, und Ausschneiden des besagten Abschnitts aus der DNA. Der Abschnitt kann dann operabel an einen geeigneten Promotor in einem kommerziell erhältlichen Standard-Expressionssystem gebunden sein. Ein weiterer Rekombinationsansatz ist die Amplifikation des relevanten Teils der DNA mit geeigneten PCR-Primern. Modifizierungen dieser p21-Sequenzen können, z. B. mittels ortsgerechteter Mutagenese, durchgeführt werden, um zur Expression von modifiziertem p21-Peptid zu führen oder um die Codonpräferenz in den Wirtszellen, die verwendet wurden, um die Nucleinsäure zu exprimieren, in Betracht zu ziehen.

[0043] Um die Expression der Nucleinsäuresequen-

zen zu erreichen, können die Sequenzen in einen Vektor, der eine oder mehrere Kontrollsequenzen aufweist, die an die Nucleinsäure operabel gebunden sind, inkorporiert sein, um deren Expression zu steuern. Die Vektoren können andere Sequenzen, wie z. B. Promotoren oder Enhancer, umfassen, um die Expression der insertierten Nucleinsäure, Nucleinsäuresequenzen voranzutreiben, sodass das Polypeptid oder Peptid als eine Fusion und/oder Nucleinsäure, die für Sekretionssignale kodiert, produziert wird, sodass das in der Wirtszelle produzierte Polypeptid von der Zelle sekretiert wird. Das Polypeptid kann dann durch Transformieren der Vektoren in Wirtszellen, in denen der Vektor funktional ist, Kultivieren der Wirtszellen, sodass das Polypeptid erzeugt wird, und Gewinnen des Polypeptids aus den Wirtszellen oder dem umliegenden Medium erhalten werden. Zu diesem Zweck werden auf dem Gebiet der Erfindung prokaryotische und eukaryotische Zeilen verwendet, unter anderem Stämme von *E. coli*, Hefe und eukaryotische Zellen wie etwa COS- oder CHO-Zellen.

[0044] Ein Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids oder Peptids (wie offenbart) umfasst die Expression aus Nucleinsäure, die für das Polypeptid oder Peptid kodiert (im Allgemeinen Nucleinsäure gemäß der Erfindung). Das kann leicht durch Züchten einer Wirtszelle in Kultur, die einen solchen Vektor enthält, unter geeigneten Bedingungen, die zur Expression des Polypeptids führen oder diese ermöglichen, erreicht werden. Polypeptide und Peptide können ebenfalls in In-vitro-Systemen, wie z. B. Retikulozytenlysat, exprimiert werden.

[0045] Systeme zur Klonierung und Expression eines Polypeptids in einer Reihe verschiedener Wirtszellen sind gut bekannt. Geeignete Wirtszellen umfassen Bakterien, eukaryotische Zellen, wie z. B. Säugetier- oder Hefezellen, und Baculovirussysteme. Säugetierzelllinien, die auf dem Gebiet der Erfindung zur Expression eines heterologen Polypeptids erhältlich sind, umfassen Chinahamster-Eierstockzellen, HeLa-Zellen, Baby-Hamsternierenzellen, COS-Zellen und viele andere. Ein häufiger, bevorzugter bakterieller Wirt ist *E. coli*.

[0046] Geeignete Vektoren können ausgewählt oder konstruiert werden, enthaltend die geeigneten regulatorischen Sequenzen, einschließlich Promotorsequenzen, Terminatorfragmente, Polyadenylierungssequenzen, Enhancersequenzen, Markergene und andere Sequenzen je nach Eignung. Vektoren können Plasmide, viral, z. B. "Phagen" oder Phagemid, sein, je nach Eignung. Für weitere Details siehe z. B. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). Viele bekannte Verfahren und Arbeitsvorschriften zur Manipulation von Nucleinsäure, z. B. zur Herstellung von Nucleinsäurekonstrukten, Mutagenese, Sequenzierung, Einführung von DNA in Zel-

len und Genexpression und Analyse von Proteinen, werden in Ausubel et al. (Hrsg.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1992), genau beschrieben.

[0047] Die Nucleinsäure kann in das Genom (z. B. Chromosom) der Wirtszelle integriert werden. Die Integration kann im Einklang mit Standardverfahren durch Einschluss von Sequenzen, welche die Rekombination mit dem Genom fördern, vorangetrieben werden. Die Nucleinsäure kann sich auf einem extra-chromosomal Vektor in der Zelle befinden oder auf andere Weise identifizierbar heterolog mit der Zelle sein oder zu dieser fremd sein.

[0048] Die Einführung der Nucleinsäure in eine Wirtszelle, die (insbesondere für eine In-vitro-Einführung) im Allgemeinen ohne Einschränkung als "Transformation" bezeichnet werden kann, kann durch jedes erhältliche Verfahren erfolgen. Für eukaryotische Zellen können geeignete Verfahren Calciumphosphat-Transfektion, DEAE-Dextran, Elektroporation, liposomvermittelte Transfektion und Transduktion unter Verwendung von Retroviren oder anderen Viren, z. B. Vaccinia oder, für Insektenzellen, Baculovirus, umfassen. Für Bakterienzellen können geeignete Verfahren Calciumchlorid-Transformation, Elektroporation und Transfektion mittels Bakteriophagen umfassen. Als Alternative dazu kann direkte Injektion der Nucleinsäure verwendet werden.

[0049] Markergene, wie z. B. Antibiotika-Resistenz- oder -Sensitivitätsgene, können zur Identifizierung von Klonen verwendet werden, welche die Nucleinsäure von Interesse enthalten, wie auf dem Gebiet der Erfindung gut bekannt ist.

[0050] Auf die Einführung kann das Verursachen oder ermöglichen der Expression aus der Nucleinsäure folgen, z. B. durch Kultivieren von Wirtszellen (die Zellen umfassen können, die tatsächlich transformiert wurden, obwohl es wahrscheinlicher ist, dass die Zellen Nachkommen der transformierten Zellen sind), unter den Bedingungen für die Expression des Gens, sodass das kodierte Polypeptid (oder Peptid) produziert wird. Wenn das Polypeptid an ein geeignetes Signal-Leader-Peptid gekoppelt exprimiert wird, so kann es von der Zelle in das Kulturmedium sekretiert werden. Nach der Produktion durch Expression kann ein Polypeptid oder Peptid, je nach der jeweiligen Situation, von der Wirtszelle und/oder dem Kulturmedium isoliert und/oder gereinigt werden und danach wie gewünscht verwendet werden, z. B. in der Formulierung einer Zusammensetzung, die eine oder mehrere zusätzliche Komponenten, wie z. B. eine pharmazeutische Zusammensetzung, die einen oder mehrere pharmazeutisch akzeptable(n) Arzneimittelträger, Vehikel oder Träger (siehe z. B. unten) umfasst, umfassen kann.

[0051] Die Einführung einer Nucleinsäure, die für ein Peptidylmolekül gemäß der vorliegenden Erfindung kodiert, kann mittels Gentherapie in vivo stattfinden, um die Wechselwirkung zwischen p21 und Cyclin-D1 und/oder cdk4 zu unterbrechen oder zu stören.

[0052] Daher kann eine Wirtszelle, welche die Nucleinsäure enthält, z. B. als Ergebnis der Einführung der Nucleinsäure in die Zelle oder in einen Vorfahren der Zelle und/oder der genetischen Änderung der Sequenz, die zu der Zelle oder dem Vorfahren (wobei die Einführung oder Änderung in vivo oder ex vivo durchgeführt werden kann) endogen ist, in einem Organismus (z. B. im Soma) enthalten sein, der ein Tier ist, im Speziellen ein Säugetier, das menschlich oder nicht-menschlich sein kann, wie z. B. ein Kaninchen, ein Mehrschweinchen, eine Ratte, eine Maus oder ein anderes Nagetier, eine Katze, ein Hund, ein Schwein, ein Schaf, eine Ziege, ein Rind oder Pferd oder ein Vogel, wie z. B. ein Huhn.

[0053] Dahinter kann ein therapeutisches Ziel stehen. (Gentherapie wird unten stehend behandelt.) Ebenso kann die Gegenwart einer Mutanten-, Allel-, Derivatsequenz oder Sequenzvariante in den Zellen eines Organismus, insbesondere wenn diese sich an Stelle einer homologen endogenen Sequenz befindet, eine Verwendung des Organismus als ein Modell zum Testen und/oder Studieren von Substanzen ermöglichen, welche die Aktivität des kodierten Polypeptids in vitro modulieren oder anderwärts von therapeutischem Potential sein könnten. Angenehmerweise können Tests für solche Substanzen jedoch in vitro, in Wirtszellen oder in zellfreien Systemen durchgeführt werden.

[0054] Geeignete Screeningverfahren werden auf dem Gebiet der Erfindung herkömmlicherweise verwendet. Sie umfassen Verfahren wie z. B. Radioimmuntests, Szintillations-Proximitäts-Test und ELISA-Verfahren. Geeigneterweise wird entweder das p21-Protein oder -Fragment oder Cyclin-D1 und/oder Cdk 4 oder Fragment oder ein analoges, Derivat-, Varianten- oder funktionales Mimetikum davon immobilisiert, wonach die andere in Gegenwart der zu testenden Agenzien aufgebracht wird. In einem Szintillations-Proximitäts-Test ist ein biotinyliertes Proteinfragment an Streptavidin-beschichtete, mit einer Szintillationssubstanz imprägnierte Perlen (produziert von Amersham) gebunden. Die Bindung von radioaktiv markiertem Peptid wird dann durch Bestimmung der durch Radioaktivität induzierten Szintillation gemessen, da das radioaktive Peptid an das immobilisierte Fragment bindet. Agenzien, die diesen Vorgang abfangen, sind daher Inhibitoren der Wechselwirkung.

[0055] In einem allgemeinen Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Testverfahren, wie in den An-

sprüchen definiert, für eine Substanz mit der Fähigkeit, die Wechselwirkung oder Bindung zwischen p21 und Cyclin-D1 und/oder Cdk4 zu unterbrechen, bereit.

[0056] Daher kann eine Testverbindung, welche die Bindung oder Wechselwirkung zwischen besagten Substanzen (z. B. umfassend ein p21-Fragment und ein Cyclin-D1 und/oder Cdk-4-Fragment) unterbricht, reduziert, stört oder ganz oder teilweise aufhebt und welche die Cdk4-Aktivität modulieren kann, identifiziert werden.

[0057] Ein weiterer allgemeiner Aspekt der vorliegenden Erfindung stellt ein Testverfahren wie in den Ansprüchen definiert für eine Substanz bereit, die, je nach Situation, fähig ist, die relevante Region von p21 zu binden.

[0058] Eine Testverbindung, von der herausgefunden wurde, dass sie an den relevanten Abschnitt von p21 bindet, kann auf ihre Fähigkeit getestet werden, die p21-Wechselwirkung oder -Bindung mit Cyclin-D1 und/oder Cdk 4 zu unterbrechen, und/oder auf die Fähigkeit, die Cdk4-Aktivität oder andere Aktivitäten, die von p21 vermittelt werden, wie oben bereits beschrieben, zu beeinflussen.

[0059] Die Durchführung eines Testverfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung kann von der Isolierung und/oder Herstellung und/oder Verwendung einer Verbindung, Substanz oder eines Moleküls gefolgt werden, welche(s) auf die Fähigkeit, die Wechselwirkung zwischen p21 und Cyclin-D1 und/oder Cdk4 zu stören und/oder die p21-vermittelte Cdk4-Aktivität zu inhibieren, positiv getestet wurde.

[0060] Das genaue Format eines Tests der Erfindung kann vom Fachmann durch Routinefertigkeit und -Wissen variiert werden. Die Wechselwirkung zwischen Substanzen kann z. B. *in vitro* durch Markierung der einen mit einer nachweisbaren Markierung und In-Kontakt-Bringen mit der anderen, die auf einem Trägermaterial immobilisiert wurde, studiert werden. Geeignete nachweisbare Markierungen, besonders für Peptidyl-Substanzen, umfassen ^{35}S -Methionin, das in rekombinant produzierte Peptide und Polypeptide inkorporiert werden kann. Rekombinant produzierte Peptide und Polypeptide können ebenso als ein Fusionsprotein exprimiert werden, das ein Epitop enthält, welches mit einem Antikörper markiert werden kann.

[0061] Das auf einem festen Träger immobilisierte Protein kann unter Verwendung eines Antikörpers gegen dieses Protein immobilisiert sein, welcher an einen festen Träger gebunden ist, oder unter Anwendung anderer Verfahren, die per se bekannt sind. Eine bevorzugte *In-vitro*-Wechselwirkung kann ein Fusionsprotein verwenden, das Glutathion-S-Trans-

ferase (GST) umfasst. Dieses kann auf Glutathion-Agaroseperlen immobilisiert werden. In einem *In-vitro*-Testformat des oben beschriebenen Typs kann eine Testverbindung durch Bestimmen ihrer Fähigkeit, die Menge markierten Peptids oder Polypeptids, das an das immobilisierte GST-Fusions-Polypeptid bindet, zu minimieren, getestet werden. Das kann durch Fraktionierung der Glutathion-Agaroseperlen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmt werden. Alternativ dazu können die Perlen gespült werden, um umgebundene Proteine zu entfernen, und die Proteinmenge, die gebunden wurde, kann durch Zählen der Menge an vorhandenen Markierungen, z. B. in einem geeigneten Szintillationszähler, ermittelt werden.

[0062] Ein Test gemäß der vorliegenden Erfindung kann ebenfalls die Form eines *In-vivo*-Tests annehmen. Der *In-vivo*-Test kann in einer Zelllinie, wie z. B. einem Hefestamm oder einer Säugetierzelllinie, in der die relevanten Polypeptide oder Peptide von einem oder mehreren Vektoren, die in die Zelle eingebracht wurden, exprimiert werden, durchgeführt werden.

[0063] Die Fähigkeit einer Testverbindung, die Wechselwirkung oder Bindung zwischen p21 und Cyclin-D1 und/oder Cdk4 zu unterbrechen, kann durch Verwendung eines so genannten Zwei-Hybrid-Tests bestimmt werden.

[0064] Ein Polypeptid oder Peptid, z. B., das, je nach Situation, ein Fragment von p21 oder Cyclin-D1/Cdk4 enthält, oder ein Peptidyl-Analog oder eine -variante davon, wie offenbart, kann an eine DNA-bindende Domäne, wie z. B. der des Hefe-Transkriptionsfaktors GAL 4, fusioniert sein. Der GAL-4-Transkriptionsfaktor umfasst zwei funktionale Domänen. Diese Domänen sind die DNA-bindende Domäne (GAL4DBD) und die GAL4-Transkriptionsaktivierungsdomäne (GAL4TAD). Durch Fusionieren eines Polypeptids oder Peptids an eine dieser Domänen und eines anderen Polypeptids oder Peptids an das jeweilige Gegenstück wird ein funktionaler GAL-4-Transkriptionsfaktor nur dann wieder hergestellt, wenn zwei Polypeptide oder Peptide von Interesse Wechselwirken. Daher kann die Wechselwirkung der Polypeptide oder Peptide durch die Verwendung eines Reportergens, das wahrscheinlich an eine GAL-4-DNA-Bindungsstelle gebunden ist, welche fähig ist, die Transkription des Reportergens zu aktivieren, gemessen werden. Dieses Testformat wird von Fields & Song, Nature 340, 245-246 (1989), beschrieben. Dieser Typ Testformat kann sowohl in Säugetierzellen als auch in Hefe verwendet werden. Andere Kombinationen von DNA-bindenden Domänen und Transkriptionsaktivierungsdomänen sind auf dem Gebiet der Erfindung erhältlich und können bevorzugt sein, wie z. B. die LexA-DNA-Bindungsdomäne und die VP60-Transkriptionsaktivierungsdo-

mäne.

[0065] Um z. B. zum Zweck der Veranschaulichung einen Lex/VP60-Zwei-Hybrid-Screen durchzuführen, können Hefe- oder Säugetierzellen mit einer Reportergenkonstruktion, die ein selektives Markerprotein (z. B. für β -Galactosidase oder Luciferase kodierend) exprimiert, transformiert werden. Der Promotor dieses Gens ist so geschaffen worden, dass er eine Bindungsstelle für das LexA-DNA-Bindungsprotein enthält. Die Genexpression aus diesem Plasmid ist normalerweise sehr gering. Zwei weitere Expressionsvektoren können in die Hefe transformiert werden, die das selektierbare Marker-Expressionsplasmid enthält, wobei eines die kodierende Sequenz für das LexA-Gen voller Länge enthält, das an eine multiple Klonierungsstelle gebunden ist. Diese multiple Klonierungsstelle wird verwendet, um ein Gen von Interesse zu klonieren, d. h. für ein p21- oder CyclinD1/Cdk4-Polypeptid oder -Peptid gemäß der vorliegenden Erfindung kodierend, im Raster auf der für LexA-kodierenden Region. Der zweite Expressionsvektor umfasst dann die Aktivierungsdomäne des Herpes-simplex-Transaktivators VP16, der an eine Testpeptidsequenz oder noch bevorzugter eine Bibliothek an Sequenzen, die für Peptide mit verschiedenen, z. B. zufälligen, Sequenzen kodieren, fusioniert wurde. Die zwei Plasmide vereinfachen die Expression aus dem Reporterkonstrukt, das den selektierbaren Marker nur dann umfasst, wenn das LexA-Fusionskonstrukt mit einer Polypeptid- oder Peptidsequenz, die aus der Peptidbibliothek stammt, wechselt.

[0066] Auf der Suche nach Peptiden oder anderen Substanzen, welche die Wechselwirkung zwischen einem p21-Polypeptid oder -Peptid und einem Cyclin-D1/Cdk4-Polypeptid oder -Peptid stören, verwendet eine Modifikation davon das p21- oder Cyclin-D1/Cdk4-Polypeptid oder -Peptid als eine Fusion mit der LexA-DNA-Bindungsdomäne und das Gegenstück Cyclin-D1/Cdk4- oder p21-Polypeptid oder -Peptid als eine Fusion mit VP60 und umfasst eine dritte Expressionskassette, die sich auf einem separaten Expressionsvektor befinden kann, aus dem ein Peptid oder eine Peptidbibliothek verschiedener und/oder zufälliger Sequenzen exprimiert werden kann. Eine Reduktion der Reportergenexpression (z. B. im Fall von β -Galactosidase eine Schwächung der blauen Farbe) ist auf die Gegenwart eines Peptids zurückzuführen, dass die p21/CyclinD1- und/oder Cdk4-Wechselwirkung unterbricht, wobei diese Wechselwirkung für die Transkriptionsaktivierung des β -Galactosidase-Gens erforderlich ist. Wenn eine Testsubstanz nicht Peptidyl ist und nicht von der kodierenden Nucleinsäure in einer dritten Expressionskassette exprimiert werden kann, so kann ein ähnliches System verwendet werden, in dem die Testsubstanz exogen verabreicht wird.

[0067] Wie angeführt, können anstelle von LexA und VP60 andere ähnliche Kombinationen von Proteinen verwendet werden, die zusammen einen funktionalen Transkriptionsaktivator bilden, wie z. B. die GAL4-DNA-Bindungsdomäne und die GAL4-Transkriptionsaktivierungsdomäne.

[0068] Wird ein Zwei-Hybrid-Test durchgeführt, um Substanzen zu suchen, welche die Wechselwirkung zwischen zwei Polypeptiden oder Peptiden stören, so kann die Verwendung von Säugetierzellen anstelle von Hefezellen bevorzugt werden. Es gelten die gleichen Prinzipien, und geeignete Verfahren sind dem Fachmann gut bekannt.

[0069] Die Menge der Testsubstanz oder -verbindung, die zu einem Test der Erfindung hinzugefügt werden kann, wird normalerweise, in Abhängigkeit der Art der verwendeten Verbindung, mittels Trial-and-Error-Versuche bestimmt. Typischerweise können Konzentrationen von mutmaßlichen Inhibitorverbindungen von etwa von 0,01 bis 100 nM verwendet werden, z. B. von 0,1 bis 10 nM. Größere Konzentrationen können verwendet werden, wenn ein Peptid die Testsubstanz ist.

[0070] Verbindungen, die verwendet werden können, können natürliche oder synthetische chemische Verbindungen sein, die in Wirkstoffscreeningprogrammen verwendet werden. Pflanzenextrakte, die mehrere charakterisierte oder uncharakterisierte Komponenten enthalten, können ebenso verwendet werden.

[0071] Antikörper, die in beiden Proteinen auf die Stelle der Wechselwirkung gerichtet sind, bilden eine weitere Klasse an mutmaßlichen Inhibitorverbindungen. Kandidaten-Inhibitorkörper können charakterisiert und ihre Bindungsregionen festgestellt werden, um einkettige Antikörper und Fragmente davon bereitzustellen, die für die Unterbrechung der Wechselwirkung verantwortlich sind.

[0072] Antikörper können unter Anwendung von nach dem Stand der Technik bekannten Standardverfahren erhalten werden. Verfahren zur Herstellung von Antikörpern umfassen die Immunisierung eines Säugetiers (z. B. Maus, Ratte, Kaninchen, Pferd, Ziege, Schaf oder Affe) mit dem Protein oder einem Fragment davon. Antikörper können aus immunisierten Tieren unter Anwendung irgendeines einer Reihe auf dem Gebiet der Erfindung bekannter Verfahren erhalten werden und, vorzugsweise unter Verwendung einer Bindung des Antikörpers an das Antigen von Interesse, gescreent werden. Es können z. B. Western-Blotting-Verfahren oder Immunfäällung verwendet werden (Armitage et al., Nature 357, 80-82 (1992)). Isolierung von Antikörpern und/oder antikörperproduzierenden Zellen aus einem Tier kann vom Schritt der Tötung des Tiers begleitet sein.

[0073] Als Alternative oder Ergänzung zur Immunisierung eines Säugetiers mit einem Peptid kann ein für ein Protein spezifischer Antikörper aus einer rekombinant produzierten Bibliothek von exprimierten variablen Immunglobulindomänen, z. B. unter Verwendung von λ -Bakteriophagen oder filamentöse Bakteriophagen, die auf ihren Oberflächen funktionale Immunglobulin-Bindungsdomänen aufweisen, erhalten werden; siehe, z. B. WO 92/01047. Die Bibliothek kann naiv sein, d. h. aus Sequenzen aufgebaut, die von einem Organismus erhalten wurden, der nicht mit einem beliebigen der Proteine (oder Fragmente) immunisiert wurde, oder kann eine sein, die unter Verwendung von Sequenzen von einem Organismus, der dem Antigen von Interesse ausgesetzt wurde, konstruiert wurde.

[0074] Antikörper gemäß der Erfindung können auf zahlreiche Wege modifiziert werden. Tatsächlich sollte der Begriff "Antikörper" jede bindende Substanz mit einer Bindungsdomäne mit der erforderlichen Spezifität abdecken und als solche verstanden werden. Daher deckt die Erfindung Antikörper-Fragmente, -Derivate, funktionale Äquivalente und Homologe von Antikörpern ab, umfassend synthetische Moleküle und Moleküle, deren Form jene des Antikörpers nachahmt, was ihnen ermöglicht, ein Antigen oder Epitop zu binden.

[0075] Beispiele für Antikörperfragmente, die fähig sind, ein Antigen oder einen anderen Bindungspartner zu binden, sind das Fab-Fragment, das aus den VL-, VH-, CL- und CH1-Domänen besteht; das Fd-Fragment, das aus den VH- und CH1-Domänen besteht; das Fv-Fragment, das aus den VL- und VH-Domänen eines einzelnen Arms eines Antikörpers besteht; das dAb-Fragment, das aus einer VH-Domäne besteht; isolierte CDR-Regionen und F(ab')2-Fragmente, ein zweiwertiges Fragment, das zwei Fab-Fragmente inkludiert, die über eine Disulfidbrücke an die Gelenkregion gebunden sind. Einketten-Fv-Fragmente sind ebenso inkludiert.

[0076] Ein Hybridom, das einen monoklonalen Antikörper gemäß der vorliegenden Erfindung produziert, kann einer genetischen Mutation oder anderen Veränderungen unterzogen werden. Weiters ist dem Fachmann klar, dass ein monoklonaler Antikörper den Verfahren der DNA-Rekombinationstechnologie unterzogen werden kann, um andere Antikörper oder chimäre Moleküle zu produzieren, welche die Spezifität des ursprünglichen Antikörpers beibehalten. Solche Verfahren können das Einführen von DNA, die für die variable Immunglobulin-Region kodiert, oder den komplementariätsbestimmenden Regionen (CDRs) eines Antikörpers in die konstanten Regionen oder konstanten Regionen plus Gerüstregionen eines anderen Immunglobulins umfassen. Siehe z. B. EP 184187 A, GB 2188638 A oder EP-A-0239400. Das Klonieren und die Expression von chimären An-

tikörpern wird in EP-A-0120694 und EP-A-0125023 beschrieben.

[0077] Hybridome, die fähig sind, Antikörper mit den gewünschten Bindungseigenschaften zu produzieren, befinden sich im Umfang der vorliegenden Erfindung, genauso wie Wirtszellen, eukaryotisch oder prokaryotisch, die Nucleinsäure enthalten, welche für Antikörper (inkludierend Antikörperfragmente) kodiert, und zu deren Expression fähig sind. Die Erfindung stellt auch Verfahren zur Produktion der Antikörper bereit, umfassend das Züchten einer Zelle, die fähig ist, den Antikörper unter Bedingungen zu produzieren, in denen der Antikörper produziert und vorentscheidend sekretiert wird.

[0078] Die Reaktivität von Antikörpern in einem Sample kann durch jedes geeignete Verfahren bestimmt werden. Markieren mit einzelnen Reportermolekülen ist eine Möglichkeit. Die Reportermoleküle können direkt oder indirekt nachweisbare und vorentscheidend messbare Signale generieren. Die Bindung von Reportermolekülen kann direkt oder indirekt, kovalent, z. B. über eine Peptidbindung, oder nicht kovalent sein. Eine Bindung über eine Peptidbindung kann das Resultat rekombinanter Expression einer Genfusion sein, die für den Antikörper und das Reportermolekül kodiert.

[0079] Eine bevorzugte Art ist durch kovalente Bindung jedes Antikörpers mit einem einzelnen Fluoreszenzfarbstoff, Phosphor- oder Laserfarbstoff mit spektral isolierten Absorptions- oder Emissionseigenschaften. Geeignete Fluoreszenzfarbstoffe umfassen Fluorescein, Rhodamin, Phycoerythrin und Texasrot. Geeignete chromogene Farbstoffe umfassen Diaminobenzidin.

[0080] Andere Reporter inkludieren makromolekulare kolloidale Partikel oder partikuläres Material, wie z. B. gefärbte Latexperlen, magnetisch oder paramagnetisch, sowie biologisch oder chemisch aktive Agenzien, die, direkt oder indirekt, nachweisbare Signale hervorrufen können, die sichtbar beobachtet, elektronisch nachgewiesen oder auf andere Art und Weise aufgenommen werden können. Diese Moleküle können Enzyme sein, die Reaktionen katalysieren, welche Farben entwickeln oder verändern oder z. B. Veränderungen in elektrischen Eigenschaften hervorrufen. Sie können molekular anregbar sein, so dass elektronische Übergänge zwischen Energiezuständen zu charakteristischen spektralen Absorptions- oder Emissionen führen. Sie können chemische Einheiten umfassen, die in Verbindung mit Biosensoren verwendet werden. Biotin/Avidin- oder Biotin/Streptavidin- und Alkalische-Phosphatase-Nachweisysteme können dabei verwendet werden.

[0081] Der Modus des Nachweises der Bindung ist kein Merkmal der vorliegenden Erfindung, und der

Fachmann ist fähig, je nach seinen Präferenzen und allgemeinem Wissen einen geeigneten Modus auszuwählen.

[0082] Antikörper können auch verwendet werden, um ein Polypeptid oder Peptid gemäß der vorliegenden Erfindung zu reinigen und/oder zu isolieren, z. B. nach der Produktion des Polypeptids oder Peptids durch Expression aus dafür kodierender Nucleinsäure. Antikörper können in einem therapeutischen Kontext (der Prophylaxe inkludieren kann) nützlich sein, um die p21/Cyclin-D1/Cdk4-Wechselwirkung im Hinblick auf eine Hemmung der Cdk4-Aktivität und damit der Zellproliferation zu unterbrechen. Antikörper können z. B. in Zellen mikroinjiziert werden, etwa an einer Tumorstelle.

[0083] Andere Kandidaten-Inhibitorverbindungen können auf Modellieren der 3-dimensionalen Struktur eines Polypeptid- oder Peptidfragments basieren sowie auf der Verwendung von rationalem Wirkstoffdesign, um potentielle Inhibitorverbindungen mit besonderen Eigenschaften molekularer Form, Größe und Ladung bereitzustellen.

[0084] Eine Verbindung, von der herausgefunden wurde, dass sie die Fähigkeit hat, die Cdk4-Aktivität zu beeinflussen, hat in der Antitumorbehandlung therapeutisches Potential und kann in Kombination mit anderen Antitumorverbindungen verwendet werden. In einem solchen Fall muss der Test der Erfindung, wenn er *in vivo* durchgeführt wird, nicht den Hemmungsgrad der Bindung oder der Modulierung der Cdk4-Aktivität messen, die durch die getestete Verbindung hervorgerufen wird. Stattdessen kann die Wirkung auf die Tumorgenität und/oder Zellebensfähigkeit gemessen werden. Es kann sein, dass so ein modifizierter Test parallel zu oder nach dem Haupttest der Erfindung durchgeführt wird, um zu bestätigen, dass jede Wirkung auf die Tumorgenität oder und/oder Zellebensfähigkeit das Ergebnis der Hemmung der Bindung oder Wechselwirkung zwischen p21 und Cyclin-D1/Cdk4, von der Inhibitorverbindung hervorgerufen, ist und nicht lediglich eine allgemeine-toxische Wirkung ist.

[0085] Nach der Identifizierung einer Substanz oder eines Agens, die/das die Cdk4-Aktivität moduliert oder beeinflusst, kann die Substanz oder das Agens weiter untersucht werden. Weiters kann sie/es hergestellt werden und/oder bei der Herstellung, d. h. bei der Herstellung oder Formulierung, einer Zusammensetzung wie beispielsweise eines Medikaments, einer pharmazeutischen Zusammensetzung oder eines Wirkstoffs verwendet werden. Diese können Individuen verabreicht werden.

[0086] Wie hervorgehoben wurde, kann das Agens ein Peptidyl, z. B. ein Peptid, das eine wie oben angegebene Sequenz enthält, oder ein funktionales

Analogon eines solchen Peptids sein.

[0087] Wie hierin verwendet bezieht sich der Ausdruck "funktionales Analogon" auf Peptidvarianten oder organische Verbindungen, welche die gleiche funktionale Aktivität wie das besagte Peptid haben, die die Bindung zwischen p21 und Cyclin-D1/Cdk4 stören kann. Beispiele solcher Analoga umfassen chemische Verbindungen, die so modelliert sind, um der dreidimensionalen Struktur der p21- oder Cyclin-D1/Cdk4-Domäne im Kontaktbereich und im Besonderen der Anordnung der Schlüsselaminosäure-Reste, die oben stehend identifiziert sind, wie sie in menschlichem p21 vorkommen, zu ähneln.

[0088] In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung, wie in den Ansprüchen definiert, die Verwendung der oben genannten Substanzen in Verfahren zum Design oder Screenen auf Mimetika dieser Stoffe bereit.

[0089] Ein Verfahren zum Entwerfen von Mimetika von p21^{WAF1} mit der biologischen Aktivität, Cdk4 zu binden oder zu hemmen, der Aktivität, Cdk4 allosterisch zu hemmen, und/oder der Aktivität, Cyclin-D1 zu binden, kann Folgendes umfassen:

- (i) Analyse einer Substanz mit der biologischen Aktivität, um die Aminosäurereste zu bestimmen, die für die Aktivität, ein Pharmakophor zu bestimmen, essentiell und wichtig sind, und
- (ii) Modellierung des Pharmakophors, um Kandidaten-Mimetika mit der biologischen Aktivität zu kreieren und/oder zu screenen.

[0090] Geeignete Modellierungsverfahren sind auf dem Gebiet der Erfindung bekannt. Das umfasst das Design der sogenannten "Mimetika", welches das Studium der funktionalen Wechselwirkungen zwischen fluorogenen Oligonucleotiden und den Molekülen und des Designs der Verbindungen, die funktionale Gruppen enthalten, die auf solch eine Art und Weise angeordnet sind, dass sie diese Wechselwirkungen reproduzieren können, involviert.

[0091] Das Entwerfen von Mimetika einer bekannten, pharmazeutisch aktiven Verbindung ist ein bekannter Ansatz der Entwicklung von pharmazeutischen Produkten, die auf einer Leitverbindung basieren. Das kann in Fällen erwünscht sein, in denen die aktive Verbindung schwierig oder teuer zu synthetisieren ist oder in denen sie für eine bestimmte Verabreichungsart nicht geeignet ist, z. B. eignen sich Peptide nicht gut als Wirkstoffe für orale Zusammensetzungen, da sie dazu tendieren, schnell von Proteasen im Verdauungstrakt abgebaut zu werden. Nachahmendes Design, Synthese und Testen können verwendet werden, um ein Zufallsscreening großer Molekülanzahlen auf eine Zieleigenschaft zu vermeiden.

[0092] Es gibt einige Schritte, die normalerweise im

Design eines Mimetikums einer Verbindung mit einer besagten Zieleigenschaft durchgeführt werden. Zuerst werden die bestimmten Teile der Verbindung, die für die Bestimmung der Targeteigenschaft kritisch und/oder wichtig sind, ermittelt. Im Fall eines Peptids kann dies durch systematisches Variieren der Aminosäurereste im Peptid erfolgen, z. B. durch aufeinander folgendes Substituieren eines jeden der Reste. Diese Teile oder Reste, welche die aktive Region der Verbindung darstellen, sind als ihr "Pharmakophor" bekannt.

[0093] Ist das Pharmakophor einmal gefunden, wird seine Struktur entsprechend seiner physischen Eigenschaften modelliert, z. B. Stereochemie, Bindung, Größe und/oder Ladung, unter Verwendung von Daten aus einer Reihe von Quellen, z. B. Spektroskopieverfahren, Röntgenbeugungsdaten und NMR. Rechentechnische Analyse, Ähnlichkeitskartierung (welche die Ladung und/oder das Volumen eines Pharmakophors anstatt der Bindung zwischen den Atomen modelliert) und andere Verfahren können in diesem Modellierungsprozess verwendet werden.

[0094] In einer Variante dieses Ansatzes wird die dreidimensionale Struktur des Liganden und seines Bindungspartners modelliert. Dies kann besonders nützlich sein, wenn der Ligand und/oder Bindungspartner die Konformation der Bindung verändern, um es dem Modell zu ermöglichen, dieses Design des Mimetikums in Betracht zu ziehen.

[0095] Ein Matrizenmolekül wird dann ausgewählt, auf das chemische Gruppen, die das Pharmakophor nachahmen, aufgepropft werden können. Das Matrizenmolekül und die darauf aufgepropften chemischen Gruppen können leicht ausgewählt werden, sodass das Mimetikum leicht zu synthetisieren ist, wahrscheinlich pharmakologisch annehmbar ist und nicht *in vivo* abgebaut wird und gleichzeitig die biologische Aktivität der Leitverbindung beibehält. Das Mimetikum oder die Mimetika, das/die durch diesen Ansatz gefunden wurde(n), kann/können dann gescreent werden, um zu sehen, ob sie die Targeteigenschaft aufweisen oder in welchem Ausmaß sie diese aufweisen. Weitere Optimierung oder Modifizierung kann dann durchgeführt werden, um eine oder mehrere finale Mimetika für *In-vivo*- oder klinische Tests zu erhalten.

[0096] Das Mimetikum oder die Mimetika, das/die durch diesen Ansatz gefunden wurde(n), kann/können dann gescreent werden, um zu sehen, ob sie die Targeteigenschaft aufweisen oder in welchem Ausmaß sie diese aufweisen. Weitere Optimierung oder Modifizierung kann dann durchgeführt werden, um eine oder mehrere finale Mimetika für *In-vivo*- oder klinische Tests zu erhalten.

[0097] Weiters stellt die vorliegende Erfindung, wie

in den Ansprüchen definiert, die Verwendung eines Peptids oder eines Derivats, eines aktiven Abschnitts, Analogons oder einer Variante davon bereit, der/die/das in der Lage ist, beim Screenen auf eine Substanz, die in der Lage ist, Cdk4 zu binden und/oder die Cdk4-Aktivität zu hemmen, Cdk4 zu binden und/oder die Cdk4-Aktivität zu hemmen.

[0098] Normalerweise wird ein Inhibitor in einer isolierten und/oder gereinigten Form, d. h. im Wesentlichen rein, bereitgestellt. Das kann das Vorhandensein in einer Zusammensetzung umfassen, in der er zumindest etwa 90% des Wirkstoffs, noch bevorzugter zumindest etwa 95%, noch bevorzugter zumindest etwa 98%, ausmacht. Solch eine Zusammensetzung kann jedoch inerte Trägermaterialien oder andere pharmazeutisch und physiologisch annehmbare Arzneimittelträger umfassen. Wie unten stehend festgehalten, kann eine Zusammensetzung zusätzlich zu einer Inhibitorverbindung, wie offenbart, ein oder mehrere andere Moleküle therapeutischer Verwendung, wie z. B. ein Antitumoragens, umfassen.

[0099] Eine Substanz, die, im Einklang mit den hierin enthaltenen Offenbarungen, als ein Modulator der p21- und Cyclin-D1/Cdk4-Wechselwirkung und/oder der Cdk4-vermittelten RB-Phosphorylierung oder anderer Substrate von Cdk4 oder anderer p21-vermittelter Aktivität, Eigenschaft oder Stoffwechselweg identifiziert wurde, kann in einer pharmazeutischen Zusammensetzung, einem Medikament, Wirkstoff oder einer anderen Zusammensetzung, die eine solche Substanz umfasst, einem Verfahren, das die Verabreichung einer solchen Zusammensetzung an einen Patienten umfasst, z. B. zur Antitumor- oder anderer antiproliferativer Behandlung, die präventive Behandlung miteinschließen können, einer Verwendung solch einer Substanz bei der Herstellung einer Zusammensetzung zur Verabreichung, z. B. zur Antitumor- oder anderer antiproliferativer Behandlung, und einem Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, welche das Hinzufügen solch einer Substanz zu einem pharmazeutisch annehmbaren Arzneimittelträger, Vehikel oder Träger sowie gegebenenfalls anderen Inhaltsstoffen umfasst, Verwendung finden.

[0100] Eine Substanz, wie z. B. ein Inhibitor von p21- und Cyclin-D1 und/oder Cdk4-Wechselwirkung oder -Bindung, kann zur Verwendung in einem Behandlungsverfahren des menschlichen oder tierischen Körpers durch eine Therapie, welche die Cdk4-Aktivität oder andere p21-vermittelte Aktivität in Zellen, z. B. Tumorzellen, beeinflusst, bereitgestellt werden.

[0101] Daher umfasst ein Verfahren zur Modulierung der Cdk4-Aktivität oder anderer p21-vermittelter Aktivität in einer Zelle die Verabreichung eines

Agens, das die Bindung von p21 an Cyclin-D1 und/oder Cdk4-Protein hemmt oder blockiert, wobei so ein Verfahren bei der Behandlung von Krebs oder anderer Krankheiten oder Störungen, einschließlich Malignitäten, bei denen die Inhibierung von zellulärem Wachstum und/oder Proliferation erwünscht ist, nützlich ist.

[0102] Ein Verfahren zur Behandlung von Tumoren umfasst das Verabreichen eines Agens an einen Patienten, der die Bindung von p21 an Cyclin-D1 und/oder Cdk4 stört.

[0103] Egal ob es sich um ein Polypeptid, einen Antikörper, ein Peptid, ein Nucleinsäuremolekül, ein kleines Molekül, ein Mimetikum oder eine andere pharmazeutisch nützliche Verbindung handelt, die einem Individuum verabreicht werden soll, die Verabreichung erfolgt vorzugsweise in einer "prophylaktisch wirksamen Menge" oder einer "therapeutisch wirksamen Menge" (je nach Situation, obwohl die Prophylaxe als Therapie angesehen werden kann), da dies ausreichend ist, um beim Individuum positive Wirkung zu zeigen. Die tatsächlich verabreichte Menge, die Häufigkeit und der Zeitplan der Verabreichung hängen von der Art und der Schwere der zu behandelnden Erkrankung ab. Die Verschreibung von Behandlungen, z. B. Entscheidungen über die Dosierung etc., liegt in der Verantwortung der praktischen Ärzte und anderer Fachärzte.

[0104] Eine Zusammensetzung kann alleine oder in Kombination mit anderen Behandlungen verabreicht werden, entweder gleichzeitig oder nacheinander, je nach der zu behandelnden Erkrankung.

[0105] Pharmazeutische Zusammensetzungen zur Verwendung gemäß der vorliegenden Erfindung können, zusätzlich zu dem Wirkstoff, einen pharmazeutisch akzeptablen Arzneimittelträger, Träger, Puffer, Stabilisator oder andere, dem Fachmann gut bekannte Materialien umfassen. Solche Materialien sollten nicht toxisch sein und sollten die Wirksamkeit des Wirkstoffs nicht stören. Die genaue Natur des Trägers oder anderen Materials hängt von der Verabreichungsart ab, welche oral oder durch Injektion, z. B. kutan, subkutan oder intravenös, sein kann.

[0106] Pharmazeutische Zusammensetzungen zur oralen Verabreichung können die Form von Tabletten, Kapseln, Pulvern oder Flüssigkeiten haben. Eine Tablette kann einen festen Träger, wie z. B. Gelatine oder ein Adjuvans, umfassen. Flüssige pharmazeutische Zusammensetzungen umfassen im Allgemeinen einen flüssigen Träger, wie z. B. Wasser, Petroleum, tierische oder pflanzliche Öle, Mineralöl oder synthetisches Öl. Physiologische Salzlösung, Dextrose- oder andere Saccharidlösungen oder Glykole, wie z. B. Ethylenglykol, Propylenglykol oder Polyethylenglykol, können inkludiert sein.

[0107] Zur intravenösen, kutanen oder subkutanen Injektion oder zur Injektion an der Stelle der Beschwerden hat der aktive Inhaltsstoff die Form einer parenteral annehmbaren wässrigen Lösung, die pyrogenfrei ist und einen geeigneten pH Wert, eine geeignete Isotonie und Stabilität aufweist. Der durchschnittlich gebildete Fachmann ist leicht in der Lage, geeignete Lösungen herzustellen, z. B. isotonische Vehikel, wie etwa Natriumchloridinjektion, Ringer-Injektion, taktierte Ringer-Injektion. Konservierungsstoffe, Stabilisatoren, Puffer, Antioxidantien und/oder andere Additive können, je nach Bedarf, umfasst sein.

[0108] Beispiele für oben stehend erwähnte Verfahren und Arbeitsvorschriften sind in Remington's Pharmaceutical Sciences, 16. Auflage, A. Oslo (Hrsg.) (1980), zu finden.

[0109] Das Agens kann lokal an eine Tumorstelle oder an eine andere gewünschte Stelle verabreicht werden, oder es kann auf eine Art und Weise verabreicht werden, auf die es auf Tumor- oder andere Zellen als Target abzielt.

[0110] Targeting-Therapien können verwendet werden, um den Wirkstoff spezifischer durch Verwendung von Targeting-Systemen, wie z. B. antikörper- oder zellspezifische Liganden, bestimmten Zellarten zuzuführen. Targeting kann aufgrund einer Reihe von Gründen erwünscht sein, z. B. wenn das Agens inakzeptabel toxisch ist oder wenn er andernfalls eine zu hohe Dosis erfordern würde oder wenn er anders nicht fähig wäre, in die Targetzellen einzudringen.

[0111] Anstatt diese Agenzien direkt zu verabreichen, können sie in den Targetzellen durch Expression aus einem kodierenden Gen, das in die Zellen eingeführt wurde, z. B. in einem viralen Vektor (eine Variante des VDEPT-Verfahrens – siehe unten), produziert werden. Der Vektor kann auf die spezifischen, zu behandelnden Zellen abzielen, oder er kann regulatorische Elemente enthalten, die von den Targetzellen mehr oder weniger selektiv angeschaltet werden.

[0112] Das Agens kann in einer Vorläuferform verabreicht werden, zur Umwandlung in die aktive Form durch ein aktivierendes Agens, das in den zu behandelnden Zellen produziert wird oder auf diese abzielt. Diese Art des Ansatzes wird manchmal als ADEPT oder VDEPT bezeichnet, wobei Ersterer das Targeting des aktivierenden Agens auf die Zellen durch Konjugation an einen zellspezifischen Antikörper umfasst, während Letzterer die Produktion des aktivierenden Agens, z. B. eines Enzyms, in einem Vektor durch Expression aus kodierender DNA in einem viralen Vektor umfasst (siehe z. B. EP-A-415731 und WO 90/07936).

[0113] Eine Zusammensetzung kann alleine oder in

Kombination mit anderen Behandlungen verabreicht werden, entweder gleichzeitig oder nacheinander, je nach der zu behandelnden Erkrankung, z. B. Krebs, Virusinfektionen oder jeder andere Zustand, bei dem eine p21-vermittelte Wirkung erwünscht ist.

[0114] Nucleinsäure, die für ein Polypeptid oder Peptid kodiert, das fähig ist, die p21- und Cyclin-D1- und/oder Cdk4-Wechselwirkung oder -Bindung zu stören und/oder die Cdk4-Aktivität oder andere p21-vermittelte zelluläre Stoffwechselwege oder Funktionen zu induzieren oder zu modulieren, kann in Gentherapieverfahren verwendet werden, z. B. bei der Behandlung von Individuen mit dem Ziel, einen Tumor (ganz oder teilweise) zu verhindern oder zu heilen, z. B. bei Krebs oder anderen Störungen, die einen Verlust der korrekten Regulierung des Zellzyklus und/oder der Zellvermehrung umfassen, sowie anderen Störungen, bei denen ein spezifischer Zelltod erwünscht ist, wie z. B. bei gewissen viralen Infektionen.

[0115] Vektoren, wie z. B. virale Vektoren, wurden nach dem Stand der Technik verwendet, um Nucleinsäure in eine große Auswahl verschiedener Targetzellen einzuführen. Typischerweise werden die Vektoren gegenüber Targetzellen ausgesetzt, sodass die Transfektion in einem ausreichenden Teil der Zellen stattfinden kann, um eine nützliche therapeutische oder prophylaktische Wirkung aus der Expression des gewünschten Polypeptids bereitzustellen. Die transfizierte Nucleinsäure kann dauerhaft in das Genom einer jeden der als Target ausgesuchten Tumorzellen inkorporiert werden und so eine lange anhaltende Wirkung bieten, alternativ dazu kann die Behandlung auch periodisch wiederholt werden.

[0116] Auf dem Gebiet der Erfindung sind eine Reihe von Vektoren, sowohl virale Vektoren als auch Plasmidvektoren, bekannt, siehe US-Patent Nr. 5.252.479 und WO 93/07282. Im Speziellen wurde eine Reihe von Viren als Gentransfektorvektoren verwendet, einschließlich Papovaviren, wie etwa SV40, Vacciniaviren, Herpesviren, einschließlich HSV und EBV, sowie Retroviren. Viele Gentherapie-Arbeitsvorschriften auf dem Gebiet der Erfindung haben verkrüppelte murine Retroviren verwendet.

[0117] Als Alternative zur Verwendung viraler Vektoren umfassen andere bekannte Verfahren zum Einführen von Nucleinsäure in Zellen Elektroporation, Calciumphosphat-Co-Fällung, mechanische Verfahren, wie z. B. Mikroinjektion, liposomenvermittelten Transfer und direkte DNA-Aufnahme und rezeptorvermittelten DNA-Transfer.

[0118] Rezeptorvermittelter Gentransfer, in dem die Nucleinsäure via Polylysin an einen Proteinliganden gebunden ist, wobei der Ligand spezifisch für einen auf der Oberfläche der Targetzellen befindlichen Re-

zeptor ist, ist ein Beispiel für ein Verfahren zum spezifischen Targeting von Nucleinsäure auf bestimmte Zellen.

[0119] Ein Polypeptid, Peptid oder eine andere Substanz, das/die fähig ist, die Wechselwirkung des relevanten Polypeptids, Peptids oder anderer, wie hierin offenbarer Substanz zu stören, oder ein Nucleinsäuremolekül, das für ein Peptidyl kodiert, kann in einem Set, z. B. versiegelt in einem geeigneten Container, der seinen Inhalt vor der äußeren Umwelt schützt, bereitgestellt werden. So ein Set kann Anweisungen zur Verwendung umfassen.

[0120] Verschiedene weitere Aspekte und Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung sind für den Fachmann im Hinblick auf die vorliegenden Offenbarungen offensichtlich. Einige Aspekte und Ausführungsformen der Erfindung werden nun als Beispiel dargestellt und nehmen Bezug auf die folgenden Figuren:

[0121] **Fig. 1:** Die Fähigkeit von Peptiden von p21^{WAF1}, mit Cdk4 und Cyclin-D1 wechselzuwirken.

[0122] **Fig. 1a:** eine Liste der Peptide 1-11 basierend auf der Sequenz von p21^{WAF1}. **Fig. 1b:** Die p21^{WAF1}-Peptide wurden an Streptavidin-Agaroseperlen gebunden und wurden zu Retikulozyt-Lysaten hinzugefügt, die entweder Cdk4 oder Cyclin-D1, markiert mit [³⁵S]-Methionin, enthielten. Nach ausgiebigem Waschen wurden gebundene Proteine unter Verwendung von SDS-PAGE analysiert, gefolgt von einer Autoradiographie. Die Bande wurden unter Verwendung eines Bio-Bildgebers und Whole-Band-Analyse-Software (Millipore) quantifiziert. Die Resultate sind für 3 solcher Experimente repräsentativ. "x" zeigt Perlen ohne Peptid an.

[0123] **Fig. 2:** Zusatz von auf p21^{WAF1} basierenden Peptiden zu Cyclin-D1-Cdk4-Phosphorylierungstests.

[0124] Cyclin-D1-Cdk4-Tests wurden in vitro unter Verwendung von Lysaten aus einer Sf9-Insektenzelle gefolgt von Co-Infektion mit Cdk4- und Cyclin-D1-Baculoviruskonstrukten und GST-Rb als Substrat durchgeführt. p21^{WAF1}-Peptide wurden in einer Konzentration von 17 μ M zu den Tests hinzugefügt, und die Wirkung auf die Cdk4-Aktivität wurde durch SDS-PAGE und Autoradiographie ermittelt. Die Zeichnung zeigt die Quantifizierung des Autoradiogramms unter Verwendung von Biobildgebern, die relative Bindung wird durch die Cdk4-Aktivität in Abwesenheit des Peptids dargestellt. Die Daten sind für 4 Experimente repräsentativ. "x" zeigt keinen Zusatz von Peptid.

[0125] **Fig. 3:** Quantifizierung der Peptidinhibierung.

[0126] Die Peptide 4, 8, 2 und 10 wurden zu Cyclin-D1-Cdk4-Tests in verschiedenen Konzentrationen zwischen 0,01–34 µM hinzugefügt. Die Zeichnung zeigt ein Diagramm der Aktivität (%) relativ zur Cdk4-Aktivität, die in Abwesenheit der Peptides gemessen wurde, über die Peptid-Konzentration und $I_{0,5}$ für jedes Peptid. Die Daten zeigen den Mittelwert von 3 Experimenten.

[0127] [Fig. 4](#): Peptide 2 oder 10 sind keine Substrate für Cyclin-D1-Cdk4.

[0128] Die Fig. zeigt die Resultate der Phosphorylierungstests unter Verwendung der Peptide 2, 4 und 10.

[0129] [Fig. 5](#): Größenscan von Peptid 10.

[0130] Die Fig. zeigt die Sequenzen einer Reihe von Peptiden, die auf Peptid 10 basieren und kreiert wurden, um die minimale inhibitorische Domäne zu finden. Die eingerahmten Reste stellen die minimale inhibitorische Domäne dar. Die Peptide wurden zu Cyclin-D1-Cdk4-Tests hinzugefügt und mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

[0131] [Fig. 6](#): Alanin-Scan-Mutationen von Peptid 10.

[0132] Um Reste, die für die Inhibition von Cdk4 durch Peptid 10 entscheidend waren, ausfindig zu machen, wurde eine Reihe von Punktmutationen konstruiert, in denen jeder Rest sequentiell zu Alanin geändert wurde. Die Peptide wurden zu Cyclin-D1-Cdk4-Tests hinzugefügt, und die Resultate wurden durch SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert und dann mittels eines Bio-Bildgebers quantifiziert. Die Resultate werden relativ zur Cdk4-Aktivität in Abwesenheit von Peptid ausgedrückt und repräsentieren 3 Experimente. Nachdem die Erfinder die entscheidenden Reste identifiziert hatten, synthetisierten sie ein unmarkiertes Acht-Aminosäurepeptid, welches das R, L und F (KRRLIFS) enthielt, und bestimmten die Phosphorylierung von GST-Rb durch Cyclin-D1-Cdk4 in Gegenwart von zunehmenden Konzentrationen dieses truncierten Peptids.

[0133] [Fig. 7](#): Vergleich von inhibitorischen Peptiden mit Volllängen-p21^{WAF1}-Protein.

[0134] Dies zeigt die Konzentrationskurven für Peptid 10, D-zu-A-Mutantenpeptid 10, ein von p16INK4 abstammendes Peptid (Fahraeus et al. (1996)) und Volllängen-his-p21^{WAF1}, bestimmt unter Verwendung des Cyclin-D1-Cdk4-Tests, analysiert durch SDS-PAGE, Autoradiographie und Bio-Bildgebung, und den $I_{0,5}$ jedes Inhibitors. Die Ergebnisse sind der Mittelwert von 3 solchen Experimenten.

[0135] [Fig. 8](#): Bindungs- und inhibitorische Domä-

nen von p21^{WAF1}. Die schraffierten Reste zeigen die Regionen von p21^{WAF1}, die in dieser Studie als bedeutend für die Cyclin-D1- und Cdk4-Bindung und Cdk4-Inhibition in der N-terminalen Domäne identifiziert wurden sowie eine neue inhibitorische Domäne im C-Terminus von p21^{WAF1}. Die Reste, die als bedeutend für die Wechselwirkung von p21^{WAF1} mit PCNA (Warbrick et al. (1995)) gefunden wurden, sind in schwarz dargestellt. Zusätzlich wird der kleinste Teil von p21^{WAF1} dargestellt, von dem vor der vorliegenden Studie herausgefunden wurde, dass er in vitro die CDK-Aktivität hemmte (Luo et al. (1995)).

[0136] [Fig. 9](#): Einführung von auf p21^{WAF1} basierenden Peptiden in Zellen.

[0137] Eine Reihe von synthetischen Peptiden, die auf der Sequenz von Peptid 10 basieren (Peptide I, II und III, gezeigt in [Fig. 9a](#)), wurden mit einem Trägerpeptid (schraffierte Sequenzen) synthetisiert. Der unterstrichene Rest in Peptid I ist die M-zu-A-Mutation, welche die PCNA-Bindung verhindert. Die Peptide wurden zu proliferierenden HaCaT-Zellen hinzugefügt, die in DMEM plus 10% FCS gezüchtet wurden. Die Zellen wurden 24 Stunden lang inkubiert, währenddessen mit 15 µM BrdU pulsmarkiert, fixiert und dann mittels FACS analysiert. Die G₁-, S- und G₂-Phasen-Verteilungen für unbehandelte Zellen, Peptid-I bei 25 µM, Peptid-II bei 50 µM und Peptid-III bei 25 µM wurden bestimmt. [Fig. 9b](#) zeigt Daten dargestellt als den %-Satz der Zellen in jeder Phase im Vergleich zu der Gesamtanzahl an gezählten Zellen. Die Resultate ähnlicher Experimente unter Verwendung von MCF7- und MRC5-Zellen werden in [Fig. 9c](#) dargestellt, die den Prozentsatz an Zellen in jeder Phase des Zellzyklus in Gegenwart und Abwesenheit von Peptid-I zeigt.

[0138] In einem eigenen Experiment wurde DMEM + 10% FCS alleine oder DMEM + 10% FCS enthaltend entweder 25 µM Peptid-I oder 50 µM Peptid-II zu den HaCaT-Zellen hinzugefügt, die dann 72 Stunden lang ausgehungert wurden. Zu den angegebenen Zeiten wurden Proben genommen und mittels SDS-PAGE/Western-Blot, für pRb gefärbt, analysiert. pRb repräsentiert hypophosphoryliertes Rb-Protein, und pRb* bezieht sich auf hyperphosphoryliertes Rb-Protein. Es wird darauf hingewiesen, dass gleiche Mengen an Gesamtprotein pro Spur aufgeladen wurden und dass es so scheint, dass der Antikörper vorzugsweise phosphorylierte Formen des Rb-Proteins erkennt.

[0139] [Fig. 10](#): Inhibition der Cyclin-D1-Cdk4-Aktivität unter Verwendung von Derivaten von Peptid 2.

[0140] Die Fig. zeigt den Grad der Inhibition der Cyclin-D1-Cdk4-Aktivität unter Verwendung von pRb als Substrat durch Peptid-2- (2 in der Fig.) und Alanin-Scan-Mutationen des Peptids (wobei jeder Rest

sequentiell zu Alanin mutiert wird). Die Aktivität wird relativ zur uninhibierten Aktivität angegeben. (Nein steht für keine zugesetzten Peptide.) Peptide waren in einer Konzentration von 10 µM vorhanden. Ein ähnliches Muster ist zu sehen, wenn Peptid-2-Mutanten an Cyclin-D1, das in Retikulozyten-Lysaten exprimiert wurde, gebunden ist.

[0141] Wichtige Reste für die Bindung und Inhibition sind die beiden Arginin-Reste (R) und Phenylalanin (F), wobei Lysin (K) und Prolin (P) auch eine Rolle spielen. Das ist anders im Vergleich zu Resten, die für die Wechselwirkung von Volllängenprotein mit Cyclin-D1 als entscheidend identifiziert wurden, da diese Studien das LFG-Motiv als das wichtigste für die Aktivität identifizieren.

Experimentelle Verfahren

Peptide

[0142] Alle Peptide wurden von Chiron Mimotopes, Peptide Systems (Clayton, Australien) synthetisiert. Jedes Peptid weist einen Biotin-SGSG-Spacer am C-Terminus und einen freien N-Terminus auf. Die Peptide wurden in DMSO bei etwa 5 mg/ml aufgelöst, und dann bestimmten die Erfinder ihre Konzentration genau durch Aminosäureanalyse (Smythe et al. (1988)). Zusätzlich wurde die Reinheit der Peptide mittels Massenspektrometrie geschätzt. Positive Ionen-Ektrospray-Massenspektrometrie wurde auf einem Dreifach-Quadrupol-Massenspektrometer (V. G. Quattro) in 50/50/0,1 Wasser/Acetonitril/Ameisensäure durchgeführt.

Proteine

[0143] Cycline und CDKs-Cdk4 und Cyclin-D1, Cdk2 und Cyclin-E und Cdc2 und Cyclin-B wurden in Sf9-Insektenzellen, die mit den geeigneten Baculovirus-Konstrukten infiziert worden waren, co-exprimiert. Die Zellen wurden zwei Tage nach der Infektion durch niedertourige Zentrifugation geerntet, und das Pellet wurde in einer gleichen Menge von 10 mM Hepes, pH 7,4, enthaltend: 10 mM NaCl, 1 mM EDTA und 0,1 mM Phenylmethansulfonylfluorid, 2 mM DTT, lysiert und bei 14000 × g 15 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Aufgetautes Lysat wurde nur einmal verwendet und wurde nie erneut eingefroren. Markiertes Cdk4 und Cyclin-D1 wurden durch Translation in Gegenwart von [³⁵S]-Methionin unter Verwendung eines In-vitro-Kaninchchen-Retikulozyten-Lysat-Translationssets produziert (Promega).

[0144] His-markiertes p21^{WAF1} – Menschliches p21^{WAF1} wurde in E. coli unter Verwendung eines PET-Expressionsvektors exprimiert. Die lösliche p21^{WAF1}-Proteinfraktion wurde unter Verwendung ei-

ner Nickelchelatsäule und unter Berücksichtigung der Anweisungen des Herstellers (Pharmacia) gereinigt. Der eluierte Proteinpeak wurde gegen 25 mM Hepes, pH 7,4 enthaltend: 0,1 mM EDTA, 1 mM Benzamidin, 0,01% Triton-X-100 und 0,1 mM Phenylmethansulfonylfluorid, dialysiert, eingeengt, und auf eine Superose-12-Gel-Filtrationssäule (Pharmacia) aufgetragen, die im oben genannten Puffer äquilibriert wurde. Fraktionen, die p21^{WAF1} enthielten, wurden mittels Western-Blot unter Verwendung des p21^{WAF1}-spezifischen monoklonalen Antikörpers Ab-1 (Oncogene Sciences) nachgewiesen, auf 200 µg/ml eingeengt und bei -70°C gelagert.

[0145] GST-Rb – Ein E.-coli-Expressionskonstrukt, das die Hyperphosphorylierungsdomäne von pRb (Aminosäuren 773-924) enthielt, wurde auf einer Glutathion-Sepharose-Säule gemäß den Anweisungen des Herstellers (Pharmacia) gereinigt.

Peptidfällung von Cdk4 und Cyclin-D1

[0146] Eine 20-Aminosäure-Peptidbibiothek, welche die gesamte Sequenz von p21^{WAF1} abdeckte ([Fig. 1](#)), wurde auf Cdk4/Cyclin-D1-Wechselwirkungs-Peptide gescreent. Peptid (1,5 µg) wurde in 100 µl PBS verdünnt und mit 10 µl gepackten Strepavidin-Agaroseperlen (Sigma) 1 Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert. Ungebundenes Peptid wurde durch extensive Waschen mit PBS entfernt, und die Perlen plus gebundenes Peptid wurden 1 Stunde lang bei 4°C mit Retikulozyt-Lysat, enthaltend entweder Cdk4 oder Cyclin-D1, markiert mit [³⁵S]-Methionin, inkubiert. Die Perlen wurden dreimal mit 1,25 × PBS, enthaltend 0,2% Triton-X-100, gewaschen und in Gegenwart von 0,125 M-Tris-HCl, pH 6,8 enthaltend: 4% (Gew./Vol.) SDS, 20 Vol.-% Glycerin und 200 mM DTT, gekocht. Das gebundene Protein wurde mittels SDS-PAGE analysiert, gefolgt von Autoradiographie und Quantifizierung des ³⁵S-markierten Proteins unter Verwendung eines Bio-Bildgebers und Whole-Band-Analyse-Software (Millipore).

Enzymtests

[0147] Die Phosphorylierung von GST-Rb-Cdk4-Aktivität wurde unter Verwendung des oben beschriebenen Cyclin-D1-Cdk4-haltigen Insektenzellenlysats gemessen. Extrakt (1 µl) wurde zu einem Endreaktionsvolumen von 10 µl, enthaltend: 50 mM Hepes, pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 2,5 mM EGTA, 1 mM DTT, 10 mM β-Glycerophosphat, 1 mM NaF, 10 mM PKI, 50 µM ATP enthaltend [³²P]-ATP (1.000 cpm/pmol) und 0,5 µg (GST-Rb), hinzugefügt. Die Versuche wurden durch die Zugabe des GST-Rb-Substrats gestartet, 10 Minuten lang bei 30°C inkubiert (die Inkorporation von ³²P in GST-Rb war für 15–20 Minuten linear) und durch Hinzufügen von SDS-PAGE-Probeppuffer und 4-minütige Erhitzung auf 95°C zu Ende geführt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE auf 12%-Gelen

analysiert, gefolgt von Autoradiographie und Quantifizierung unter Verwendung eines Bio-Bildgebers.

Peptid-Phosphorylierung

[0148] Die biotinylierten Peptide (1 µg) wurden 30 Minuten lang bei 30°C in einem finalen Volumen von 20 µl, enthaltend: 50 mM Hepes, pH 7,4, 10 mM MgCl₂, 2,5 mM EGTA, 1 mM DTT, 10 mM β-Glycero-phosphat, 1 mM NaF, 10 mM PKI, 50 µM ATP enthaltend [³²P]-ATP (6.000 cpm/pmol) und entweder 1 µl Cyclin-D1-Cdk4-Insektenzellenlysat, 1 µl uninfiziertes Insektenzellenlysat oder 0,02 mU Proteinkinase C plus 0,5 mM CaCl₂, 100 mg/ml Phosphatidylserin und 20 mg/ml Diacylglycerin, inkubiert. Die Reaktionen wurden durch 5-minütige Erhitzung bei 60°C gestoppt, und Streptavidin-Agaroseperlen wurden hinzugefügt (10 µl gepacktes Zellvolumen, gewaschen mit 3 × PBS) und durch Schütteln 30 Minuten lang bei 40°C inkubiert. Die Perlen wurden ausgiebig mit PBS, enthaltend 3 Vol.-% Tween-20, gewaschen, und die Inkorporation der Radioaktivität in die Peptide wurde durch Cerenkov-Zählung bestimmt.

Zellzyklus-Messungen

[0149] Trägergebundene Peptide wurden für die Zufuhr in proliferierende HaCaT-Zellen geschaffen (siehe [Fig. 9](#)). Die Zellen wurden auf 30-mm-Kulturplatten beimpft und zu 50% Konfluenz in Dulbeccos modifiziertem Eagle-Medium (DMEM), ergänzt mit 10 Vol.-% fötalem Kälberserum (FCS), wachsen gelassen. Peptide wurden zu dem Medium hinzugefügt, und die Zellen wurden 24 Stunden lang inkubiert. Während der letzten 30 Minuten der Inkubation wurden die Zellen in Gegenwart von 15 µM BrdU puls-markiert. Die Zellen wurden trypsinisiert, in absolutem Alkohol fixiert und unter Verwendung eines Einzel-Laser-Durchflusszytometers (Becton-Dickinson, FACScan) wie zuvor beschrieben für die FACS-Analyse vorbereitet.

pRb-Phosphorylierung in HaCaT-Zellen

[0150] HaCaT-Zellen wurden auf 30-mm-Kulturplatten bei 25% Konfluenz in DMEM mit 10% FCS beimpft. Das FCS wurde nach 24 Stunden abgezogen, und die Zellen wurden 72 Stunden lang ausgehungert. Am Ende dieser Zeitspanne wurde das Medium mit 10% FCS undträgergebundenen Peptiden ergänzt. Proben wurden über eine Zeitspanne von 24 Stunden entnommen, und die Zellen wurden in RIPA-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, enthaltend 150 mM NaCl, 1,0 Vol.-% NP-40, 0,5% (Gew./Vol.) DOC, 0,1% (Gew./Vol.) SDS, 1 mM PMSF, 0,1 mg/ml Aprotinin und 0,5 mg/ml Leupeptin) 30 Minuten lang bei 4°C lysiert. Die Phosphorylierungsstadien von pRb wurden, wie zuvor beschrieben, durch Western-Blot-Analyse bestimmt (Fahraeus et al. (1996)), mit der Ausnahme, dass der Blot mit einem polyklo-

nalen pRb-Antikörper sondiert wurde (C-15, Santa Cruz).

Resultate

Peptidbindungstest für Cyclin-D1 und Cdk4

[0151] Unter Verwendung einer Reihe von synthetischen Peptiden, welche die gesamte Sequenz von p21^{WAF1} ([Fig. 1](#)) umfassen, untersuchten die Erfinder, ob diese Peptide durch Bildung eines stabilen Komplexes mit entweder Cyclin-D1 oder Cdk4 das Voll-längen-p21^{WAF1}-Protein nachahmen konnten. Falls peptidbindende Mimetika des p21^{WAF1}-Proteins identifiziert werden konnten, würde dies bei der Identifizierung des minimalen Bindungsmotivs des p21^{WAF1}-Proteins helfen, das für die Cyclin-D1-Cdk4-Holoenzym-Inhibierung erforderlich war, und um herauszufinden, ob p21^{WAF1} auf die Cyclin- oder die Kinase-Untereinheit abzielte. Dies würde ebenfalls ein System definieren, um kleine Peptide zum Studium der p21^{WAF1}-Proteinreaktionsmechanismen zu verwenden und um nachahmende Arzneimittel zu kreieren.

[0152] Der Peptidbindungstest umfasste eine Quantifizierung der Menge an ³⁵S-markiertem Cyclin-D1 oder Cdk4, das spezifisch an biotinylierte Peptide band, die auf streptavidinbeschichteten Agaroseperlen gefangen wurden. Die peptidbeschichteten Perlen wurden zu Extrakten hinzugefügt, die entweder ³⁵S-markiertes Cyclin-D1 oder Cdk4 enthielten, das in vitro translatiert wurde, die Perlen wurden ausgiebig gewaschen, um ungebundene Proteine zu entfernen, und das gebundene Cyclin-D1 oder Cdk4 wurde mittels SDS-PAGE, gefolgt von Autoradiographie und Bio-Bildgebung quantifiziert. Dies wird unten stehend als Peptidfällungstest bezeichnet und wurde zuvor bereits verwendet, um evolutionäre Konservierung von p21^{WAF1}-Bindung an PCNA zu demonstrieren (Ball & Lane (1996)).

Ein kleines Peptid, das von den Aminosäuren 46-65 in der N-terminalen Domäne von p21^{WAF1} abstammt, bindet direkt an Cdk4

[0153] Unter Verwendung des Peptidfällungstests band Peptid 4 (von der N-terminalen Domäne von p21^{WAF1}) spezifisch an Cdk4, jedoch nicht an Cyclin-D1 ([Fig. 1](#)). Diese Wechselwirkung ist physiologisch wichtig, da bereits zuvor vorgeschlagen wurde, die CDK-Wechselwirkungsdomäne des p21^{WAF1}-Proteins würde zu der N-terminalen Domäne des Moleküls lokalisieren (Chen et al. (1995); Harper et al. (1995); Luo et al. (1995)). Im Besonderen kompromittieren Deletionen (Nakanishi et al. (1995a)) oder Mutationen (Goubin and Ducommun (1995)) in der Region der Aminosäuren 45-71 die Fähigkeit des Voll-längen-p21^{WAF1}, mit Cdk2 wechselzuwirken. Ob dieser Verlust der p21^{WAF1}-Bindungsfunktion auf (i)

Mutation/Deletion von Resten, die direkt in die CDK-Bindung involviert sind, zurückzuführen ist oder ob (ii) Mutationen/Deletionen Konformationsänderungen in p21^{WAF1} hervorrufen, die eine stabile Bindung an CDK verhindern, wurde noch nicht nachgewiesen. Hier zeigen die Erfinder unmissverständlich, dass die Reste 46-65 direkt in die Bindung von p21^{WAF1} an Cdk4 eingebunden sind und dass sie allein fähig sind, in Abwesenheit von Cyclin-D1 einen stabilen Komplex mit Cdk4 zu bilden. Dies wiederum ist ein direkter Beweis, dass der N-Terminus von p21^{WAF1} eine Kinasen-Bindungsdomäne enthält.

Ein kleines Peptid, das von den Aminosäuren 16-35 im N-Terminus von p21^{WAF1} abstammt, bindet direkt an Cyclin-D1

[0154] Die Erfinder konnten auch eine zweite und unterschiedliche N-terminale Wechselwirkungsstelle auf dem p21^{WAF1}-Protein definieren; in diesem Fall eine Region von p21^{WAF1}, die fähig ist, an Cyclin-D1 zu binden, jedoch nicht an Cdk4 ([Fig. 1](#)). Peptid 2 umfasst die Aminosäuren 16-35 von p21^{WAF1} und liegt in der Minimum-Region, die für die DNA-Syntheseinhibition in vivo erforderlich ist, welche zwischen den Resten 17-71 liegt (Nakanishi et al. (1995a)). Die Resultate der Erfinder könnten einen offensichtlichen Widerspruch erklären, auf den Nakanishi et al. (1995a) gestoßen waren, die herausgefunden hatten, dass N-terminale Mutationen im p21^{WAF1}-Protein, die außerhalb der CDK-Wechselwirkungsdomäne sind, obwohl sie nicht ausreichten, um eine Bindung an die Kinase zu verhindern, jedoch ausreichten, um p21^{WAF1} daran zu hindern, als Wachstumssuppressor zu agieren, wenn dieser in proliferierende Zellen transfiziert wurde. Im Besonderen führen die direkten Peptid-Bindungsdaten ([Fig. 1](#)) zu dem Vorschlag, das N-terminale Motiv im p21^{WAF1}-Protein, das Cyclin-D1-Bindung vermittelt, wäre ein essentieller Schritt im Mechanismus, mit dem das p21^{WAF1}-Protein als Wachstumssuppressor fungiert.

Ein neuartiges Cyclin-D1-Cdk4-Bindungsmotiv befindet sich am C-Terminus des p21^{WAF1}-Proteins

[0155] Die Spezifität des Peptidfällungstests beim Definieren der Domäne des p21^{WAF1}-Proteins, die erforderlich ist, um entweder Cyclin-D1 oder Cdk4 zu binden ([Fig. 1](#)), zeigte, dass die Verwendung von Peptiden, um potentielle Wechselwirkungen zwischen p21^{WAF1} und Cyclin-D1-Komplexen zu studieren, sehr informativ sein würde. Die Erfinder waren jedoch fasziniert, dass Peptide vom C-Terminus des p21^{WAF1}-Proteins (Peptide 10 und 11) sowohl mit Cdk4 als auch mit Cyclin-D1 stabile Komplexe bilden konnten ([Fig. 1](#)), da Peptid 10 mit dem von Warbrick et al. (1995) beschriebenen p21PBP-Peptid äquivalent ist und die Region von p21^{WAF1} repräsentiert, die an das Replikations/Reparaturprotein PCNA bindet. Die Erfinder können die Möglichkeit, dass endogenes

Cyclin oder CDK, das im Retikulozyten-Lysat vorhanden ist, an das markierte menschliche Protein durch Bildung einer Brücke zum Peptid binden könnte, nicht ausschließen. Da jedoch Peptid 2 und Peptid 4 entweder Cyclin-D1 bzw. Cdk4 fallen, erscheint dies unwahrscheinlich.

[0156] Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass p21^{WAF1}-Protein könnte sowohl mit PCNA als auch mit Cyclin-CDK-Komplexen durch dasselbe Bindungsmotiv Wechselwirken. Peptid 11 jedoch bindet sowohl an Cdk4 als auch an Cyclin-D1, jedoch nicht an PCNA ([Fig. 1](#)) (Warbrick et al. (1995); Ball & Lane (1996)); wodurch die PCNA-Bindungsstelle vom Cyclin-CDK-Bindungsmotiv im C-Terminus von p21^{WAF1} abgekoppelt wird.

[0157] In Anbetracht der Tatsache, dass die Erfinder drei verschiedene Motive des p21^{WAF1}-Proteins identifiziert hatten, die spezifisch an Cyclin-D1 und/oder Cdk4 binden, untersuchten die Erfinder nun, ob sie das p21^{WAF1}-Protein durch Inhibierung der Kinaseaktivität nachahmten.

Das Cyclin-D1-Bindungspeptid von der N-terminalen Domäne von p21^{WAF1} und das Cyclin/CDK-Bindungspeptid vom C-Terminus von p21^{WAF1} inhibiert die Aktivität von Cdk4

[0158] Um zu bestimmen, ob eines der p21^{WAF1}-Peptide Cdk4-hemmende Aktivität besitzt, testeten die Erfinder, voneinander unabhängig, ihre Fähigkeit, pRb-Phosphorylierung während Cyclin-D1-Cdk4-Tests in vitro zu verhindern ([Fig. 2](#)). Peptide 2, 8, 10 und 11 inhibierten die Cyclin-D1-Cdk4-Aktivität, wenn sie zu dem Test zu 17 μM hinzugefügt wurden, wohingegen Puffer alleine und die verbleibenden Peptide keine dramatischen Auswirkungen auf die Cdk4-Aktivität hatten. Das Cyclin-D1-Bindungspeptid (Peptid 2) inhibierte die Kinase-Aktivität zu etwa 80%, und die Peptide 10 und 11, die beide Cdk4 und Cyclin-D1 banden, inhibierten die Enzymaktivität in dieser Konzentration vollständig. Es gibt daher eine Korrelation zwischen der Fähigkeit der Peptide, an Cdk4 und/oder Cyclin-D1 zu binden und die Cdk4-Kinase-Aktivität zu inhibieren.

[0159] Diese Korrelation hält jedoch nicht an im Fall des Kinase-Bindungspeptids 4. Dieses Peptid kartiert an die CDK-Wechselwirkungsstelle ([Fig. 8](#); Goubin & Ducommun (1995); Nakanishi et al. (1995a)), und es gab Spekulationen, ein Peptid aus dieser Domäne, das fähig ist, mit CDK wechselzuwirken, würde die Volllängen-p21^{WAF1}-Inhibitionsaktivität nachahmen und so ein Modell zum Design von neuen Molekülen bereitstellen, welches das Voranschreiten des Zellzyklus durch Inhibierung der G1-Cyclin-CDKs zum Stillstand bringen könnte. Trotz der hohen Affinität für Cdk4 zeigte Peptid 4 keine inhibitorische Aktivität, wenn es zu Cyclin-D1-Cdk4-Tests in Konzentratio-

nen von bis zu 35 μM hinzugefügt wurde. Die Daten der Erfinder von sowohl p21^{WAF1}-Peptidbindungsdaten als auch inhibitorischen Eigenschaften zeigen daher zwei neue kleine Domänen des p21^{WAF1}-Proteins als potentielle Kandidaten für niedermolekulare Mimetika; ein N-terminales Motiv aus den Aminosäuren 16-35 (Peptid 2) und ein C-terminales Motiv aus den Aminosäuren 141-160 (Peptid 10).

[0160] Es ist daher möglich, dass Peptid 4 die p21-Bindung blockieren und dessen Aktivität als Inhibitor verhindern könnte. Von Zellen, die mit Peptid 4 behandelt wurden, kann daher erwartet werden, sie würden sogar in Gegenwart von konkurrierenden Signalen, die normalerweise Zellzyklusstillstand oder Apoptose vermitteln, proliferieren. Peptid 4 kann daher verwendet werden, um Zellen durch Zufuhr des Peptids an die Zellen reversibel zu immortalisieren. Das stellt ein weiteres Werkzeug zum Erforschen zellulärer Mechanismen zur Kontrolle des Zellzyklus bereit und kann ebenso nützlich sein, um Zellverlust in Erkrankungen zu bekämpfen, die mit dem Verlust von Zellen assoziiert werden, wie z. B. AIDS oder degenerative Erkrankungen, unter anderem MS, Demenz oder degenerative Muskelerkrankungen, wie z. B. Muskelschwund (MD), einschließlich Duchenne MD.

Das C-terminale p21^{WAF1}-Peptid ist ein stärkerer Inhibitor der Cdk4-Kinase-Aktivität als das N-terminale Cyclin-D1-Bindungspeptid

[0161] Die Erfinder führten detailliertere Studien durch, um den $I_{0,5}$ für die Peptide 2, 8 und 10 zu bestimmen, wobei Peptid 4 als negative Kontrolle verwendet wurde ([Fig. 3](#)). Die Erfinder fanden heraus, dass Peptid 10 (und Peptid 11; Daten nicht dargestellt) ein starker Inhibitor der Cdk4-Aktivität mit einem $I_{0,5}$ von 0,1 μM war, Peptid 2 war ebenso ein guter Inhibitor mit einem $I_{0,5}$ von 2 μM . Peptid 8 erbrachte nur eine geringe Inhibition, und es waren relativ hohe Peptidkonzentrationen notwendig, um eine 50%ige Inhibition zu erreichen. Diese Daten unterstützen die Möglichkeit, Peptid 2 oder Peptid 10 zu verwenden, um die CDK-Inhibierungsaktivität des Volllängen-p21^{WAF1}-Proteins nachzuahmen.

p21^{WAF1}-Protein und inhibitorische Peptide konkurrieren um die gleiche Bindungsstelle auf Cdk4-Kinase

[0162] Um zu bestimmen, ob die Cdk4-inhibitorischen Peptide, 2 und 10, an Stellen auf Cdk4 und Cyclin-D1 agierten, die auch von p21^{WAF1} verwendet wurden, führten die Erfinder Peptidfällungstests in Gegenwart und Abwesenheit von gereinigtem Volllängen-his-p21^{WAF1} durch, um herauszufinden, ob es mit den Peptiden um die Bindung konkurrierte.

[0163] Die Fähigkeit von p21^{WAF1}, die Peptid-2- (A) und Peptid-10-Bindung (B & C) an Cdk4 und/oder Cyclin-D1 zu stören, wurde durch Durchführung des

Peptidfällungstests aus Retikulozyt-Lysaten in Gegenwart von 0, 0,5, 2 μg p21^{WAF1} bestimmt.

[0164] Die Daten deuten darauf hin, dass eine Bindung des p21^{WAF1}-Proteins an Cyclin-D1 und Cdk4 eine Bindung von sowohl Peptid 2 als auch Peptid 10 verhindert. Diese Daten lassen zwei Interpretationen zu, (i) die Peptide könnten um eine Bindung an der gleichen Stelle wie p21^{WAF1} konkurrieren, oder (ii) eine Bindung von entweder p21^{WAF1} oder Peptid könnte eine Konformationsveränderung im Cyclin oder CDK hervorrufen und weitere Bindungen verhindern. Aus diesen Experimenten geht nicht klar hervor, ob die Peptide 2 und 10 an der/den gleichen Stelle(n) agieren. Der Unterschied in den Peptidfällungsdaten zeigt, dass zumindest eine der Stellen einzigartig ist, da Peptid 10 sowohl Cdk4 als auch Cyclin-D1 fallen kann, wohingegen Peptid 2 lediglich Cyclin-D1 fallen kann.

[0165] Daten zur Unterstützung der Hypothese, dass Peptid 10 und p21^{WAF1}-Protein während der Kinase-Inhibition um dieselbe Bindungsstelle konkurrieren, basieren auf der Verwendung eines Peptid-10-Mutanten (der eine Punktmutation enthält, was zu einer Änderung von R-A am Rest 15 des Peptids 10 führt, was mit Rest 155 des Volllängenproteins äquivalent ist), der > 60% seiner inhibitorischen Aktivität (siehe unten) verliert, jedoch seine Bindungsfunktion beibehält.

[0166] Um zu bestimmen, ob die Inhibition von Cdk4 durch p21^{WAF1} durch Hinzufügen eines Peptid-10-Mutanten, den R-zu-A-Mutanten (Rest 15 von Peptid 10), der kein effizienter Inhibitor mehr war, jedoch immer noch partielle Bindungsaktivität aufwies, verringert werden kann, wurden ansteigende Peptidkonzentrationen (1, 5, 17 & 34 μM) in Gegenwart einer feststehenden Konzentration von p21^{WAF1} (50 μM) zu dem Cyclin-D1-Cdk4-GST-Rb-Phosphorylierungstest hinzugefügt.

[0167] Das Experiment zeigte, dass ansteigende Konzentrationen von Mutanten-Peptid-10 fähig waren, die inhibitorische Aktivität von Volllängen-p21^{WAF1} zu blockieren, was darauf hindeutet, dass Peptid 10 an (einer) Stelle(n) bindet, welche die darauf folgende Bindung von p21^{WAF1} blockiert/blockieren und daher durch einen Mechanismus funktioniert, der jenem des Volllängenproteins ähnelt.

Die inhibitorischen Peptide sind nicht Cyclin-D1-Cdk4-Substrate

[0168] Im Gegensatz zum p107-Peptid, das die Fähigkeit von Cdk4, pRb zu phosphorylieren, durch Agieren als ein Alternativsubstrat zu inhibieren scheint (Zhu et al. (1995)), wurde von p21^{WAF1} nicht berichtet, es würde als Substrat für die Cyclin-D1-Cdk4-Komplexe agieren (und die Erfinder be-

stätigen diese Beobachtungen, [Fig. 4](#)). Es ist jedoch möglich, dass die Erfinder durch die Verwendung von p21^{WAF1}-basierten Proteinen anstatt von Volllängenproteinen unbeabsichtigtweise Phosphorylierungsstellen generiert haben, die normalerweise nicht auf der Oberfläche des Proteins exponiert wären. Die Peptide könnten daher als konkurrierende Substrate im Gegensatz zu Inhibitoren katalytischer Aktivität agieren. Sowohl Peptid 2 als auch Peptid 10 enthalten eine Reihe möglicher Phosphorylierungsstellen, und die Erfinder konnten zeigen, dass Peptid 10 ein potenzielles Substrat für eine Reihe an Proteinkinasen ist (Daten nicht dargestellt), unter anderem Proteinkinase C (PKC), die als Kontrollkinase verwendet wurde ([Fig. 4](#)). Tatsächlich waren weder Peptid 2 noch Peptid 10 unter Bedingungen, in denen 2,4 nmol ³²P pro nmol GST-Rb inkorporiert waren, Substrate für Cyclin-D1-Cdk4. Unter denselben Bedingungen war jedoch Peptid 10 ein ausgesprochen gutes Substrat für PKC mit 0,82 nmol ³²P, das pro nmol Peptid inkorporiert war ([Fig. 4](#)). Es gab ein niedriges Ausmaß an Inkorporation in Peptid 2, da das jedoch auch in Tests, in denen Lysat aus uninfizierten Insektenzellen verwendet wurde, vorhanden war, muss dieses auf die geringen Ausmaße endogener Proteinkinase(n) zurückgeführt werden. Es scheint daher so, als wären die Peptidinhibitoren nicht konkurrierende Substrate, sondern als würden sie agieren, um die katalytische Aktivität in einem Mechanismus, der dem von p21^{WAF1} ähnelt, zu blockieren.

Die Peptide sind keine effizienten Inhibitoren der Cyclin-B-Cdc2-Kinase-Aktivität

[0169] Harper et al. (1995) zeigten, dass p21^{WAF1} kein universeller CDK-Inhibitor ist, sondern dass er eine Selektivität für die G1- und S-Phase-Cyclin-CDK-Komplexe aufweist. Als sie die Fähigkeit von p21^{WAF1} verglichen, Cyclin-B-Cdc2, das am G2/M-Übergang wirkt, und Cyclin-D2-Cdk4, das während G1 wirkt, zu inhibieren, fanden sie heraus, dass der $I_{0,5}$ zur Inhibition von Cyclin-B-Cdc2 > 600fach höher war als der $I_{0,5}$ zur Inhibition von Cyclin-D2-Cdk4, das gereinigte rekombinante Proteine verwendete. Die Erfinder sahen sich die Wirkung des Hinzufügens ihrer zwei Cyclin-D1-Cdk4-Inhibitorpeptide zu Cyclin-B-Cdc2- und Cdk2-Cyclin-E-Tests in Konzentrationen von bis zu 20 µM an und fanden heraus, dass weder Peptid 2 noch Peptid 10 eine signifikante Wirkung auf die Cdc2-Cyclin-B-Histon-H1-Kinase-Aktivität hatten. Cdk2-Cyclin-E wurde jedoch durch Peptid 10 inhibiert, was zeigt, dass Peptid 10 andere G₁-Cyclin-Cdk-Komplexe inhibieren kann. Daher scheinen die p21^{WAF1}-basierten Peptidinhibitoren eine Spezifität zu haben, die mit der des Volllängenproteins äquivalent ist.

[0170] Um zu bestimmen, ob die Peptide 2 und 10 Cyclin-B-Cdc2 und Cyclin-E-Cdk2 inhibieren können, wurden Kinaseaktivitätstests unter Verwendung

von Sf9-Zelllysaten durchgeführt, die menschliches Cyclin-B und Cdc2 co-exprimierten. Die Bedingungen waren identisch mit jenen, die in den experimentellen Verfahren für Cyclin-D1-Cdk4 beschrieben werden, mit der Ausnahme, dass Histon-H1 (0,5 µg/Test) als Substrat für Cyclin-B-Cdc2 verwendet wurde. Cyclin-D1-Cdk4, Cyclin-B-Cdc2 und Cyclin-E-Cdk2 wurden in Gegenwart zunehmender Konzentrationen von Peptid 2 (0,25, 3, 10 und 40 µM) und Peptid 10 (0,1, 0,5, 5, 20 µM) getestet.

Das Kinase-Inhibierungsmotiv von Peptid 10 unterscheidet sich von der PCNA-Bindungsstelle

[0171] Die Erfinder haben gezeigt, dass Peptid 10 ein besonders starker Inhibitor der Cyclin-D1-Cdk4-Aktivität ist, mit einem $I_{0,5}$ von 0,1 mM, der 20fach stärker ist als Peptid 2, ein Peptid, das von der Region von p21^{WAF1} abstammt, die zuvor mit Wachstumsstillstand assoziiert wurde (Chen et al. (1995); Nakanishi et al. (1995a)). Die Erfinder haben ebenso gezeigt, dass ein Peptid (Peptid 4), das die CDK-Wechselwirkungsstelle von p21^{WAF1} umfasst (Goubin & Ducommun (1995); Nakanishi et al. (1995a)), obwohl es fähig ist, an Cdk4 zu binden und einen stabilen Komplex zu bilden, keine nachweisbare Aktivität als Cyclin-D1-Cdk4-Inhibitor aufweist. Peptid 10 scheint daher der beste Kandidat für die Entwicklung eines kleinen Peptidmimetikums mit hoher Wirksamkeit zu sein. Von Peptid 10 wurde zuvor bereits nachgewiesen, dass es eine spezifische Hochaffinitäts- und reversible Wechselwirkung mit PCNA bildet (Ball & Lane (1996)), und dieses Peptid reicht aus, um die Funktion von PCNA während der SV40-Replikation partiell zu inhibieren, was 50% Inhibition bei einer Konzentration von etwa 7 mM ergibt (Warbrick et al. (1995)). Die PCNA-Wechselwirkungsdomäne von p21^{WAF1} wurde kartiert, und es stellte sich heraus, dass die wichtigen Reste Aminosäuren 144-151 waren (QTSMTDFY; Warbrick et al. (1995); Ball & Lane (1996)). Obwohl das extreme C-terminale Peptid (Peptid 11) Aminosäurereste aufweist, die für die Bindung an und Inhibition von Cdk4 wichtig sind (siehe [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#)), kann es PCNA nicht binden (Warbrick et al. (1995); Ball & Lane (1996)). Diese Resultate deuten darauf hin, dass das Kinasehemmungs- und PCNA-Bindungsmotiv im C-Terminus von p21^{WAF1} verschieden sind, es schließt jedoch die Möglichkeit nicht aus, dass eine Wechselwirkung zwischen p21^{WAF1} und PCNA oder Cyclin/Kinase einige gemeinsame Aminosäuren benötigen. Daher ist es wichtig, das genaue inhibitorische Motiv im C-Terminus von p21^{WAF1} zu identifizieren und herauszufinden, ob es mit der PCNA-Wechselwirkungsdomäne überlappt oder sich von dieser unterscheidet. Um diese Frage zu untersuchen, haben die Erfinder zwei Ansätze gewählt; sie synthetisierten (i) eine Reihe von Peptiden, die um 4 Aminosäuren in jede Richtung entlang von Peptid 10 (Größenscan; [Fig. 7](#)) verschoben wurden, und (ii) eine

Reihe von Peptiden, die auf Peptid 10 basierten, wo jeder Rest sequentiell zu Alanin mutiert war (Alaninscan; [Fig. 6](#)). Die Fähigkeit der Peptide, in jeder der beiden Serien in vitro die Cdk4-Aktivität zu inhibieren, wurde dann bestimmt. Unter Verwendung des Größenscans fanden die Erfinder heraus, dass die Peptidinhibitierungsaktivität die Aminosäuren 156-160 erforderte, während die Aminosäuren 148-155 entbehrlich waren. Das koppelt das Kinasehemmungsmotiv vom PCNA-Bindungsmotiv ab.

[0172] Mit dem Alaninscan definierten die Erfinder die kritischen Reste zur Inhibierung, indem sie zeigten, dass ein Abschnitt von lediglich 5 Aminosäuren für die Aktivität essentiell war, mit einer einzigen konservativen Punktmutation an einem von zwei hydrophoben Resten, was die hemmende Aktivität von Peptid 10 vollständig eliminierte ([Fig. 6](#)). Die essentiellen Aminosäuren sind RRLIF (Aminosäuren 155-160), wobei die fettgedruckten Buchstaben essentiell für die Aktivität sind und der unterstrichene Rest signifikant zur inhibitorischen Aktivität beiträgt.

[0173] Während des Testens im Peptidfälligungstest behielt die Mutation des ersten R dieses Motivs zu A (aa 155 des Volllängen-p21^{WAF1}) teilweise ihre Fähigkeit, sowohl Cdk4 als auch Cyclin-D1 zu binden, bei, während Mutationen von L oder F zu A die Affinität zu Cdk4 und Cyclin-D1 signifikant verringerten, und Mutationen des zweiten R oder des I zeigten keine Wirkung auf die Bindung (Daten nicht dargestellt). Daraum wurde der R-A-Mutant in Konkurrenztests verwendet. Die Tatsache, dass eine einzige Punktmutation an einem der beiden hydrophoben Reste (dem L- oder F-Rest) die inhibitorische Aktivität vollständig eliminiert, deutete darauf hin, dass die Inhibierung auf eine spezifische Wechselwirkung an hydrophoben Schlüsselresten zurückzuführen war. Die Kartierungsdaten erklären ebenso, warum sowohl Peptid 10 als auch Peptid 11 gute Inhibitoren der Cyclin-D1-Cdk4-Aktivität ([Fig. 2](#)) sind, da beide das inhibitorische Motiv enthalten. Es scheint daher so, dass der inhibitorische Teil des Peptids 10 nicht mit der PCNA-Bindungsstelle überlappen würde, da sie keine Aminosäurereste gemeinsam haben.

Eine einzige Aminosäure-Substitution im Peptid 10 macht es zu einem stärkeren Inhibitor und nähert es somit der spezifischen Aktivität eines Volllängen-p21^{WAF1}-Proteins an

[0174] Während der Durchführung der Alaninscan-Experimente bemerkten die Erfinder, dass eines der Mutantenpeptide (D-A an Position 9 von Peptid 10 oder 149 des Volllängenproteins; [Fig. 6](#)) das Peptid zu einem besseren Inhibitor der Cyclin-D1-Cdk4-Aktivität zu machen schien. Die Erfinder bestimmten den $I_{0,5}$ für dieses Peptid und verglichen ihn mit Peptid 10, gereinigtem Volllängen-his-p21^{WAF1} und einem Peptid, das vom Tumorsuppressionspro-

tein p16 INK4 abstammte, von dem vor kurzem berichtet wurde, es würde die Cyclin-D1-Cdk4-Aktivität in vitro inhibieren und das Fortschreiten des Zellzyklus verhindern (Fahraeus et al. (1996)). Die D-A-Mutation verringert den $I_{0,5}$ von 100 nM auf 46 nM ([Fig. 7](#)). Wenn dies nun mit dem p16INK4-basierten Peptid verglichen wurde, das einen $I_{0,5}$ von 16,3 μM aufweist ([Fig. 7](#)), so haben die Erfinder nun ein Peptid produziert, das etwa 350fach aktiver ist als eine Cdk4-inhibierende Verbindung. Tatsächlich beginnen die Erfinder nun, sich der Stärke von p21^{WAF1} selbst zu nähern, das einen $I_{0,5}$ von 11 nM im Insektenzelllysat-Test aufweist ([Fig. 7](#)). Dieser Wert befindet sich in der gleichen Bandbreite wie der Ki von 40 nM für p21^{WAF1}, der von Harper et al. (1995) für die Inhibition von Cyclin-D1-Cdk4 in Sf9-Zelllysaten erhalten wurde. Im Vergleich zum Volllängenprotein hat das Mutantenpeptid 10 lediglich eine 3,5fach geringere spezifische Aktivität als ein Kinase-Inhibitor in rohen Lysaten. Warum eine Mutation D-A an dieser Position, die sich ein gutes Stück außerhalb der Domäne, die als essentiell für die Aktivität dargestellt wurde, befindet, zu einer Reduktion des $I_{0,5}$ führt, ist nicht bekannt. Es erscheint wahrscheinlich, dass sie die Präsentation des inhibitorischen Motivs umfasst anstatt eine direkte Rolle für diesen Rest in der Inhibition, da es nicht so scheint, dass diese Mutation die Affinität des Peptids für entweder Cdk4 oder Cyclin-D1 erhöhen würde (Daten nicht dargestellt).

[0175] Die Resultate deuten darauf hin, dass Peptid 10 als Modell verwendet werden könnte, um kleine Peptidmimetika von p21^{WAF1} darauf zu basieren, und die Erfinder haben Beweise vorgelegt, dass Veränderungen in der Peptidstruktur oder Präsentation der aktiven Reste zu der Entstehung eines Peptidinhibitors führen können, welcher der Stärke von Volllängen-p21^{WAF1} als Cyclin-D-Cdk4-Inhibitor ähnelt.

Resultate für das C-terminale Peptid (Peptid 10)

Ein Acht-Aminosäurepeptid ist ausreichend, um die Cyclin-D-Cdk4-Aktivität zu inhibieren

[0176] Nachdem Reste identifiziert worden waren, die für die Inhibition von Cyclin-D1-Cdk4 durch Peptid 10 entscheidend erschienen, bestimmten die Erfinder, ob diese Reste für die Inhibition ausreichten oder ob sie im Kontext eines größeren Peptids präsentiert werden mussten. Überraschenderweise behielt das Acht-Aminosäurepeptid, KRRLIFSK, die Fähigkeit bei, die Cyclin-D1-Cdk4-Aktivität vollständig zu inhibieren und die Phosphorylierung von pRb zu verhindern ([Fig. 6](#)). Der $I_{0,5}$ für das trunkierte Peptid war jedoch etwa 1000fach höher als der des Volllängenpeptids ($I_{0,5}$ für das trunkierte Peptid war etwa 100 μM). Das war kein unerwartetes Ergebnis, da andere Studien einen Verlust der Leistungsstärke nach Reduktion der Länge der bioaktiven Peptide gezeigt haben. Es könnte jedoch möglich sein, die inhibitori-

sche Aktivität des Peptids durch Manipulation der nichtessentiellen Reste zu verbessern, wie von Lin et al. (1995) definiert, in einer eleganten Serie an Experimenten mit dem Ziel, das in den Herzvorkammern gebildete Polypeptid zu verringern.

Peptid 10 arbeitet in Zellsystemen

[0177] Die Einführung von p21^{WAF1}-cDNA in menschliche Gehirn-, Lungen- und Kolonkrebszelllinien führt zu einer Suppression des Zellwachstums (El-Deiry et al. (1993)). Zusätzlich steigen während eines strahlungsinduzierten G₁-Stillstands in menschlichen Fibroblasten die p21^{WAF1}-Proteinmengen auf eine p53-abhängige Art und Weise, was zu einer starken Inhibierung der G₁-Cyclin-CDKs sowie zum Scheitern der Zellen, in die S-Phase einzutreten, führt (Dulic et al. (1994); Harper et al. (1995)). Damit das Peptid 10 als eine realistische Matrize für das Design neuer antiproliferativer Arzneimittel fungieren kann, muss es fähig sein, die CKI-Aktivität von p21^{WAF1} als Wachstumssuppressor in einem zellulären Hintergrund nachzuahmen. Die Erfinder haben – wie andere auch – kürzlich gezeigt, dass eine 16-Aminosäuresequenz aus der Homodomäne des Antennapedia-Proteins als Träger für Peptide mit biologischer Aktivität agieren kann, wobei es diese über die Plasmamembran transloziert und es ihnen ermöglicht, mit ihren Targetmolekülen wechselzuwirken (Fahraeus et al (1996); Hall et al. (1996)). Um zu bestimmen, ob Peptid 10 seine biologische Aktivität beibehalten hat, wenn es in Gewebekulturzellen eingeführt wurde, haben die Erfinder es direkt auf das Trägerpeptid synthetisiert und es zu einer Kultur proliferierender asynchroner menschlicher HaCaT-Zellen, die von Keratinozyten abstammen, hinzugefügt. Das gebundene Peptid (genannt Peptid-I; **Fig. 9**) enthielt eine Mutation von M zu A an Position 7, was zu einer Elimination seiner Aktivität als PCNA-Bindungspeptid führt (Warbrick et al. (1995); Ball & Lane (1996)), und hat den Erfindern ermöglicht, PCNA-unabhängige Wirkungen des Peptids auf den normalen Zellzyklus zu studieren.

[0178] Peptid-I wurde zu dem Kulturmedium in einer Konzentration von 25 µM hinzugefügt, die Zellen wurden 24 Stunden später fixiert und dann durch fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS) analysiert. G₁-, S- und G₂-Phasenverteilung von unbehandelten und Peptid-I-behandelten Zellen wurde unter Verwendung von Bromodesoxyuracil (BrdU) getestet. Die Anzahl der Zellen, die in Gegenwart von Peptid-I in die S-Phase eintraten, wurde dramatisch reduziert, und die G₁-Population zeigte einen gleichzeitigen Anstieg. Das deutet darauf hin, dass Peptid-I die Fähigkeit von Vollängen-p21^{WAF1}, durch Induktion eines G₁-Zellzyklus-Stillstands als Wachstumssuppressor zu agieren, nachahmt.

[0179] Um sicherzustellen, ob Peptid-I durch Prä-

vention der Phosphorylierung von pRb auf eine Art, die mit der von p21^{WAF1} analog ist, als Wachstumssuppressor fungierte, verwendeten die Erfinder Serum-Aushungern, um eine synchrone Population von HaCaT-Zellen zu produzieren. Peptid-I wurde zur gleichen Zeit, als diese aus dem Serum-Aushungern freigesetzt wurden, zu den Zellen hinzugefügt, und Proben von behandelten und unbehandelten Zellen wurden über einen Zeitraum von 24 Stunden genommen. Der Phosphorylierungsstatus von pRb wurde durch einen Gel-Retentionstest beobachtet. Als Serum zu den ausgehungerten Zellen hinzugefügt wurde, wurde pRb zwischen 12 und 15 Stunden hyperphosphoryliert, in Gegenwart von Peptid-I blieb pRb jedoch hypophosphoryliert. Daher führt Peptid-I in menschlichen HaCaT-Zellen durch Verhindern der Phosphorylierung von pRb zu einem G₁-Stillstand.

[0180] Die Erfinder verwendeten einen identischen experimentellen Ansatz, um (i) das bioaktive trunkierte Peptid 10 und (ii) ein Kontrollpeptid 10, dem zur CDK-Inhibition essentielle Reste fehlten, in HaCaT-Zellen einzuführen. Die Erfinder fanden heraus, dass Peptid-II wirksam einen G₁-Phasenstillstand förderte und die Phosphorylierung von pRb vollständig verhinderte, wenn es in 50 µM hinzugefügt wurde (**Fig. 9b**). Peptid-III, dem die letzten 4 Aminosäuren von Peptid 10 (LIFS) fehlten, hatte jedoch keine nachweisbare Wirkung auf die Fähigkeit der HaCaT-Zellen, in die S-Phase einzutreten. Es ist interessant, dass das trunkierte Peptid 10, wenn es an ein Trägerpeptid (Peptid-II) gekoppelt ist und in Zellen eingebracht wird, lediglich 2-mal weniger aktiv als Wachstumssuppressor als Peptid-I ist (siehe oben für In-vitro-Daten). Eine Bindung des trunkierten Peptids 10 an das Trägerpeptid kann eine geeigneteren inhibitorische Konformation fördern als der I_{0,5} für trägergebundenes trunkiertes Peptid 10 (Peptid-II ist in vitro etwa 50-mal weniger als jenes des freien Peptids 10 (Daten nicht dargestellt)).

[0181] Peptid 10 wurde zu Rb-negativen Zellen hinzugefügt, und die Resultate unterstützen dessen Nachahmung des Vollängenproteins, d. h. es kann dessen biologische Aktivität als Zellzyklusinhibitor nachahmen. Von Peptid 10 wurde herausgefunden, dass es Zellzyklusarrest in pRb-negativen sowie in pRb-positiven Zellen hervorruft.

[0182] Unter Verwendung von Soas2-Zellen führt die Einführung von Peptid 1 (Peptid 10 gebunden an Penetratin und mutiert, um PCNA-Bindung zu verhindern) zu einer Zunahme der Population der Zellen in der G₁-Phase.

Diskussion

[0183] Synthetische Peptide oder Peptidmimetika erweisen sich beim Studium der biochemischen Regulierung von Enzymen und Proteinen als nützlich,

ebenso stellen sie Modelle zum Design neuer antiproliferativer Mittel bereit, die auf die amplifizierten enzymatischen Stoffwechselwege abzielen oder auf Proteine, die in menschlichen Tumoren aktiviert sind (Powis (1992); Gibbs & Oliff (1994)). Peptide, von denen ebenfalls gezeigt wurde, dass sie wirksam auf Komponenten des Zellzyklusmechanismus abzielen, umfassen: FTI, die Farnesyl-Protein-Transferase inhibieren und so die Aktivierung von Ras verhindern (Gibbs et al. (1994)); Ras-Effektor-Domänenpeptide, die dessen biologische Funktion inhibieren können (Moodie & Wolfman (1994); Rodriguez-Viciana et al. (1994)); Polypeptide, die SH2/SH3-Domänen in sich tragen, die theoretisch das Wachstum von Tumoren mit aktivierten Tyrosin-Kinasen inhibieren sollten (Pawson & Schlessinger (1993); Yu et al. (1994)), und von p16INK4 abstammende Peptide, welche die Cyclin-D-CDK-Komplexaktivität inhibieren und dadurch den pRb-abhängigen Zellzyklusstillstand aktivieren (Fahraeus et al. (1996)).

[0184] Die Inaktivierung des Tumorsuppressionsproteins p53 ist ein häufiges Ereignis bei der Entwicklung menschlicher Neoplasie (Hollstein et al. (1991)). Das p53-Protein ist ein Schlüsselakteur in einem induzierbaren Zellzyklus-Checkpoint-Stoffwechselweg, der als Antwort auf DNA-Schäden und Nucleotidpoolstörungen aktiviert wird (Lane (1992); Agarwal et al. (1995)). Die Reaktivierung dieses Stoffwechselwegs könnte daher einen Weg zur Entdeckung neuer antiproliferativer Arzneimittel bereitstellen. Eine Reihe an Mechanismen kann zur funktionalen Inaktivierung des p53-Stoffwechselwegs führen, unter anderem die Inaktivierung von stromab gelegenen Effektormolekülen von p53, wie z. B. des Cyclin-Kinase-Inhibitors p21WAF1 (Deng et al. (1995); Waldman et al. (1995)). Jüngste Entwicklungen haben gezeigt, dass eine Reaktivierung des p53-Stoffwechselwegs in einigen menschlichen Tumoren durch eine Aktivierung der biochemischen Funktion des endogenen mutierten p53-Proteins möglich sein kann (Halazonetis & Kandil (1993); Hupp et al. (1993)), möglicherweise unter Verwendung kleiner Peptide als Leitverbindungen zum Arzneimitteldesign (Hupp et al. (1995)) oder durch Wiedereinführung des Wildtyp-p53-Gens mittels Adenovirusvektoren (Eastham et al. (1995)). Im Allgemeinen ist jedoch die pharmakologische Wiederherstellung der biochemischen Funktion eines Proteins, das seine normale Aktivität durch Mutation seiner Aminosäuresequenz verloren hat, schwieriger als die Inhibierung einer biochemischen Funktion (Gibbs & Oliff (1994)). Daher kann es sich als produktiver erweisen, alternative Ansätze zur Wiederherstellung der Aktivität des p53-Stoffwechselwegs zu wählen, wie z. B. das Nachahmen der inhibitorischen Aktivität des stromab gelegenen Effektormoleküls p21WAF1, das einen Wachstumsstillstand alleine primär durch seine Wechselwirkung mit den G1-Cyclin-CDKs vermitteln kann (El-Deiry et al. (1993); Eastham et al. (1995); Harper et al. (1995)).

[0185] Die Bestimmung der minimalen Domäne von p21^{WAF1}, welche die CDK-Funktion inhibieren kann, und das Herausfinden, ob eine solche Domäne in Isolation mit hoher Wirksamkeit funktionieren kann, sind zwei wichtige Ziele, die erreicht werden müssen, um zu bestimmen, ob p21^{WAF1} sich als realistische Matrize zur Verwendung in der antiproliferativen Arzneimitteldesignforschung erweist. Vor den Studien der Erfinder war die minimale Sequenz von p21^{WAF1}, die in vitro die CDK-Funktion inhibiert hatte, die N-terminalen Domäne (Reste 1-75) (Luo et al. (1995)). Während von Peptiden, die von dieser N-terminalen Domäne abstammten, erst kürzlich gezeigt wurde, dass sie die Fähigkeit von p21^{WAF1}, die Cyclin-E-Cdk2-Komplexaktivität zu inhibieren, antagonisierten, was darauf hindeutet, dass diese Domäne mit der Kinase wechselwirkt (Chen et al. (1996)), wurden bis jetzt keine Daten über die direkte Wechselwirkung kleiner Peptide mit entweder Cyclin oder CDK vorgelegt. Zusätzlich gab es keine Beweise, die darauf hindeuteten, ein kleines, von p21^{WAF1} abstammendes Peptid wäre tatsächlich als ein CDK-Inhibitor biologisch aktiv. Da die Cyclin-D1-Cdk4-Komplexe und die verwandten Isoformen essentiell für das Durchlaufen der G1-Phase sind, haben die Erfinder eine Reihe kleiner synthetischer Peptide verwendet, die auf der Sequenz von p21^{WAF1} basieren, um (i) zu bestimmen, ob es Cdk4-inhibitorische Peptidmimetika gibt und ob diese von großer Wirksamkeit sind, und (ii) den Mechanismus zu sondieren, mit dem das p21^{WAF1}-Protein die Cyclin-D1-Cdk4-Aktivität inhibiert.

Ein Modell zur Inhibierung von Cyclin-D1-Cdk4 durch p21^{WAF1}

[0186] Zwei verschiedene Peptide von der N-terminalen Domäne von p21^{WAF1} wechselwirkten entweder mit Cdk4 oder mit Cyclin-D1, um stabile Komplexe zu bilden. Ein Peptid band an Cdk4, inhibierte jedoch dessen Aktivität nicht, während das zweite spezifisch an Cyclin-D1 band und eine starke inhibitorische Wirkung auf die Cyclin-D1-Cdk4-Aktivität hatte. Das Cdk4-Bindungspeptid 4 (Reste 46-65) korrespondierte mit einer mutmaßlichen Cdk2-Bindungsdomäne von p21^{WAF1}, die zuvor unter Verwendung von p21^{WAF1}-Deletionskonstrukten (Nakanishi et al. (1995a) und Alaninmutationsanalyse definiert wurde (Goubin & Gucommun (1995)). Die Erfinder haben festgestellt, dass diese Region von p21^{WAF1} tatsächlich direkt in die CDK-Bindung involviert ist, jedoch keine Cdk4-inhibitorische Aktivität aufweist ([Fig. 2](#) und [Fig. 3](#)). Diese Daten erklären, warum bestimmte N-terminal deletierte p21^{WAF1}-Konstrukte, die noch die CDK-Bindungsstelle enthalten, nicht fähig sind, das Zellwachstum wirksam zu inhibieren (Nakanishi et al. (1995a)).

[0187] Das zweite N-terminalen Peptid, das an Cyclin-D1 band, inhibierte die Cyclin-D1-Cdk4-Aktivität

durch einen neuen Mechanismus stark (siehe unten). Der Mechanismus zur p21^{WAF1}-Inhibierung der Cyclin-CDK-Komplexe ist erst wenig erforscht, da es nicht klar war, ob das p21^{WAF1}-Protein durch Cyclin- und/oder Kinase-Untereinheiten-Bindung inhibiert. Cdk2 bindet in Abwesenheit von Cyclin sehr schwach an p21^{WAF1}, die Affinität der G1-CDKs für p21^{WAF1} nahm stark zu, wenn das CDK mit einem Cyclin assoziiert wurde (Harper et al. (1995)), was darauf hindeutet, dass Cycline eine wichtige Rolle in der p21^{WAF1}-Inhibierung der CDK-Aktivität spielen. Ob jedoch ein CKI, wie z. B. p21^{WAF1} und p27KIP1, direkt mit Cyclin Wechselwirken kann, ist umstritten (Toyoshima & Hunter (1994); Harper et al. (1995)). Eine kürzlich durchgeführte Studie deutete jedoch darauf hin, dass p21^{WAF1} mit einer Reihe an Cyclinen in Abwesenheit von CDK direkt Wechselwirken kann (Fotedar et al. (1996)). Die Erfinder zeigen hier, dass ein kleines Peptid, das aus den Resten 16-35 zusammengesetzt ist (Peptid 2), einen stabilen Komplex mit Cyclin-D1 bildet und dass dieses Peptid alleine ein starker Inhibitor der Cdk4-Aktivität ist, mit einem I_{0,5} von 2 mM. Dieses Peptid fällt in die Wachstumssuppressionsregion (Reste 17-71), die von Nakanishi et al. (1995a) beschrieben wurde. Das ist das erste Mal, dass eine mutmaßliche Cyclinbindungsstelle auf p21^{WAF1} identifiziert wurde und dass von einem kleinen synthetischen Peptid, das diese Domäne repräsentiert, gezeigt wurde, dass es ausreicht, das Vollängen-p21^{WAF1}-Protein als CDK-Inhibitor nachzuahmen.

[0188] Die Tatsache, dass die Cyclin-D1-Cdk4-Aktivität allein durch Wechselwirkung mit der Cyclin-Untereinheit inhibiert werden kann, deutet darauf hin, dass entweder (i) Konformationsveränderungen in Cyclin-D1 zur Inhibierung der katalytischen Cdk4-Aktivität führen können, (ii) Peptid 2 die Wechselwirkung von Cyclin-D1 mit Cdk4 stört oder dass (iii) Peptid 2 die Wechselwirkung von Cyclin-D1-Cdk4 mit seinem Substrat pRb stört.

[0189] Die Aussichten in Bezug auf das Design niedermolekularer Mimetika von p21^{WAF1} sind lebensfähiger in Anbetracht der Tatsache, dass das Cyclin-D1-Bindungspeptid alleine die Kinasefunktion inhibieren kann, was darauf hindeutet, dass das vorherige Vorhandensein eines p21^{WAF1}-Proteins, das an die Kinase-Untereinheit bindet, für die Inhibierung der Kinasefunktion nicht notwendig ist. Zusätzlich sind die Aminosäurereste, die zwischen p21^{WAF1} und seinem engen Verwandten p27KIP1 (Polyak et al. (1994); Toyoshima & Hunter (1994)) konserviert sind, in der N-terminalen Domäne zusammengedrängt, wobei die Regionen, die den Peptiden 2 (65% identisch) und Peptid 4 (50% identisch) entsprechen, die Mehrheit der konservierten Aminosäuren enthalten. Das deutet darauf hin, dass die Inhibierung der Cdk4-Aktivität durch Wechselwirkung mit der Cyclin-D-Untereinheit ein gemeinsamer Mechanismus

sein kann, der sowohl von p21^{WAF1} als auch von p27KIP1 verwendet wird.

Eine neue C-terminale p21^{WAF1}-Cyclin-D1-Cdk4-Inhibition-Domäne

[0190] Während der Studien der Erfinder fanden sie ebenfalls heraus, dass ein Peptid (Peptid 10) aus der C-terminalen Domäne von p21^{WAF1} in vitro ein starker Inhibitor der Cyclin-D1-Cdk4-Aktivität war. Das inhibitorische Motiv wurde identifiziert und unterschied sich von der PCNA-Wechselwirkungsstelle, die sich ebenso in der C-terminalen Domäne von p21^{WAF1} befindet (Chen et al. (1995); Luo et al. (1995); Warbrick et al. (1995); Ball & Lane (1996)). Die Resultate der Erfinder stehen im Gegensatz zu vorhergehenden Studien, die herausfanden, dass die Cyclin-Cdk2-inhibitorische Aktivität allein auf die N-terminale Domäne von p21^{WAF1} beschränkt ist, wenn jede Hälfte separat exprimiert wird (Chen et al. (1995); Luo et al. (1995)). Die Gründe für diese Diskrepanz können folgende inkludieren: (i) die Verwendung von C-terminal his-markiertem p21^{WAF1} in Expressionsvektoren zur Reinigung von p21^{WAF1}-Konstrukten (Luo et al. (1995)), welche die lokale Struktur am C-Terminus von p21^{WAF1} beeinflusst haben könnten; (ii) die Transfektion von Konstrukten, die nur die C-terminalen Hälften von p21^{WAF1} enthalten (Chen et al. (1995); Luo et al. (1995)), was das Falten in die korrekte native Konformation unter Ausschluß der Identifizierung der neuen inhibitorischen Domäne schwierig machen kann; (iii) durch Verwendung von Peptiden anstatt der C-terminalen Konstrukte oder des Vollängen-p21^{WAF1}-Proteins könnten die Erfinder Stellen enthüllt haben, die in nativem Vollängen-p21^{WAF1}-Protein dem Lösungsmittel nicht gezeigt worden wären; (iv) es ist möglich, dass es geringfügige Unterschiede in dem/den von p21^{WAF1} verwendeten Mechanismus/Mechanismen zur Inhibierung der Cyclin-Cdk2-Komplexe und von Cyclin-D1-Cdk4 gibt. Ob das C-terminale inhibitorische Motiv eine neue physiologisch relevante Regulationsstelle auf p21^{WAF1} definiert, wird im Moment behandelt. Die Leistungsstärke von Peptid 10 jedoch (I_{0,5} = 0,1 mM, nur 10-mal niedriger als das Vollängen-p21^{WAF1}-Protein in diesen Tests) und dessen Fähigkeit, Cyclin-D1-Cdk4 vollständig zu inhibieren, deutet für die Erfinder darauf hin, dass es sich lohnt, weitere Studien dieser Region des Vollängen-p21^{WAF1}-Proteins zu verfolgen.

[0191] Peptid 10 repräsentiert eine potentiell spannende Spur für das Arzneimitteldesign, da es bei weitem der stärkste Peptidinhibitor für CDK-Aktivität ist, der bis zum jetzigen Zeitpunkt entdeckt wurde, da es > 150fach besser ist als das erst vor kurzem identifizierte Peptidmimetikum von p16INK4 (Fahraeus et al. (1996)) und 20fach besser als das N-terminale inhibierende, von p21^{WAF1} abstammende Peptid, das die Erfinder beschrieben haben. Die Tatsache, dass

die Reste, die für die inhibitorische Aktivität wichtig sind, auf einen Abschnitt von lediglich fünf Aminosäuren begrenzt sind, deutet darauf hin, dass ein Kontakt in einem einzigen Grenzbereich ausreicht, um einen sehr starken Inhibitor der Cyclin-D1-Cdk4-Aktivität zu produzieren, wobei daraus eine realistische Matrize für das Design kleiner Moleküle wird, welche die p21^{WAF1}-Aktivität nachahmen.

[0192] Die Tatsache, dass Peptid 10 die inhibitorische Aktivität beibehält, wenn es auf lediglich acht Aminosäuren (KRRLIFSK) reduziert wird, verstärkt den Anreiz, es als Matrize für das rationale Arzneimitteldesign zu verwenden. Im Allgemeinen sind Protein-Protein-Grenzflächen relativ groß und basieren auf der Beteiligung von zwischen 10-30 Kontaktseitenketten auf jeder Grenzfläche, wobei jede Kontaktregion oftmals aus Resten zusammengesetzt ist, die über die ganze primäre Aminosäuresequenz verstreut sind (Davies et al. (1990); de Vos et al. (1992)). Es gibt jedoch Beweise dafür, dass in einigen Fällen lediglich eine kleine Untermenge dieser Seitenketten kontaktiert werden muss, damit eine effiziente Bindung stattfindet (Kelly & O'Connel (1993); Cunningham & Wells (1994); Clackson & Wells (1995)). Die Entdeckung, dass ein einziges Acht-Aminosäurepeptid alleine ausreicht, um die Aktivität eines entscheidenden G₁-Cyclin-CDK zu inhibieren, wodurch die pRb-Phosphorylierung verhindert wird und ein G₁-Zellzyklusstillstand in Gewebekulturzellsystemen produziert wird, deutet darauf hin, dass eine Wechselwirkung an lediglich einer kleinen Untermenge der Kontaktseitenketten für eine starke Inhibition der Cyclin-D1-Cdk4-Aktivität an der G1-S-Phasen-Grenze notwendig ist. Das macht Cyclin-D1-Cdk4 zu einem realistischen und spannenden Ziel für das Design kleiner synthetischer Verbindungen, die als antiproliferative Mittel wirken können.

Literaturverzeichnis

[0193] Alle Literaturverweise, egal an welcher Stelle in diesem Dokument sie angegeben werden, sind hierin durch Verweis aufgenommen.

Agarwal, et al. (1995). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 92: 8493-8497.
 Baldin, et al. (1993). Genes Dev., 7: 812-821.
 Ball, K. L. and Lane, D. P. (1996). Biochem., 237: 854-861.
 Buckbinder, et al. (1995). Nature, 377: 646-649.
 Chen, et al. (1996). Oncogene, 12: 595-607.
 Chen, et al. (1995). Nature, 374: 386-388.
 Clackson, T. and Wells J. A. (1995). Science, 267: 383-386.
 Clarke, et al. (1993). Nature, 362: 849-852.
 Cunningham, B. C. and Wells, J. A. (1994). J. Mol. Biol., 234: 554-563.
 Davies, et al. (1990). Rev. Biochem., 59: 439-473.
 Deng, et al. (1995). Cell, 82: 675-684.

de Vos, et al. (1992). Science, 255: 306-312.
 Dulic, et al. (1994). Cell, 76: 1013-1023.
 Eastham, et al. (1995). Cancer Res., 55: 5151-5155.
 El-Deiry, et al. (1993). Cell, 75: 817-825.
 Fahraeus, et al. (1996). Curr. Biol., 6: 84-91.
 Flores-Rozas, et al. (1994). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 91: 8655-8659.
 Gibbs, J. B. and Oliff, A. (1994). Cell, 79: 193-198.
 Gibbs, et al. (1994). Cell, 77: 175-178.
 Goubin, F. and Ducommun, B. (1995). Oncogene, 10: 2281-2287.
 Gu, et al. (1993). Nature, 371: 257-261.
 Halazonetis, T. D. and Kandil, A. N. (1993). EMBO J., 12: 5057-5064.
 Hall, et al. (1996). Curr. Biol., 6: 580-587.
 Harper, et al. (1993). Cell, 75: 805-816.
 Harper, et al. Tsai, L-H., Zhang, P., Dobrowolski, C. B., Connell-Crowley, et al. (1995). Cell, 6: 387-400.
 Hollstein, et al. (1991). Science, 253: 49-53.
 Hupp, et al. (1993). Nucl. Acids Res., 21: 3167-3174.
 Hupp, et al. (1995). Cell, 83: 337-345.
 Kastan, et al. (1991). Cancer Res., 51: 6304-6311.
 Kastan, et al. (1992). Cell, 71: 587-597.
 Kearsey, et al. (1995). Science, 270: 1004-1005.
 Kelley, R. F. and O'Connell, M. P. (1993). Biochemistry, 32: 6828-6835.
 Lane, D. P. (1992). Nature, 358: 15-16.
 Lowe, et al. (1993). Nature, 362: 847-849.
 Luo, et al. (1995). Nature, 375: 159-161.
 Lu, X. and Lane, D. P. (1993). Cell, 75: 765-778.
 Merritt, et al. (1994). Cancer Res., 54: 614-617.
 Miyashita, T. and Reed, J. C. (1995). Cell, 80: 293-299.
 Momand, et al. (1992). Cell, 69: 1237-1245.
 Moodie, S. A. and Wolfman, A. (1994). Trends Genet., 10: 44-48.
 Nakanishi, et al. (1995a). EMBO J., 14: 555-563.
 Nakanishi, et al. (1995b). J. Biol. Chem., 270: 17060-17063.
 Pawson, T. and Schlessinger, J. (1993). Current Biology, 3: 434-432.
 Picksley, et al. (1994). Oncogene, 9: 2523-2529.
 Pietenpol, et al. (1994). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 91: 1998-2002.
 Pines, J. (1995). Nature, 376: 294-295.
 Polyak, et al. (1994). Cell, 78: 59-66.
 Powis, G. (1992). Trends Pharmacol. Sci., 12: 188-194.
 Rodriguez-Viciano, et al. (1994). Nature, 370: 527-532.
 Sherr, C. (1994). Cell., 79: 551-555.
 Smythe, et al. (1988). EMBO J., 7: 2681-2686.
 Toyoshima, H. and Hunter, T. (1994). Cell, 78: 67-74.
 Waldman, et al. (1995). Cancer Research, 55: 5187-5190.
 Warbrick, et al. (1995). Curr. Biol., 5: 275-282.
 Waga, et al. (1994). Nature, 369: 574-578.
 Yu, et al. (1994). Cell, 76: 933-945.
 Xiong, et al. (1993). Nature, 366: 701-704.
 Zhu, et al. (1995). Genes & Development, 9:

1740-1752.

Patentansprüche

1. Testverfahren zur Identifikation einer Verbindung mit der Fähigkeit, Wechselwirkung oder Bindung zwischen p21 und Cyclin D1 und/oder cdk 4 zu modulieren, worin das Verfahren Folgendes umfasst:

(a) das Kontaktieren von:

(i) einer Substanz, die ein Peptidfragment von p21 ist, das aus einer Aminosäuresequenz besteht, die ausgewählt ist aus:

RERWNFDFVTETPLEGDFAW (Peptid 4)

KACRRLFGPVDSEQLSRDCD (Peptid 2)

KxxRRyFzP (worin x jede beliebige Aminosäure sein kann, y und z hydrophob sein können und jeder der unterstrichenen Reste fehlen oder unterschiedlich sein kann)

KRRQTSMTDFYHSKRRLIFS (Peptid 10)

KRRQTSATDFYHSKRRLIFS

KRRQTSMTAFYHSKRRLIFS

TSMTDFYHSKRRLIFSKRKP (Peptid 11)

KRRLIFSK oder

xyLzF (worin y und z beliebige Aminosäuren sind und x vorzugsweise R ist),

oder einem solchen Fragment, gebunden an einen Bindungspartner oder fusioniert an eine Nicht-p21-Sequenz; und

(ii) einer Substanz, die Cyclin D1 und/oder cdk4 umfasst, oder einem Derivat oder Analogon davon, wobei das Derivat Cyclin-D1- und/oder cdk4-Aktivität beibehält, und einer Testverbindung unter Bedingungen, wobei diese Substanzen in Abwesenheit der Testverbindung, die ein Inhibitor von Wechselwirkung oder Bindung der Substanzen ist, Wechselwirken oder sich aneinander binden; und

(b) das Bestimmen von Wechselwirkung oder Bindung zwischen den Substanzen.

2. Testverfahren nach Anspruch 1, worin das Fragment von p21 aus der Aminosäuresequenz von Peptid 4 besteht.

3. Testverfahren nach Anspruch 1, worin das Fragment von p21 aus der Aminosäuresequenz KxxRRyFzP besteht.

4. Testverfahren nach Anspruch 1, worin das Fragment von p21 aus der Aminosäuresequenz von Peptid 2 besteht.

5. Testverfahren nach Anspruch 1, worin das Fragment von p21 aus der Aminosäuresequenz xyLzF besteht.

6. Testverfahren nach Anspruch 1, worin das Fragment von p21 aus der Aminosäuresequenz von Peptid 10 besteht.

7. Testverfahren nach Anspruch 1, worin das

Fragment von p21 aus der Aminosäuresequenz KRRLIFSK besteht.

8. Testverfahren nach Anspruch 7, worin das Fragment von p21 aus der Aminosäuresequenz von Peptid 11 besteht.

9. Testverfahren zur Identifikation einer Verbindung mit der Fähigkeit, Wechselwirkung oder Bindung zwischen p21 und Cyclin. D1 und/oder cdk 4 zu modulieren, worin das Verfahren Folgendes umfasst:

(a) das Kontaktieren von:

(i) einer Substanz, die ein Peptidfragment aus 40 oder weniger Aminosäuren von p21 ist, oder einem Derivat eines solchen Fragments, worin das Fragment oder Derivat eine Aminosäuresequenz:

KxxRRyFzP (worin x jede beliebige Aminosäure sein kann, y und z hydrophob sein können und jeder der unterstrichenen Reste fehlen oder unterschiedlich sein kann)

umfasst, wobei das Derivat die Eigenschaft aufweist, sich an Cyclin D1 und/oder cdk4 zu binden oder damit wechselzuwirken, oder einem solchen Fragment oder Derivat, gebunden an einen Bindungspartner oder fusioniert an eine Nicht-p21-Sequenz; und

(ii) einer Substanz, die Cyclin D1 und/oder cdk4 umfasst, oder einem Derivat oder Analogon davon, wobei das Derivat Cyclin-D1- und/oder cdk4-Aktivität beibehält, und einer Testverbindung unter Bedingungen, wobei diese Substanzen in Abwesenheit der Testverbindung, die ein Inhibitor von Wechselwirkung oder Bindung der Substanzen ist, Wechselwirken oder sich aneinander binden; und

(b) das Bestimmen von Wechselwirkung oder Bindung zwischen den Substanzen.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9, worin eine Verbindung zusätzlich auf die Fähigkeit getestet wird, eine p21-vermittelte Wirkung auf cdk4-Aktivität zu modulieren.

11. Verfahren nach Anspruch 10, worin die cdk4-Aktivität Rb-Phosphorylierung umfasst.

12. Verfahren nach Anspruch 10, worin die Induktion von G1-Zellzyklusstillstand getestet wird.

13. Verwendung beim Screenen auf Verbindungen, die in der Lage sind, Wechselwirkung oder Bindung zwischen p21 und Cyclin D1 und/oder cdk4 zu modulieren, einer Substanz, die ein Peptidfragment von p21 ist, das aus einer Aminosäuresequenz besteht, die ausgewählt ist aus:

RERWNFDFVTETPLEGDFAW (Peptid 4)

KACRRLFGPVDSEQLSRDCD (Peptid 2)

KxxRRyFzP (worin x jede beliebige Aminosäure sein kann, y und z hydrophob sein können und jeder der unterstrichenen Reste fehlen oder unterschiedlich sein kann)

KRRQTSMTDFYHSKRRLIFS (Peptid 10)

KRRQTSATDFYHSKRRLIFS
 KRRQTSMTAFYHSKRRLIFS
 TSMTDFYHSKRRLIFSKRKP (Peptid 11)
 KRRLIFSK oder
 xyLzF (worin y und z beliebige Aminosäuren sind und x vorzugsweise R ist),
 oder eines solchen Fragments, gebunden an einen Bindungspartner oder fusioniert an eine Nicht-p21-Sequenz.

14. Verwendung beim Screenen auf Verbindungen, die in der Lage sind, Wechselwirkung oder Bindung zwischen p21 und Cyclin D1 und/oder cdk4 zu modulieren, einer Substanz, die ein Peptidfragment aus 40 oder weniger Aminosäuren von p21 ist, oder eines Derivats eines solchen Fragments, wobei das Fragment oder Derivat eine Aminosäuresequenz KxxRRyFzP (worin x jede beliebige Aminosäure sein kann, y und z hydrophob sein können und jeder der unterstrichenen Reste fehlen oder unterschiedlich sein kann) umfasst, wobei das Derivat die Eigenschaft aufweist, sich an Cyclin D1 und/oder cdk4 zu binden oder damit wechselzuwirken, oder eines solchen Fragments oder Derivats, gebunden an einen Bindungspartner oder fusioniert an eine Nicht-p21-Sequenz.

15. Verwendung beim Screenen auf Verbindungen, die in der Lage sind, eine p21-vermittelte Wirkung auf cdk4-Aktivität zu modulieren, einer Substanz, die ein Peptidfragment von p21 ist, das aus einer Aminosäuresequenz besteht, die ausgewählt ist aus:

RERWNFDFVTETPLEGDFAW (Peptid 4)
 KACRRLFGPVDSEQLSRDCD (Peptid 2)
 KxxRRyFzP (worin x jede beliebige Aminosäure sein kann, y und z hydrophob sein können und jeder der unterstrichenen Reste fehlen oder unterschiedlich sein kann)
 KRRQTSMTDFYHSKRRLIFS (Peptid 10)
 KRRQTSATDFYHSKRRLIFS
 TSMTDFYHSKRRLIFSKRKP (Peptid 11)
 KRRLIFSK oder
 xyLzF (worin y und z beliebige Aminosäuren sind und x vorzugsweise R ist),
 oder eines solchen Fragments, gebunden an einen Bindungspartner oder fusioniert an eine Nicht-p21-Sequenz.

16. Verwendung beim Screenen auf Verbindungen, die in der Lage sind, eine p21-vermittelte Wirkung auf cdk4-Aktivität zu modulieren, einer Substanz, die ein Peptidfragment aus 40 oder weniger Aminosäuren von p21 ist, oder eines Derivats eines solchen Fragments, wobei das Fragment oder Derivat eine Aminosäuresequenz KxxRRyFzP (worin x jede beliebige Aminosäure sein kann, y und z hydrophob sein können und jeder der unterstrichenen Reste fehlen oder unterschiedlich sein kann)

umfasst, wobei das Derivat die Eigenschaft aufweist, sich an Cyclin D1 und/oder cdk4 zu binden oder damit wechselzuwirken, oder eines solchen Fragments oder Derivats, gebunden an einen Bindungspartner oder fusioniert an eine Nicht-p21-Sequenz.

17. Verwendung nach Anspruch 15 oder Anspruch 16, worin die cdk4-Aktivität Rb-Phosphorylierung umfasst.

18. Verwendung nach Anspruch 13, worin auf die Induktion von G1-Zellzyklusstillstand getestet wird.

19. Verwendung nach Anspruch 13 oder Anspruch 15, worin das p21-Fragment aus der Aminosäuresequenz von Peptid 4 besteht.

20. Verwendung nach Anspruch 13 oder Anspruch 15, worin das p21-Fragment aus der Aminosäuresequenz KxxRRyFzP besteht.

21. Verwendung nach Anspruch 13 oder Anspruch 15, worin das p21-Fragment aus der Aminosäuresequenz von Peptid 2 besteht.

22. Verwendung nach Anspruch 13 oder Anspruch 15, worin das p21-Fragment aus der Aminosäuresequenz xyLzF besteht.

23. Verwendung nach Anspruch 13 oder Anspruch 15, worin das p21-Fragment aus der Aminosäuresequenz von Peptid 10 besteht.

24. Verwendung nach Anspruch 13 oder Anspruch 15, worin das p21-Fragment aus der Aminosäuresequenz KRRLIFSK besteht.

25. Verwendung nach Anspruch 13 oder Anspruch 15, worin das p21-Fragment aus Aminosäuresequenz von Peptid 11 besteht.

26. Verwendung einer Substanz, die ein Peptid mit der Sequenz

KRRQTSATDFYHSKRRLIFS
 KRRQTSMTAFYHSKRRLIFS
 TSMTDFYHSKRRLIFSKRKP (Peptid 11) oder
 KRRLIFSK

oder ein Fragment davon aus zumindest 5 Aminosäuren ist; oder eines Peptidfragments von p21, das aus einer Aminosäuresequenz besteht, die ausgewählt ist aus:

RERWNFDFVTETPLEGDFAW (Peptid 4)
 KACRRLFGPVDSEQLSRDCD (Peptid 2)
 KxxRRyFzP (worin x jede beliebige Aminosäure sein kann, y und z hydrophob sein können und jeder der unterstrichenen Reste fehlen oder unterschiedlich sein kann),
 oder eines solchen Fragments oder Derivats, gebunden an einen Bindungspartner oder fusioniert an eine Nicht-p21-Sequenz, zur Herstellung eines Medika-

ments zur Behandlung einer Hyperproliferationserkrankung.

27. Verwendung nach Anspruch 26, worin das Fragment oder Derivat ein Peptidfragment mit einer Sequenz, die
KRRQTSATDFYHSKRRLIFS
KRRQTSMTAFYHSKRRLIFS
TSMTDFYHSKRRLIFSKRKp (Peptid 11) oder
KRRLIFSK ist,
umfasst oder daraus besteht.

28. Verwendung nach Anspruch 27, worin die Substanz aus dem Peptid **KRRLIFSK** besteht.

29. Verwendung nach einem der Ansprüche 26 bis 28, worin die Substanz an einen Träger für die Zufuhr zu Zellen gebunden ist.

30. Verwendung nach Anspruch 29, worin die Substanz ein Peptid ist und an ein Trägerpeptid mit der Sequenz **RQIKIWFQNRRMKWKK** gebunden ist.

31. Peptid **KRRLIFSK** mit der Eigenschaft, cdk4 zu inhibieren, zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung des menschlichen Körpers oder Tierkörpers mittels Therapie.

32. Peptid nach Anspruch 31, worin die Behandlung jene einer Hyperproliferationserkrankung ist.

33. In-vitro- oder Ex-vivo-Verfahren zur Störung der Wechselwirkung zwischen p21 und Cyclin D1 und/oder cdk4, worin das Verfahren das Kontaktieren von p21 und/oder cdk4 mit einer Substanz, die ein Peptidfragment von p21 ist, das aus einer Aminosäuresequenz besteht, die ausgewählt ist aus:

RERWNFDFVTETPLEGDFAW (Peptid 4)
KACRRLFGPVDSEQLSRDCD (Peptid 2)
KxxRRyFzP (worin x jede beliebige Aminosäure sein kann, y und z hydrophob sein können und jeder der unterstrichenen Reste fehlen oder unterschiedlich sein kann)
KRRQTSMTDFYHSKRRLIFS (Peptid 10)
KRRQTSATDFYHSKRRLIFS
KRRQTSMTAFYHSKRRLIFS
TSMTDFYHSKRRLIFSKRKp (Peptid 11) oder
KRRLIFSK oder
xyLzF (worin y und z beliebige Aminosäuren sind und x vorzugsweise R ist),
oder einem solchen Fragment, gebunden an einen Bindungspartner oder fusioniert an eine Nicht-p21-Sequenz, umfasst oder daraus besteht.

34. In-vitro- oder Ex-vivo-Verfahren zur Modulation einer p21-vermittelten Wirkung auf cdk4-Aktivität, wobei das Verfahren das Kontaktieren von p21 und/oder cdk4 mit einer Substanz, die ein Peptidfragment von p21 ist, das aus einer Aminosäuresequenz besteht, die ausgewählt ist aus:

RERWNFDFVTETPLEGDFAW (Peptid 4)
KACRRLFGPVDSEQLSRDCD (Peptid 2)
KxxRRyFzP (worin x jede beliebige Aminosäure sein kann, y und z hydrophob sein können und jeder der unterstrichenen Reste fehlen oder unterschiedlich sein kann)
KRRQTSMTDFYHSKRRLIFS (Peptid 10)
KRRQTSATDFYHSKRRLIFS
KRRQTSMTAFYHSKRRLIFS
TSMTDFYHSKRRLIFSKRKp (Peptid 11)
KRRLIFSK oder
xyLzF (worin y und z beliebige Aminosäuren sind und x vorzugsweise R ist),
oder einem solchen Fragment, gebunden an einen Bindungspartner oder fusioniert an eine Nicht-p21-Sequenz, umfasst.

35. Verwendung von Nucleinsäure, die für eine Substanz, die ein Peptid milder Sequenz

KRRQTSATDFYHSKRRLIFS
KRRQTSMTAFYHSKRRLIFS
TSMTDFYHSKRRLIFSKRKp (Peptid 11) oder
KRRLIFSK
oder ein Fragment davon aus zumindest 5 Aminosäuren ist; oder ein Peptidfragment von p21, das aus einer Aminosäuresequenz besteht, die ausgewählt ist aus:
RERWNFDFVTETPLEGDFAW (Peptid 4)
KACRRLFGPVDSEQLSRDCD (Peptid 2)
KxxRRyFzP (worin x jede beliebige Aminosäure sein kann, y und z hydrophob sein können und jeder der unterstrichenen Reste fehlen oder unterschiedlich sein kann),
oder solch ein Fragment, gebunden an einen Bindungspartner oder fusioniert an eine Nicht-p21-Sequenz, kodiert, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer Hyperproliferationserkrankung durch Expression in einer Targetzelle.

36. Verwendung nach Anspruch 32, worin das Fragment oder Derivat ein Peptidfragment mit einer Sequenz, die

RERWNFDFVTETPLEGDFAW (Peptid 4)
KACRRLFGPVDSEQLSRDCD (Peptid 2)
KRRQTSATDFYHSKRRLIFS
KRRQTSMTAFYHSKRRLIFS
TSMTDFYHSKRRLIFSKRKp (Peptid 11) oder
KRRLIFSK ist,
umfasst oder daraus besteht.

37. Verwendung einer Substanz, die ein Peptidfragment von p21 ist, das aus einer Aminosäuresequenz besteht, die ausgewählt ist aus:

RERWNFDFVTETPLEGDFAW (Peptid 4)
KACRRLFGPVDSEQLSRDCD (Peptid 2)
KxxRRyFzP (worin x jede beliebige Aminosäure sein kann, y und z hydrophob sein können und jeder der unterstrichenen Reste fehlen oder unterschiedlich sein kann)
KRRQTSMTDFYHSKRRLIFS (Peptid 10)

KRRQTSATDFYHSKRRILS
 KRRQTSMTAFYHSKRRILS
 TSMTDFYHSKRRILFSKRKP (Peptid 11)
 KRRLIFSK oder
 xyLzF (worin y und z beliebige Aminosäuren sind und x vorzugsweise R ist),
 oder eines solchen Fragments, gebunden an einen Bindungspartner oder fusioniert an eine Nicht-p21-Sequenz, beim Entwerfen eines funktionellen Mimetikums von p21 mit der Eigenschaft, sich an Cyclin D1 und/oder cdk4 zu binden oder damit wechselzuwirken, und/oder beim Screenen darauf.

38. In-vitro- oder Ex-vivo-Verfahren zur Störung der Wechselwirkung zwischen p21 und Cyclin D1 und/oder cdk4, worin das Verfahren das Kontaktieren von p21 und/oder cdk4 mit einer Substanz, die ein Peptidfragment aus 40 oder weniger Aminosäuren von p21 ist, oder einem Derivat eines solchen Fragments, wobei das Fragment oder Derivat eine Aminosäuresequenz KxxRRyFzP (worin x jede beliebige Aminosäure sein kann, y und z hydrophob sein können und jeder der unterstrichenen Reste fehlen oder unterschiedlich sein kann) umfasst, wobei das Derivat die Eigenschaft aufweist, sich an Cyclin D1 und/oder cdk4 zu binden oder damit wechselzuwirken, oder einem solchen Fragment oder Derivat, gebunden an einen Bindungspartner oder fusioniert an eine Nicht-p21-Sequenz, umfasst.

39. In-vitro- oder Ex-vivo-Verfahren zur Modulation einer p21-vermittelten Wirkung auf cdk4-Aktivität, wobei das Verfahren das Kontaktieren von p21 und/oder cdk4 mit einer Substanz, die ein Peptidfragment aus 40 oder weniger Aminosäuren von p21 ist, oder einem Derivat eines solchen Fragments, wobei das Fragment oder Derivat eine Aminosäuresequenz KxxRRyFzP (worin x jede beliebige Aminosäure sein kann, y und z hydrophob sein können und jeder der unterstrichenen Reste fehlen oder unterschiedlich sein kann) umfasst, wobei das Derivat die Eigenschaft aufweist, sich an Cyclin D1 und/oder cdk4 zu binden oder damit wechselzuwirken, oder einem solchen Fragment oder Derivat, gebunden an einen Bindungspartner oder fusioniert an eine Nicht-p21-Sequenz, umfasst.

40. Verwendung von Nucleinsäure, die für eine Substanz, die ein Peptidfragment aus 40 oder weniger Aminosäuren von p21 ist, oder ein Derivat eines solchen Fragments, wobei das Fragment oder Derivat eine Aminosäuresequenz KxxRRyFzP (worin x jede beliebige Aminosäure sein kann, y und z hydrophob sein können und jeder der unterstrichenen Reste fehlen oder unterschiedlich sein kann) umfasst, wobei das Derivat die Eigenschaft aufweist, sich an Cyclin D1 und/oder cdk4 zu binden oder damit wechselzuwirken, oder solch ein Fragment oder

Derivat, gebunden an einen Bindungspartner oder fusioniert an eine Nicht-p21-Sequenz, kodiert, zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer Hyperproliferationserkrankung durch Expression in einer Targetzelle.

41. Verwendung einer Substanz, die ein Peptidfragment aus 40 oder weniger Aminosäuren von p21 ist, oder eines Derivats eines solchen Fragments, wobei das Fragment oder Derivat eine Aminosäuresequenz KxxRRyFzP (worin x jede beliebige Aminosäure sein kann, y und z hydrophob sein können und jeder der unterstrichenen Reste fehlen oder unterschiedlich sein kann) umfasst, worin das Derivat die Eigenschaft aufweist, sich an Cyclin D1 und/oder cdk4 zu binden oder damit wechselzuwirken, oder eines solchen Fragments oder Derivats, gebunden an einen Bindungspartner oder fusioniert an eine Nicht-p21-Sequenz, beim Entwerfen eines funktionellen Mimetikums von p21 mit der Eigenschaft, sich an Cyclin D1 und/oder cdk4 zu binden oder damit wechselzuwirken, und/oder beim Screenen darauf.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen

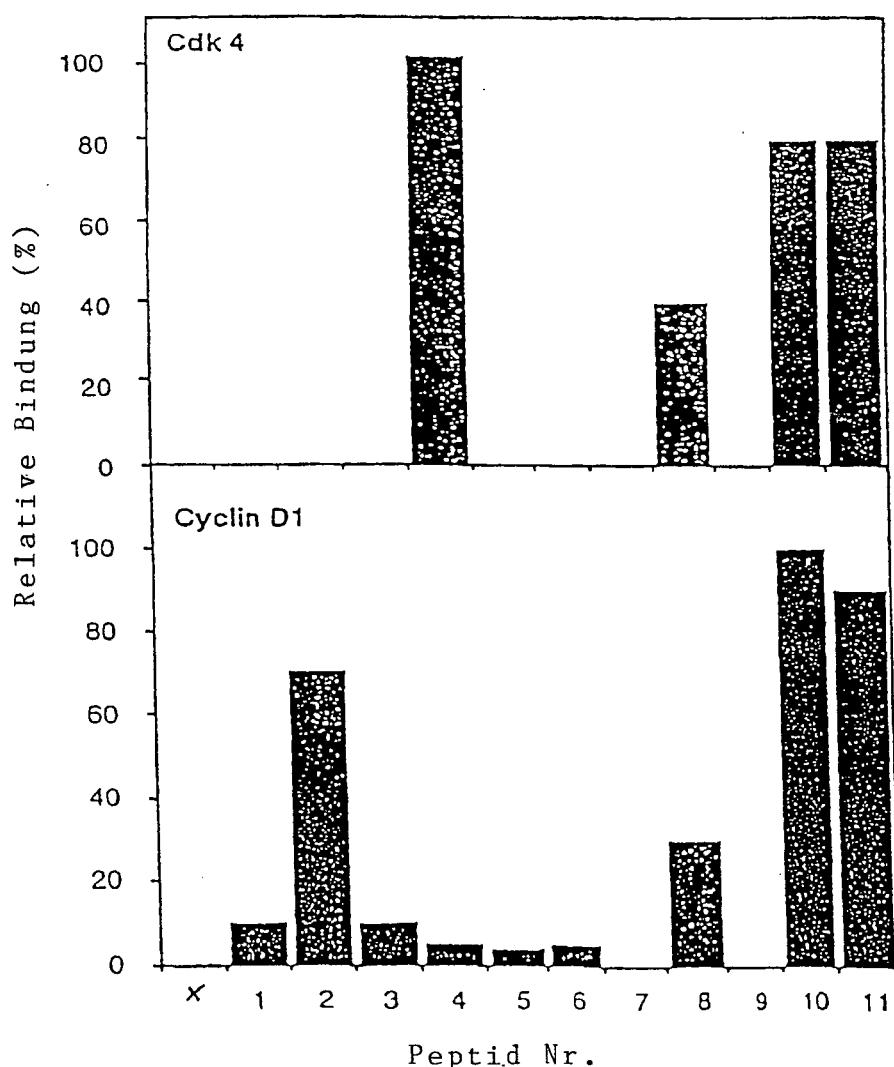
Anhängende Zeichnungen

FIGUR 1

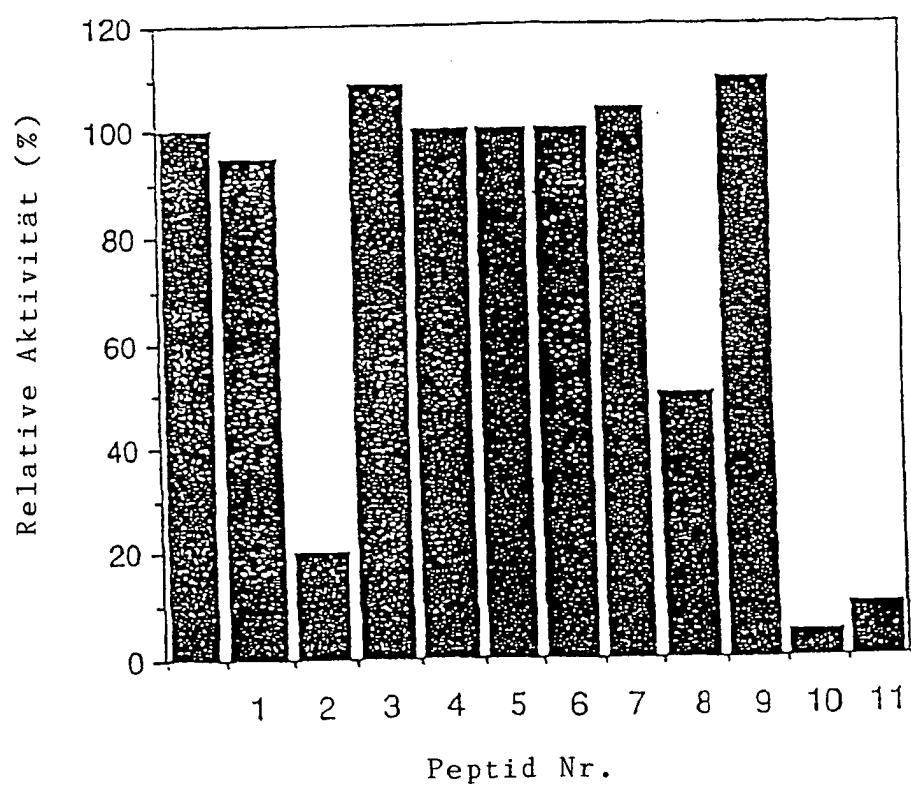
(a)

Peptid 1.	M S E P A G D V R Q N P C G S K A C R R
Peptid 2.	K A C R R L F G P V D S E Q L S R D C D
Peptid 3.	S R D C D A L H A G C I Q E A R E R W N
Peptid 4.	R E R W N F D F V T E T P L E G D F A W
Peptid 5.	G D F A W E R V R G L G L P K L Y L P T
Peptid 6.	L Y L P T G P R R G R D E L G G G R R P
Peptid 7.	G G R R P G T S P A L L Q G T A E E D H
Peptid 8.	A E E D H V D L S L S C T L V P R S G E
Peptid 9.	P R S G E Q A E G S P G G P G D S Q G R
Peptid 10.	K R R Q T S M T D F Y H S K R R L I F S
Peptid 11.	T S M T D F Y H S K R R L I F S K R K P

(b)



FIGUR 2



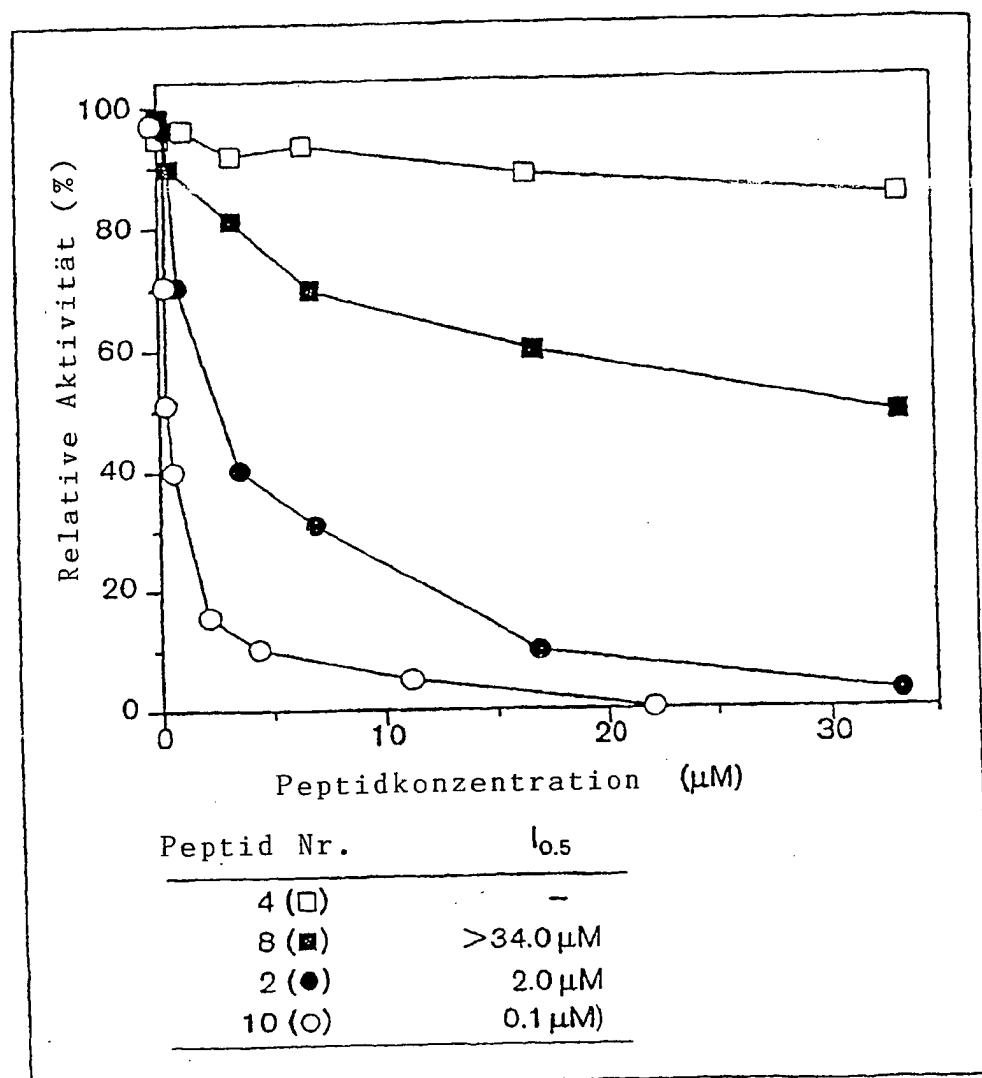
Figur 3

Figure 4

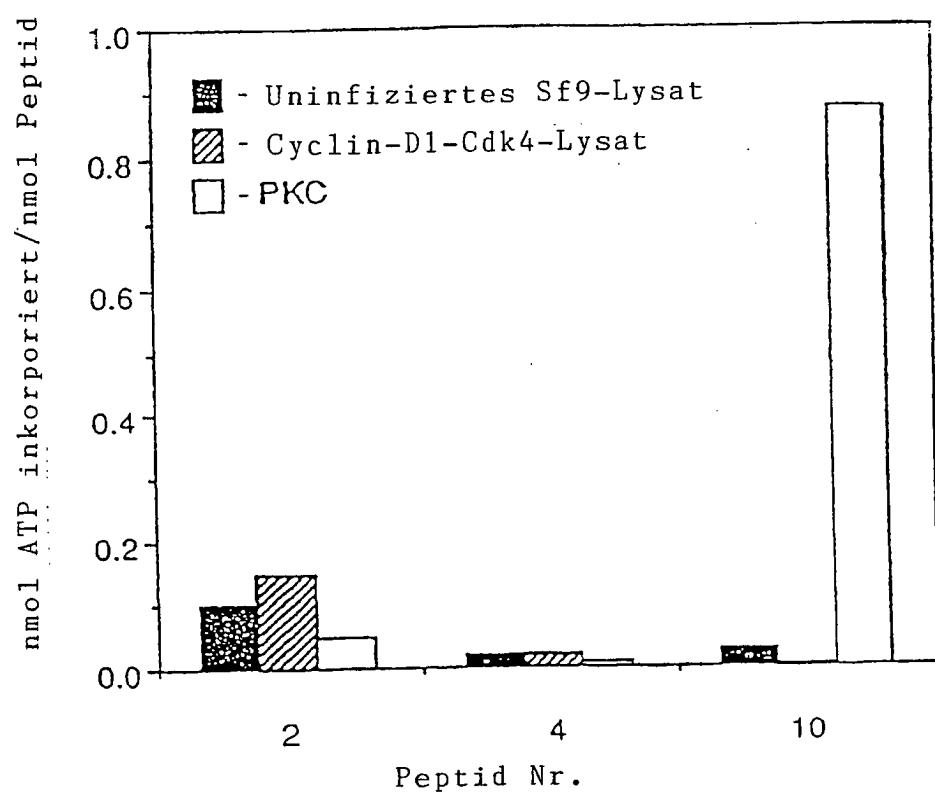


Figure 5

Peptid¹⁰
a- PRS GEQ AEG SPGG PGDS QGR
b- EQ AEG SPGG PGDS QGR KRRQ
c- GSPGG PGDS QGR KRRQT SMT
d- GPG DS QGR KRRQT SMT DFYH
e- SQGR KRRQT SMT DFYH SKRR
f- KRRQT SMT DFYH SKRRLIFS
g- TSMT DFYH SKRRLIFS KRKP
DFYH SKRRLIFS KRKP

Figur 6

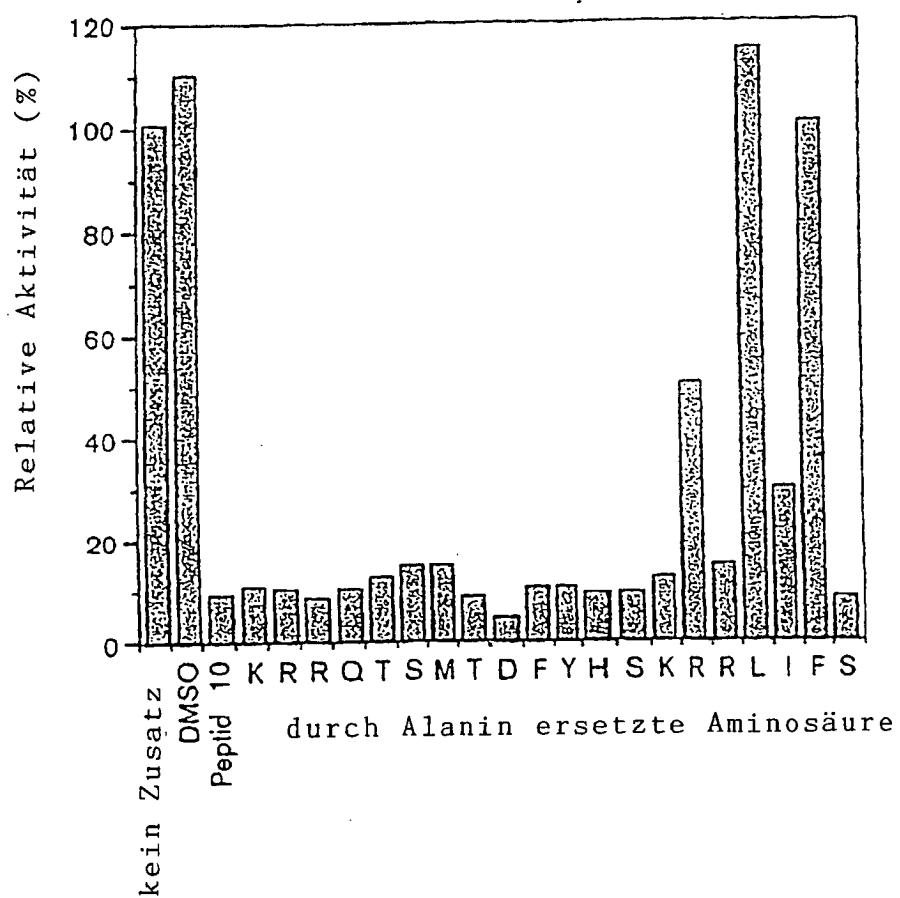


Figure 7

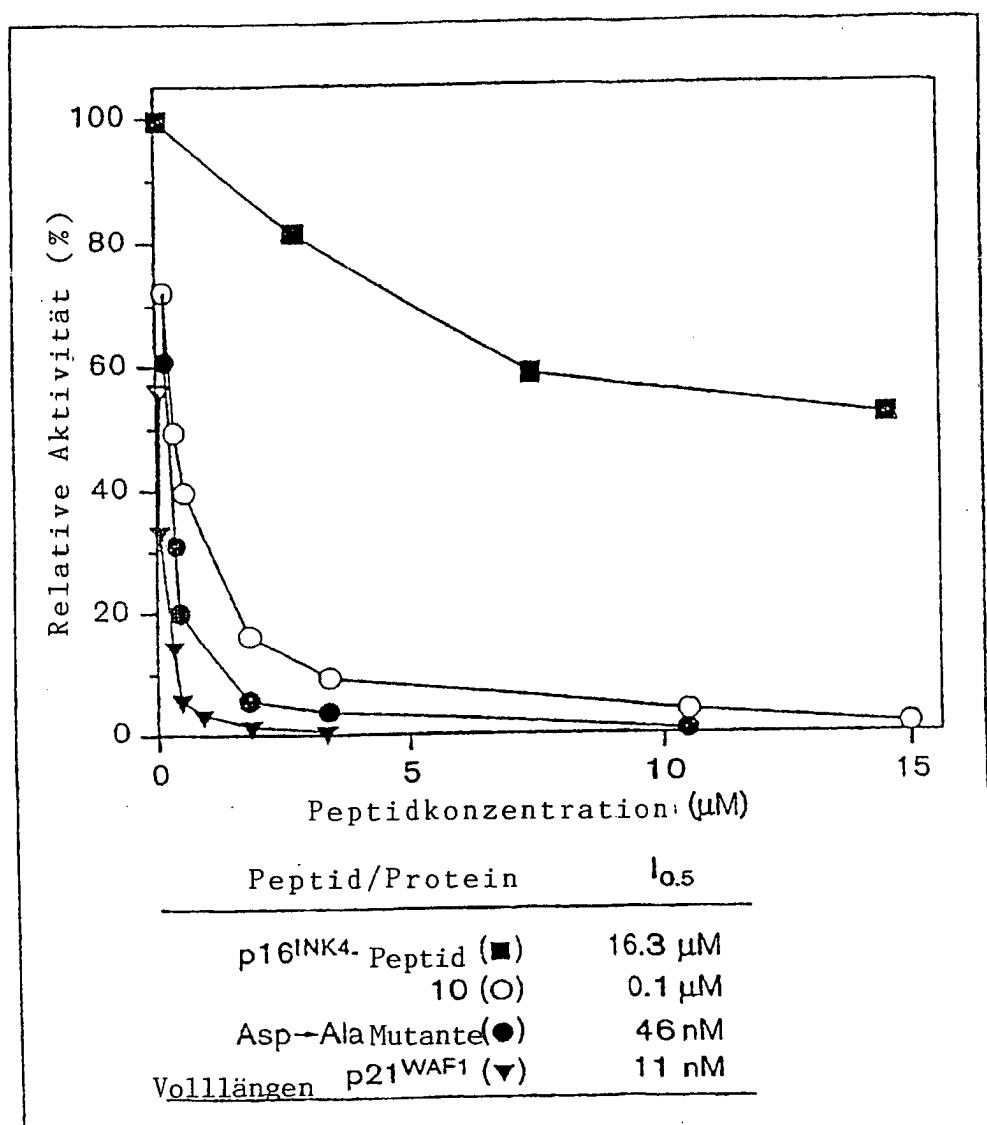


Figure 8

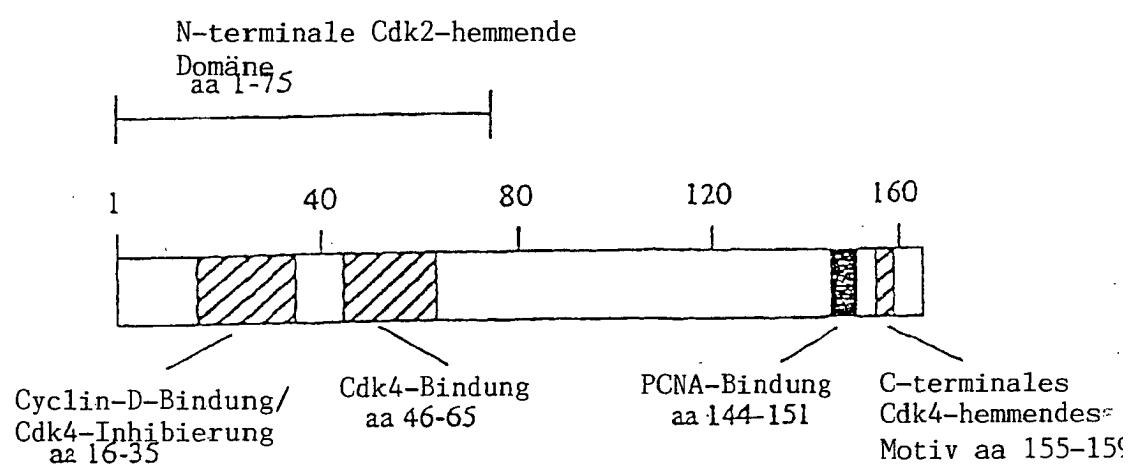
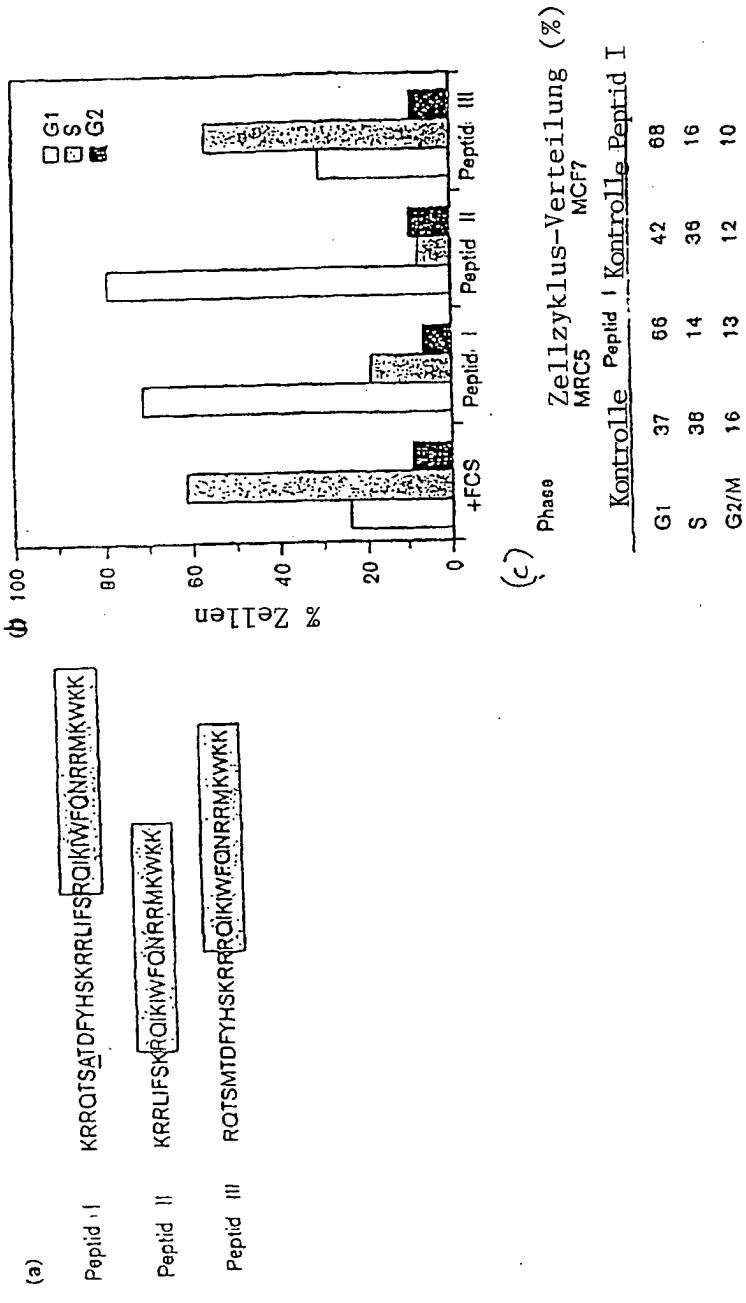


Figure 9

Figur 10

