



(19) INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
PORTUGAL

(11) Número de Publicação: PT 77740 E

(51) Classificação Internacional: (Ed. 6)

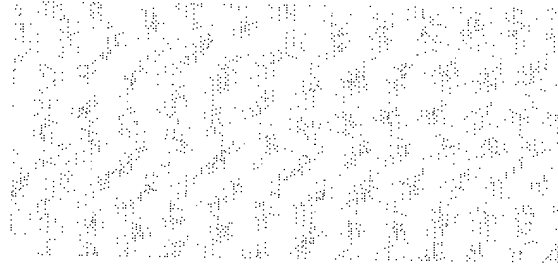
C12N015/85 A A61K048/00 B
C07K014/475 B C12N015/86 B
C12N015/88 B

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

<p>(22) Data de depósito: 1995.08.25</p> <p>(30) Prioridade: 1994.08.26 GB 9417366 1995.03.29 GB 9506466</p> <p>(43) Data de publicação do pedido: 1997.06.11</p> <p>(45) Data e BPI da concessão: 2000.04.05</p>	<p>(73) Titular(es): HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT D-65 926 - FRANKFURT/MAIN DE</p> <p>(72) Inventor(es): HANS-HARALD SEDLACEK DE ROLF MULLER DE</p> <p>(74) Mandatário(s): JOSÉ LUÍS FAZENDA ARNAUT DUARTE RUA DO PATROCÍNIO, 94 1350 LISBOA PT</p>
---	---

(54) Epígrafe: TRATAMENTO POR TERAPIA GENÉTICA DE DOENÇAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC) ATRAVÉS DE UMA SUBSTÂNCIA ACTIVA ESPECÍFICA DAS CÉLULAS DEPENDENTE DO CICLO CELULAR

(57) Resumo:



f l A

DESCRIÇÃO**"TRATAMENTO POR TERAPIA GENÉTICA DE DOENÇAS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC) ATRAVÉS DE UMA SUBSTÂNCIA ACTIVA ESPECÍFICA DAS CÉLULAS, DEPENDENTE DO CICLO CELULAR"**Âmbito Técnico

Descreve-se uma sequência de ADN para a terapia genética de doenças do sistema nervoso central.

Os elementos essenciais desta sequência de ADN são a sequência do activador, o módulo promotor e o gene para a substância activa.

A sequência do activador é activada de modo específico conforme as células, em células do endotélio ou células gliais activadas. Esta activação é regulada de modo específico conforme o ciclo celular, através do módulo promotor. A substância activa constitui um factor de crescimento dos nervos, uma enzima do metabolismo da dopamina e/ou um factor de protecção para neurónios. A sequência de ADN descrita é introduzida num vector viral ou não viral, completada com um ligando com afinidade para as células alvo.

1. O sistema nervoso central e factores de crescimento

Após conclusão da ontogénese, os neurónios constituem células diferenciadas que já não possuem capacidade de divisão. Em geral, são caracterizadas pelos seus corpos centrais e pelas suas ramificações, as quais se podem distinguir em ramificações de recepção (dendrites) e ramificações de emissão (neurites). A neurite emissora única por neurónio, geralmente com uma estrutura simples, entra em contacto com os seus órgãos alvo (neurónios ou células somáticas de outro tipo) através das

sinapses.

A conservação da estrutura anatómica e da função dos neurónios tem lugar em presença de factores de crescimento neuronais.

Por factores de crescimento neuronais entendem-se em sentido geral factores neurotrofos (Sinopses em Massague, *Cell* 49, 437 (1987), Puzsai et al., *J. Pathol.* 169, 191 (1993), Ibanez et al., *PNAS* 89, 3060 (1992), Sonoda et al., *BBRC* 185, 103 (1992)). Entre estes contam-se os factores de crescimento neuronais do Quadro 1.

Em sentido mais estrito, devem-se contar entre estes a família dos factores de crescimento dos nervos (*Nerve growth factors* = NGF).

Os NGF actuam através da ligação aos receptores NGF, especialmente formada nas fibras nervosas sensoriais. O NGF é recolhido no espaço intracelular e é transportado de volta para o corpo celular (Johnson et al., *J. Neurosci.* 7, 923 (1987)). Aí o NGF parece provocar um aumento do monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) com o conseqüente aumento da libertação de Ca^{++} (Schubert et al., *Nature* 273, 718 (1978), além disso, através do metabolismo de lípidos de inositol provoca a libertação de diacilglicerol e a activação da quinase de proteína C e, através da libertação de trifosfato de inositol, provoca uma libertação intracelular de Ca^{++} (Abdel-Latif, *Pharmacol. Rev.* 38, 227 (1986)).

A resultante fosforilação de proteínas específicas, em especial as transportadoras de sinal, leva à alteração das suas funções. Como resultado temos um reforço na formação de proteínas que participam no crescimento das neurites. Entre estas contam-se as proteínas cartina (Black et al., *J. Cell Biol.* 103, 545 (1986)), as proteínas tau e tubulina (Drubin et al., *J. Cell Biol.* 101, 1799 (1985)). Assim, aumenta a síntese

f L A

de α -tubulina e β -tubulina e de proteínas dos neurofilamentos (NF-L, NF-M, NF-H) e periferina (Portier et al., *Dev Neurosci* 6, 215 (1983)), Parysek et al., *J. Neurosci.* 7, 781, (1987)). Simultaneamente aumenta a concentração de enzimas importantes no sistema nervoso como por exemplo a acetiltransferase de colina, a esterase de acetilcolina e as enolases específicas dos neurónios (Vinores et al., *J. Neurochemistry* 37, 597, 1981), Rydel et al., *J. Neurosci.* 7, 3639 (1987)).

Além disso as concentrações de neurotransmissores aumenta, tal como, por exemplo, da neurotensina (Tischler et al., *Reg. Pept.* 3, 415 (1982)) e do neuropeptídeo Y (Allen et al., *Neurosci. Lett.* 46, 291 (1984)) e de receptores de neurotransmissores, como por exemplo receptores de acetilcolina (Mitsuka et al., *Brain Res.* 314, 255 (1984)) e receptores de encefalina (Inoue et al., *J. Biol. Chem.* 257, 9238 (1982)). Ao mesmo tempo aumenta a concentração de sinapsina I (Romano et al., *J. Neurosci.* 7, 1300 (1987)).

Em conclusão, o NGF conserva a funcionalidade dos neurónios. Simultaneamente, o NGF inicia e incentiva o crescimento de neurites. Para esta actividade neuritogénica e sinaptogénica é necessária a presença constante de NGF (Smith, *Science* 242, 708 (1988), Mitchison et al., *Neuron* 1, 761 (1988)).

Em especial foi possível relacionar este efeito com o factor ciliar neurotrófico - *Ciliary Neurotrophic Factor* (CNTF) (Lin et al., *Drugs of the Future* 19, 557 (1994)).

Foi possível provar experimentalmente a acção neurotrófica dos factores de crescimento neuronais, em especial no caso de lesões de neurónios, por exemplo na separação cirúrgica de neurites. Se o CNTF for aplicado localmente, no coto próximo dos nervos seccionados diminui claramente a percentagem de neurónios que morrem após a intervenção cirúrgica (Sendtner et al., *Nature* 345, 440 (1990)). Simultaneamente, após a

f l A

administração de CNTF, a concentração de, por exemplo, substância neuropéptica P, aumenta nitidamente nos gânglios espinais. Ratos, a quem foi lesionado o nervo isquial, apresentam um rápido restabelecimento da sua actividade motora após aplicação de CNTF por via subcutânea (Lin et al., *Drugs of the Future* 19, 557 (1994)).

Porém, a administração sistémica de factores neurotróficos só é eficaz quando os neurónios motores que se encontram na medula espinal, protegidos pela barreira hematoencefálica, possuem ainda axónios funcionais fora desta barreira, através dos quais os factores neurotróficos podem ser recolhidos (Apfel et al., *Brain Res.* 605 1 (1993)).

No caso de lesões dos neurónios até ao outro lado ou do outro lado da barreira hematoencefálica é necessária a aplicação intracraniana de factores neurotróficos. Desta forma, por exemplo, pode-se evitar experimentalmente a degeneração retrógrada dos neurónios talâmicos próximos após secção dos axónios talâmicos (Clatterbuch et al., *PNAS* 90, 2222 (1993)). Porém, constitui um pré-requisito para um processo de regeneração óptimo a presença constante de factores neurotróficos no local dos neurónios lesionados. A aplicação local no momento da lesão ou da reparação da lesão cirúrgica é possível, porém já é muito difícil ou quase impossível uma vez concluída a intervenção cirúrgica. As lesões difusas do SNC, por exemplo através de traumas de seccionamento ou de toxinas, só moderadamente é que permitem a possibilidade de uma aplicação orientada.

As células gliais podem ser estimuladas, através de estímulos de ordem traumática, imunológica e tóxica, para produzir TNF α . Este TNF α é, por seu lado, tóxico para os neurónios e para as células gliais (Owens et al., *Immunol. Today* 15, 566 (1984)).

Para se alcançar uma presença das substâncias activas no

SNC ao mais longo prazo possível experimentou-se injectar células por via intracraniana (fibroblastos, células do endotélio, mioblastos) que foram transduzidas in vitro para exprimirem substâncias activas neurotróficas. O objectivo consiste em melhorar a regeneração e a função de neurónios danificados por traumas ou degenerações, como por exemplo pela doença de Parkinson ou por demência, através das substâncias activas neurotróficas. Em especial no caso da doença de Parkinson, tentou-se injectar células que ou tinham sido transduzidas in vitro para secretar as enzimas neuroespecíficas como hidroxilase de tirosina e descarboxilase de dopa (Kopin, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32, 467 (1993), Fisher et al., Physiol. Rev. 11, 582 (1993), Jiao et al., Nature 362, 450 (1993)), ou então injectaram-se neurónios humanos fetais dopaminérgicos, nigrais (Löwenstein, Bio/Technology 12, 1075 (1994)).

Porém, este tipo de células só se encontra disponível de uma forma limitada. Por outro lado a utilização de células fetais levanta consideráveis questões de ordem ética.

Como alternativa ensaiou-se a possibilidade de se injectar directamente no cérebro vectores para transduzirem células encefálicas e exprimirem as substâncias activas desejadas (During et al., Science 266, 1399 (1994)). Uma vez que estes vectores não têm qualquer especificidade celular, reconhece-se o considerável perigo de os neurónios poderem sofrer lesões devido à infecção ou transfecção com o vector.

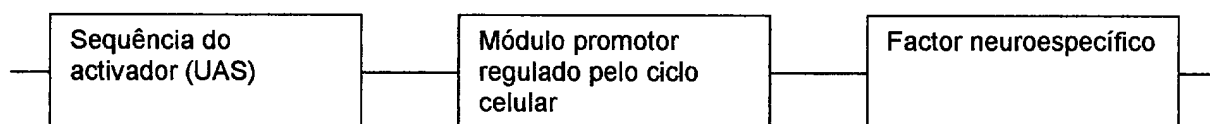
2. Descrição da Presente Invenção

O objecto da presente invenção consiste por conseguinte numa substância activa que pode ser dada aos pacientes como medicamento, tanto por via local como sistémica, e através da qual é possível produzir no local da lesão dos neurónios, durante um longo espaço de tempo, factores neuroespecíficos. Este tipo de factores neuroespecíficos podem ser factores

f L A

neurotróficos que protegem os neurónios de outras lesões e provocam a regeneração dos neurónios. Os factores neuroespecíficos podem também ser enzimas, como a hidroxilase de tirosina e a descarboxilase de dopa, que são responsáveis pela síntese de dopamina a partir da tirosina. Além disso, os factores neuroespecíficos podem ser substâncias que inibem ou neutralizam o $TNF\alpha$.

Componente central desta substância activa é uma construção de ADN constituída pelos seguintes elementos:



(O termo ADN é utilizado na totalidade do texto deste pedido de patente como conceito comum tanto para uma sequência de ADN complementar (ADNc) como para uma sequência de ADN genómica).

2.1. Selecção da sequência do activador

Por sequência do activador (UAS = upstream activator sequence) é designada uma sequência de nucleótidos (sequências do promotor ou do intensificador) com a qual os factores de transcrição, construídos ou activos nas células do endotélio ou gliais, interagem.

Como sequência do activador pode-se utilizar o intensificador de CMV ou o promotor de CMV (EP-B1-0 173 177), o promotor de SV40 ou qualquer outra sequência do promotor ou intensificadora conhecidas do especialista.

Porém, no sentido da presente invenção contam-se entra as sequências activadoras preferidas as sequências reguladoras do gene ou elementos de genes que codificam para as proteínas formadas especialmente nas células do endotélio ou nas células gliais.

f l A

a) Sequências do activador, activadas nas células do endotélio

Algumas destas proteínas foram descritas por Burrows et al., (Pharmac. Therp. 64, 155 (1994) e Plate et al. (Brain Pathol. 4, 207 (1994)). Em especial contam-se entre estas proteínas específicas do endotélio por exemplo:

- Transportador de glucose 1 endotelial, específico do cérebro

As células do endotélio encefálicas caracterizam-se por uma expressão muito forte deste transportador para realizar o transporte transendotelial da D-glucose para o encéfalo (Gerhart et al., J. Neurosci. Res. 22, 464 (1989)). A sequência do promotor foi descrita por Murakami et al. (J. Biol. Chem. 267, 9300 (1992)).

- Endoglina

A endoglina parece ser um receptor de TGF β que não é transmissor de sinal (Gangos et al., J. Biol. Chem. 265, 8361 (1990), Moren et al., BBRC 189, 356 (1992), Cheifetz, J. Biol. Chem. 267, 19027 (1992)). Em quantidades reduzidas existe no endotélio normal, porém é expressa de forma reforçada em endotélio proliferativo (Westphal et al., J. Invest. Derm. 100, 27 (1993), Burrows et al., Pharmac Ther. 64, 155 (1994)). As sequências dos promotores foram descritas por (Bellon et al., Eur. J. Immunol. 23, 2340 (1993), Ge et al., Gene 138, 201 (1994)).

- Receptores VEGF

Distinguem-se dois receptores (Plate et al., Int. J. Cancer 59, 520 (1994)):

- * O receptor VEGF-1 (flt-1) (de Vries et al., Science 255, 989 (1992)) contém na fracção citoplasmática uma quinase de tirosina semelhante a

f l A

fms e o

- * Receptor VEGF-2 (flk-1, KDR) (Terman et al., BBRC 187, 1579 (1992)) contém na fracção citoplasmática uma quinase de tirosina.

Ambos os receptores encontram-se quase exclusivamente em células do endotélio (Senger et al., Cancer Metast. Rev. 12, 303 (1993)).

- outras quinases de tirosina de receptor, específicas do endotélio

- * til-1 ou til-2 (Partanen et al., Mol. Cell Biol. 12, 1698 (1992), Schnürch e Risau, Developm. 119, 957 (1993), Dumont et al., Oncogene 7, 1471 (1992))

- * receptor B61

(receptor Eck) (Bartley et al., Nature 368, 558 (1994), Pandey et al., Science 268, 567 (1995), Van der Geer et al., Ann. Rev. Cell Biol. 10, 251 (1994))

- B61

A proteína B61 é o ligante para o receptor B61 (Holzman et al., J. Am. Soc. Nephrol. 4, 466 (1993), Bartley et al., Nature 368, 558 (1994))

- Endotelina, em especial

- * endotelina B (Oreilly et al., J. Cardiovasc. Pharm. 22, 18 (1993), Benatti et al., J. Clin. Invest. 91, 1149 (1993), O'Reilly et al., BBRC 193, 834 (1993)). A sequência do promotor foi descrita por Yanasigawa et al., Nature 322, 411 (1988) e Benatti et al., J. Clin. Invest. 91, 1149

f L A

(1993).

- * endotelina-1 (Yanasigawa et al., Nature 322, 411 (1988)).
A sequência do promotor foi descrita por Wilson et al., Mol. Cel. Biol. 10, 4854 (1990).
- * receptores de endotelina, em especial o receptor de endotelina B (Webb et al., Mol. Pharmacol. 47, 730 (1995), Haendler et al., J. Cardiovasc. Pharm. 20, 1 (1992)).
- Receptores de manose-6-fosfato
(Perales et al., Eur. J. Biochem. 226, 225 (1994), Dahms et al., Cell 50, 181 (1987)).

As sequências dos promotores foram descritas por Ludwig et al. (Gene 142, 311 (1994)), Oshima et al. (J. Biol. Chem. 263, 2553 (1988)) e Pohlman et al. (PNAS USA 85, 5575 (1987)).
- Factor de von Willebrand
A sequência do promotor foi descrita por Jahroudi e Lynch (Mol. Cell. Biol. 14, 999 (1994), Ferreira et al., Biochem. J. 293, 641 (1993) e Aird et al., PNAS USA 92, 4567 (1995)).
- IL-1 α . IL-1 β .
A IL-1 é produzida a partir de células do endotélio activadas (Warner et al., J. Immunol. 139, 1911 (1987)).
As sequências dos promotores foram descritas por Hangen et al., Mol. Carcinog. 2, 68 (1986), Turner et al., J. Immunol. 143, 3556 (1989), Fenton et al., J. Immunol. 138, 3972 (1987), Bensi et al., Cell Growth Diff. 1, 491 (1990), Mori et al., Blood 84, 1688 (1994), Hiscott et al., Mol Cell. Biol. 13, 6231 (1993).

- Receptor IL-1

A sequência do promotor foi descrita por Ye et al., PNAS USA 90, 2295 (1993).

- Molécula de adesão celular vascular (VCAM-1)

A expressão de VCAM-1 em células do endotélio é activada por lipossacáridos, TNF- α (Neish et al., Mol. Cell. Biol. 15, 2558 (1995)), IL-4 (Iademarco et al., J. Clin. Invest. 95, 264 (1995)), IL-1 (Marni et al., J. Clin. Invest. 92, 1866 (1993)).

A sequência do promotor da VCAM-1 foi descrita por Neish et al., Mol. Cell. Biol. 15, 2558 (1995), Ahmad et al., J. Biol. Chem. 270, 8976 (1995), Neish et al., J. Exp. Med. 176, 1583 (1992), Iademarco et al., J. Biol. Chem. 267, 16323 (1992) e Cybulsky et al., PNAS USA 88, 7859 (1991).

- Sequências activadoras sintéticas

Em alternativa aos promotores naturais, específicos do endotélio podem-se também utilizar sequências activadoras sintéticas constituídas por locais de ligação oligomerizados para factores de transcrição que são preferencialmente ou selectivamente activos no endotélio. Um exemplo destas é o factor de transcrição GATA-2, cujos locais de ligação é no gene da endotelina-1 ...TTATCT... (Lee et al., Biol. Chem. 266, 16188 (1991); Dorfmann et al., J. Biol. Chem. 267, 1279 (1992) e Wilson et al., Mol. Cell. Biol. 10, 4854 (1990)).

b) Sequências activadoras activadas nas células gliais

Como sequência do activador preferida deve-se compreender mais uma sequência de nucleótidos (sequência do promotora ou intensificador), que interage com os factores de transcrição, especialmente formados ou activos nas células gliais.

Entre estas contam-se especialmente sequências ou

f. L. A.

elementos reguladores de genes, originários de genes que codificam, por exemplo, para as seguintes proteínas detectáveis nas células gliais:

- * a proteína periaxina específica das células de Schwann
(Gillespie et al., *Neuron* 12, 497 (1994)). As sequências dos promotores foram descritas por Gillespie et al. (*Neuron* 12, 497 (1994)).

- * sintetase de glutamina
(Akimoto et al., *Brain Res.* 72, 9 (1993), Fressinaud et al., *J. Cell Physiol.* 149, 459 (1991)).
As sequências dos promotores foram descritas por Chakrabarti et al. (*Gene* 153, 163 (1995)) e por Bhandarie et al. (*J. Biol. Chem.* 266, 7784 (1991)).

- * a proteína específica das células gliais
(*Glial fibrillary acidic protein* = GFAP)
(Akimoto et al., *Brain Res.* 72, 9 (1993))
As sequências dos promotores foram descritas por Kumanishi et al. (*Acta Neuropath.* 83, 569 (1992)). Besuard et al. (*J. Biol. Chem.* 266, 18877 (1991)), Reeves et al. (*PNAS USA* 86, 5178 (1989)), Brenner et al. (*Brain Res.* 7, 277 (1990)) e Masood et al. (*J. Neurochem.* 61, 160 (1993)).

- * a proteína da célula glial S100b
(Shen et al., *Mol. Brain Res.* 21, 62 (1994))
A sequência do promotor foi descrita por Zimmer et al. (*Brain Res. Bulletin* 37, 417 (1995)).

- * IL-6 (CNTF)
(Sparacio et al., *J. Neuroimmunol.* 39, 231 (1992))
As sequências dos promotores foram descritas por Chernajovsky et al. (*J. Cell. Biochem. Suppl.* 0/13, 73

f l A

(1989)), Ray et al. (Mol. Cell Biol. 10, 5736 (1990)), Droogmans et al. (DNA Sequence 3, 115 (1992)) Mori et al. (Blood 84, 2904 (1994)), Liberman et al. (Mol. Cell. Biol. 10, 2327 (1990)) e Ishiki et al. (Mol. Cell. Biol. 10, 2757 (1990)).

* receptores 5-HT

(Whitaker-Azmitia et al., Synapse 14, 201 (1993))

As sequências dos promotores foram descritas por Elliott et al. (Neurochem. Int. 25, 537 (1994)), Veldman et al. (Mol. Pharmac. 42, 439 (1992)), Adham et al. (PNAS USA 90, 408 (1993)), Mochizuki et al. BBRC 185, 517 (1992)) e Jin et al. (J. Biol. Chem. 267, 5735 (1992)).

* TNF α

(Perez et al., Cell 63, 251 (1990), Merrili et al., J. Immunol. 151, 2132 (1993))

As sequências dos promotores foram descritas por Takashiba et al. (Gene 131, 307 (1993)) e van der Ahe et al. (Nucl. Acids Res. 21, 5636 (1993)).

* IL-10

(Owens et al., Immunol. Today 15, 566 (1994)).

As sequências dos promotores foram descritas por Kim et al. (J. Immunol. 148, 3618 (1992)), Kube et al. (Cytokine 7, 1 (1995)) e Platzner et al. (DNA-Sequence 4, 399 (1994)).

* Receptor do factor de crescimento semelhante a insulina (*Insulin-like Growth Factor Receptor*) I e II

As sequências dos promotores foram descritas por Morgan et al. (Nature 329, 301 (1987)), Cooke et al. (BBRC 177, 1113 (1991)), Kim et al. (Mol. Endocrin. 5, 1964 (1991)), van Dijk et al. (Mol. Cell. Endocrin. 81, 81 (1991)), Raizis et al. (Biochem. J. 289, 133 (1993)) e Yu et al. (Nature 371, 714 (1994)).

f L A

- VEGF

O VEGF é formado em tecidos vascularizados, em especial sob condições hipóxicas (Berse et al., Mol. Biol. Cell 3, 211 (1992), Finkenzeller et al., BBRC 208, 432 (1995), Tischer et al., BBRC 165, 1198 (1989), Leung et al., Science 246, 1306 (1989), Ferrara et al., Endoc. Rev. 13, 18 (1992)). A sequência reguladora do gene para o gene VEGF é

- * a sequência do promotor do VEGF (região de flanco 5') Michenko et al., Cell Mol. Biol. Res. 40, 35 (1994), Tischer et al., J. Biol. Chem. 266, 11947 (1991)), ou
- * a sequência intensificadora do gene VEGF (região de flanco 3') (Michenko et al., Cell Mol. Biol. Res. 40, 35 (1994)) ou
- * o gene c-Src
(Mukhopadhyay et al., Nature 375, 577 (1995), Bonham et al., Oncogene 8, 1973 (1993), Parker et al., Mol. Cell. Biol. 5, 831 (1985), Anderson et al., Mol. Cell. Biol. 5, 1122 (1985)) ou
- * o gene v-Src
(Mukhopadhyay et al., Nature 375, 577 (1995), Anderson et al., Mol. Cell. Biol. 5, 1122 (1985), Gibbs et al., J. Virol. 53, 19 (1985))

2.2. Selecção do módulo promotor

Como módulo promotor regulado pelo ciclo celular é considerada, por exemplo, a sequência de nucleótidos CDE-CHR-Inr. A função principal do módulo promotor reside na inibição da função da sequência do activador na fase G0/G1 do ciclo celular e uma expressão específica do ciclo celular na fase S/G2 e portanto nas células em proliferação.

O módulo promotor CDE-CHR-Inr foi descoberto no âmbito de uma investigação pormenorizada da expressão específica de G2 do promotor humano *cdc25C*. O ponto de partida foi a descoberta de um elemento regulador (elemento dependente do ciclo celular, "cell cycle dependent element"; CDE) responsável pela interrupção do promotor na fase G1 do ciclo celular (Lucibello et al., EMBO J. 14, 132 (1995)). Através de investigação do rasto (*foot-printing*) genómico de sulfato de dimetilo (DMS) e de análises funcionais (fig. 1, 2) foi possível mostrar que o CDE liga um repressor (factor de ligação de CDE, "CDE-binding factor", CDF) específico de G1 e chegar, por este meio, a uma inibição da transcrição em células não proliferativas (G0). O CDE localizado na zona do promotor basal depende, na sua função repressiva, de uma sequência activadora a montante ("upstream activating sequence" (UAS)).

Desta forma chegou-se à conclusão que o factor de ligação de CDE inibe a acção activadora da transcrição de proteínas activadoras ligadas a 5' de uma forma dependente do ciclo celular, isto é, em células não proliferativas bem como na fase G1 do ciclo celular (fig. 3).

Esta conclusão pode ser confirmada através de mais uma experiência: A fusão do intensificador SV40 viral precoce, não regulador do ciclo celular com um promotor mínimo *cdc25* (constituído por CDE e os locais de partida situados em 3') produziu uma clara regulação do ciclo celular do promotor quimérico (fig. 4). Investigações subsequentes do intensificador *cdc25C* mostraram que no caso dos factores de transcrição regulados de forma dependente do ciclo celular pelo CDF se trata de NF-Y (CBF) (Dorn et al., Cell 50, 863 (1987), van Hujisduijnen et al., EMBO J. 9, 3119 (1990), Coustry et al., J. Biol. Chem. 270, 468 (1995)), Sp1 (Kadonaga et al., TIBS 11, 10 (1986)) e possivelmente um novo factor de transcrição ligado a CBS7 (CIF). Uma outra descoberta interessante deste estudo reside na observação de que o NF-Y dentro do intensificador *cdc25C* só activa a transcrição de

forma eficaz em cooperação com pelo menos um outro complexo NF-Y ou com CIF. Tanto NF-Y como Sp1 pertencem à classe dos activadores ricos em glutamina, o que deixa pistas importantes sobre o mecanismo da repressão (p. ex. interacção ou interferência com determinados factores de transcrição basais ou TAFs).

Uma comparação das sequências do promotor de *cdc25C*, ciclina A e *cdc2* revela homologias em vários domínios (fig. 5). Não só o CDE é conservado em todos os três promotores (as diferenças existentes não são relevantes do ponto de vista funcional), como também as caixas Yc. Todos estes domínios apresentam, como era esperado, a ligação de proteína in vivo, no caso do CDE de forma dependente do ciclo celular. Além disso foi possível mostrar que todos os 3 promotores são desregulados por uma mutação do CDE (quadro 2). Foi também evidente uma semelhança notável na comparação das sequências *cdc25C*, ciclina A e *cdc2*, também na zona vizinha 3' de CDE (região de homologia dos genes do ciclo celular, "Cell cycle genes homology region", CHR) (fig. 5). Do ponto de vista funcional, esta zona é igualmente tão significativa quanto o CDE (quadro 2), porém não é visível nas experiências in vivo de rasto (*footprinting*) de DMS.

Uma possível razão para este facto reside na interacção do factor com a pequena estria menor do ADN. Os resultados das experiências de análise de desvio de mobilidade electroforética ("*electrophoretic mobility shift assay*" (EMSA)) apontam para o CDE e CHR ligarem conjuntamente um complexo proteico CDF. Estas observações apontam para a conclusão de que a repressão provocada por CDF de activadores ricos em glutamina é um mecanismo frequente da transcrição regulada pelo ciclo celular.

Porém, parece ser significativo para a regulação do promotor *cdc25C* não só a zona CDE-CHR, mas também uma das posições de iniciação (posição +1) dentro da sequência de nucleótidos do promotor basal (posições ≤ -20 a $\geq +30$, vide

fig. 1). As mutações nesta área, que inclui a posição de ligação *in vitro* para o factor de transcrição YY-1 (Seto et al., *Nature* 354, 241 (1991), Usheva e Shenk *Cell* 76, 1115 (1994)), provocam uma desregulação total. Tendo em conta a proximidade de CDE-CHR do promotor basal, é assim muito provável uma interacção do CDF com o complexo de transcrição basal.

2.3. Selecção do factor neuroespecífico

a) Factores de crescimento neuronais

Considera-se como factor neuroespecífico no sentido da presente invenção uma sequência de ADN que codifica para um factor de crescimento neuronal. Por exemplo, contam-se especialmente nesta categoria:

- FGF

(Johnson et al., *Adv. Cancer Rec.* 60, 1 (1993), Jay et al., *Science* 233, 541 (1986), Abrahahm et al., *EMBO J.* 5, 2523 (1986), *Science* 233, 545 (1986), Mergia et al., *BBRC* 138, 644 (1986), Schweigerer, *Nature* 325, 257 (1987), *PNAS USA* 84, 842 (1987))

- Factor de crescimento dos nervos (*Nerve growth factor* (NGF))

(Haktzopoulous et al., *Neuron* 13, 187 (1994), Takeda et al., *Neuroscience* 55, 23 (1993), Cartwright et al., *Brain Res.* 15, 67 (1992))

- Factor neurotrófico derivado do cérebro (*Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF))

(Zhang et al., *J. Neurobiol.* 25, 1517 (1994), Maisonpierre et al., *Genomics* 10, 558 (1991), *DNA Sequence* 3, 49 (1992), Timmusk et al., *Neuron* 10, 475 (1993)).

- Neurotrofina-3 (NT-3)

(Hallboeek et al., Eur. J. Neurosci. 5, 1 (1993), Rodriguez-Tebar et al., Philosoph. Transact. Roy. Soc. Biol. Sci. 331, 255 (1991), Leingärtner et al., Eur. J. Neurosci. 6, 1149 (1994))

- Neurotrofina-4 (NT-4)

(Ibanez et al., PNAS 89, 3060 (1992), Ny et al., PNAS 89, 3060 (1992))

- Factor neurotrófico ciliar (*Ciliary neurotrophic factor* (CNTF))

(Ishiki et al., New Biologist 3, 63 (1991), Ray et al., Mol. Cell. Biol. 9, 5537 (1989), Leung et al., Neuron 8/6, 1045 (1992), Bootha et al., Gene 146, 303 (1994)).

b) Enzimas

Além disso é considerado como factor neuroespecífico uma sequência de ADNc que codifica para:

- Hidroxilase de tirosina

(Goc et al., Mol Cell Neurosci. 3, 383 (1992), Boularand et al., J. Biol. Chemistry 270, 3748 (1995))

ou

- Descarboxilase de dopa

(Maras et al., Eur. J. Biochem. 201, 385 (1991), Nayatsu, Neurosci. Res. 12, 315 (1991), Ichinose et al., Biochem. 31, 11546 (1992), Levantthai et al., Mol. Brain Res. 17, 227 (1993), Sumiichinose et al., J. Neurochem. 64, 514 (1995)).

c) Citoquinas e seus inibidores

Além disso é considerado como factor neuroespecífico uma sequência de ADN que codifica para proteínas que inibem ou neutralizam a acção neurotóxica de $TNF\alpha$. São exemplos desta categoria:

- $TGF\beta$

(Massague, Ann. Rev. Cell. Biol. 6, 597 (1990), Kondiah et al., J. Biol. Chem. 265, 1089 (1990), Garnier et al., J. Mol. Biol. 120, 97 (1978)). O $TGF\beta$ inibe a citotoxicidade mediada por $TNF\alpha$ (Merrill et al., J. Immunol. 151, 2132 (1993), Quin et al., Annals of Surgery 220, 508 (1994))

- Receptores de TNF solúveis

(Nophar et al., EMBO J. 9, 3269 (1990), Himmler et al., DNA Cell Biol. 2, 705 (1990), Aggarwal et al., Nature 318, 665 (1985), Gray et al., PNAS 87, 7380 (1990), Tartaglia et al., Immunol. Today 13, 151 (1992), Loetcher et al., Cell 61, 351 (1990), Schall et al., Cell 61, 361 (1990), Smith et al., Science 248, 1019 (1990), Goodwin et al., Mol. Cell. Biol. 11, 3020 (1991)).

Os receptores TNF neutralizam o $TNF\alpha$. Revisão: Olsson et al., Eur. Cytokine Netw. 4, 169 (1993).

- IL-10

(Moore et al., Science 248, 1230 (1990), Vieira et al., PNAS USA 88, 1172 (1991), Kim et al., J. Immunol. 148, 3618 (1992)).

A IL-10 inibe a formação de lFN gama, $TNF\alpha$, IL-2 e IL-4 (Schlaak et al., Scand. J. Immunol. 39, 209 (1994), Vieira et al., PNAS USA 88, 1172 (1991), Benjamin et al., Leuk. Lymph. 12, 205 (1994))

f l A

- Receptores IL-1 solúveis

* Receptor IL-1 I

(Sims et al., PNAS USA 86, 8946 (1989), Dower et al., J. Exp. Med. 162, 501 (1985), Chizzonite et al., PNAS 86, 8029 (1989)

* Receptor IL-1 II

(McMahan et al., EMBO J. 10, 2821 (1991), Sims et al., Science 241, 585 (1988)).

Os receptores IL-1 solúveis neutralizam a actividade de IL-1 (Colotta et al., Immunol. Today 15, 562 (1994), Sims et al., Clin. Immunol. Immunopath. 72, 9 (1994))

- Antagonista do receptor IL-1

(Eisenberg et al., Nature 343, 341 (1990), Carter et al., Nature 344 (633 (1990))

- Receptores IL-6 solúveis

(Mackiewicz et al., Cytokine 7, 142 (1995))

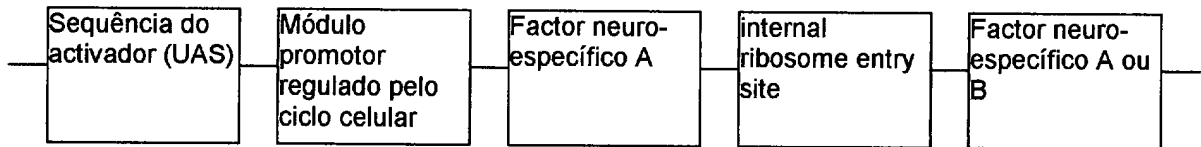
No sentido da presente invenção pode-se no entanto utilizar também como substância activa sequências de ADN de proteínas de fusão entre as citocinas indicadas, factores de crescimento ou a fracção extracelular dos receptores por um lado e a fracção Fc da imunoglobulina humana por outro. Este tipo de sequências de ADN e a sua preparação foram descritas na EP 0 464 633 A1.

2.4. Combinação de vários factores neuroespecíficos

É ainda objecto da presente invenção uma substância activa na qual existe uma combinação das sequências de ADN de factores neuroespecíficos iguais (A,A) ou de factores neuroespecíficos

f L A

diferentes (A,B). Para a expressão de seqüências de ADN duplas é de preferência interconectado o ADNC de um local interno de admissão no ribossoma ("internal ribosome entry site" (IRES)) como elemento regulador.



Este tipo de IRES foram descritos, por exemplo, por Montford e Smith (TIG 11, 179 (1995), Kaufman et al., Nucl. Acids Res. 19, 4485 (1991), Morgan et al., Nucl. Acids Res. 20, 1293 (1992, Dirks et al., Gene 128, 247 (1993), Pelletier e Sonenberg, Nature 334, 320 (1988) e Sugitomo et al., BioTechn. 12, 694 (1994).

Desta forma pode-se utilizar o ADNC da seqüência IRES do polivírus (posição $_ < 140$ a $_ > 630$ do UTR a 5' (Pelletier e Sonenberg, Nature 334, 320 (1988)) para acoplar o ADN da substância anti-inflamatória A (na extremidade 3') e o ADN da substância anti-inflamatória B (no terminal 5').

Uma substância activa deste género apresenta uma acção aditiva (A+A, A+B1) ou sinérgica conforme a combinação, no sentido da presente invenção.

2.5. Construção do vector

A construção de ADN de acordo com a presente invenção é completada num vector de um modo habitual para o especialista. Este vector pode ser de origem viral ou não viral. Por exemplo a construção de ADN pode ser introduzida num vector viral (ver a este respeito D. Jolly, Cancer Gene Therapy 1, 51 (1994)) ou completada num plasmídeo. Os vectores virais ou plasmídeos podem ser complexados com dispersões coloidais. Entre estes contam-se, por exemplo lipossomas (Farhood et al., Annals of the New York Academy of Sciences 716, 23 (1994)) ou então conjugados de polilisina-ligando (Curiel et al., Annals of the

f l A

New York Academy of Sciences 716, 36 (1994)).

2.6. Selecção do ligando

Os vectores virais e não virais podem ser completados com um ligando. Enquanto ligandos, por exemplo em conjugados polilisina-ligando, são preferidas substâncias que se ligam à superfície do endotélio. Entre estes contam-se os anticorpos ou fragmentos de anticorpos orientados contra estruturas de membrana de células do endotélio, tal como foram descritos por exemplo por Burrows et al. (Pharmac. Ther. 64, 155 (1994)) ou na EP 0 408 859 A2. Contam-se nesta categoria em especial os anticorpos contra receptores VEGF.

Prefere-se a utilização dos anticorpos monoclonais murinos sob forma humanizada. A humanização é realizada segundo o modo descrito por von Winter et al. (Nature 349, 293 (1991) e Hoogenboom et al. (Rev. Tr. Transfus. Hemobiol. 36, 19 (1993), Givol, Mol. Immunol. 28, 1379 (1991) ou Huston et al., Int. Rev. Immunol. 10, 195 (1993)).

Entre estes incluem-se, além disso, todas as substâncias que se ligam a estruturas de membrana ou receptores de membrana em células do endotélio. Por exemplo incluem-se os factores de crescimento ou os seus fragmentos ou sequências parciais destes, que se ligam a receptores expressos por células do endotélio, como por exemplo PDGF, bFGF, VEGF, TGF β (Pusztai et al., J. Pathol. 169, 191 (1993)). Além disso contam-se também substâncias que possuem manose em posição terminal e que se ligam ao receptor de manose-6-fosfato das células do endotélio (Perales et al., Eur. J. Biochem. 226, 225 (1994)).

Além disso, incluem-se também nesta categoria moléculas de adesão que se ligam a células do endotélio activadas e/ou proliferativas. Este tipo de moléculas de adesão, como por exemplo SLeX, LFA-1, MAC-1, LECAM-1 ou VLA-4 foi já descrito (Revisão por Augustin-Voss et al., J. Cell Biol. 119, 483

(1992), Pauli et al., *Cancer Metast. Rev.* 9, 175 (1990), Honn et al., *Cancer Metast. Rev.* 11, 353 (1992)).

Além disso, são consideradas como ligandos substâncias que se ligam à superfície de células gliais.

Fazem parte deste grupo anticorpos ou fragmentos de anticorpos orientados contra estruturas de membranas de células gliais, tal como foram comunicados, por exemplo, por Mirsky et al. (*Cell and Tissue Res.* 240, 723 (1985) von Coakham et al., (*Prog. Exp. Tumor Res.* 29, 57 (1985)) e von McKeever et al., (*Neurobiol.* 6, 119

(1991)). Destas estruturas de membrana fazem parte, além disso, moléculas de adesão neural, como N-CAM, em especial as suas cadeias de polipeptídeos C (Nybroe et al., *J. Cell Biol.* 101, 2310 (1985)).

Além disso, incluem-se nesta categoria todas as substâncias activas que se ligam a estruturas de membrana ou receptores de membrana, em células gliais. Por exemplo, incluem-se substâncias que possuem manose em posição terminal e se ligam ao receptor de manose-6-fosfato (Perales et al., *Eur. J. Biochem.* 226, 225 (1994), insulina e factor de crescimento semelhante a insulina (*insulin-like growth factor*) (Merril et al., *J. Clin. Endocrin. Metab.* 71, 199 (1990)), PDGF (Ek et al., *Nature* 295, 419 (1982)) e aqueles fragmentos destes factores de crescimento que se ligam aos receptores da membrana correspondentes.

2.7. Preparação da substância activa

A preparação da substância activa de acordo com a presente invenção é descrita de forma mais pormenorizada através dos exemplos que se seguem:

a) Construção do promotor quimérico de endotelina 1CDE-CHR-
-Inr

O promotor de endotelina-1 humana (posição ≤ -170 a ≥ -10) ou uma variante encurtada na caixa TATA (posição ≤ -170 a ≥ -40) são acoplados no seu terminal 3' com o terminal 5' do módulo CDE-CHR-Inr (posição ≤ -20 a $\geq +121$) do gene humano cdc25C (fig. 6). A acoplagem é realizada com auxílio de enzimas disponíveis no mercado e conhecidas do técnico.

b) Construção de um plasmídeo que contém o componente central da substância activa

O módulo repressor-unidade de transcrição da endotelina-1 quimérico preparado conforme descrito é acoplado no seu terminal 3' com o terminal 5' de um ADN que contém a área codificadora completa do antagonista-receptor IL-1 com 152 ácidos aminados de comprimento (posição do ADN ≤ 25 a ≥ 557 ; Eisenberg et al., Nature 343, 341 (1990)). Este ADN contém também a sequência de sinal necessária para uma secreção (25 ácidos aminados N-terminais). As unidades de controlo da transcrição e o ADN antagonista do receptor da IL-1 são clonados em pUC19/19 ou vectores do plasmídeo derivados de Bluescript, podendo ser utilizados directamente (Yovandich et al., Hum. Gene Ther. 6, 603 (1995)) ou em sistemas de dispersão coloidais para uma transferência in vivo.

Em alternativa as unidades de controlo da transcrição e o ADN do antagonista do receptor de IL-1 reunidos podem ser transferidos para vectores virais ou não virais correntes para o especialista.

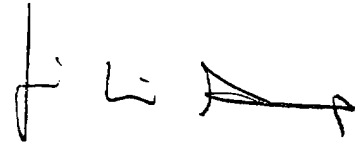
2.8. Eficácia da substância activa

Uma substância activa de acordo com a presente invenção permite, por aplicação local, por exemplo no sítio da lesão dos nervos ou por administração intracraniana ou subaracnoidal ou

f. L. A.

administração sistêmica, de preferência intravenosa ou intra-arterial, a segregação de factores neuroespecíficos de células proliferativas do endotélio ou células proliferativas gliais principalmente através do intensificador específico de tecidos e através do promotor basal. Este tipo de proliferações de células do endotélio ou de proliferações de células gliais são de esperar na área como reacção à lesão dos tecidos que causou simultaneamente a lesão dos nervos. A substância activa de acordo com a presente invenção garante portanto uma elevada concentração de factor neuroespecífico no local da lesão do nervo.

Uma vez que a substância activa promete segurança em elevado grau tanto através da uma especificidade das células como da especificidade do ciclo celular, pode ser utilizada mesmo em elevadas dosagens e, caso necessário, por várias vezes com intervalos de dias ou semanas para profilaxia ou terapia de lesões dos nervos.



Legendas das figs. 1 a 6:

Fig. 1

Sequência de nucleótidos de *cdc25C* - região do promotor com as posições de ligação de proteínas encontradas *in vivo* (rasto (*footprinting*) genómico de DMS; • (círculo a cheio): protecção constitutiva completa; ° (círculo vazio): protecção constitutiva parcial; * (asterisco): protecção específica de G₁ regulada pelo ciclo celular). CBS: *constitutive binding site* (local de ligação constitutivo); CDE: *cell cycle-dependent element* (elemento dependente do ciclo celular). As áreas cinzentas em fundo indicam as caixas Y_c (posições de ligação de NF-Y). As posições de partida são marcadas por quadrados a cheio.

Fig. 2

Desrepressão do promotor *cdc25C* específica em G₀ por meio de mutação do *cdc*.

Fig. 3

Representação esquemática da regulação do intensificador *cdc25C* por meio de CDE.

Fig. 4

Repressão específica de G₀/G₁ do intensificador de SV40 por meio de CDE.

Fig. 5

Homologias na área CDE-CHR e as caixas Y_c situadas em 5' em *cdc25C*, ciclina A e promotores *cdc2*

Fig. 6

Construção quimérica constituída por várias fracções do promotor humano da endotelina-1, do módulo promotor fundido em 3' com os elementos repressores CDE e CHR, bem como de um ADN para os antagonistas receptores de IL-1 (área codificadora completa posição ≤ 25 a ≥ 557 ; Eisenberg et al., Nature 343, 341 (1989)) como efector. Os dados das posições referem-se aos dados do sistema utilizado por Wilson et al., Mol. Cell. Biol. 10, 4845 (1990) para o gene da endotelina-1 ou por Lucibello et al., EMBO J. 14, 132 (1995) para cdc25C.

f l A

Quadro 1: Factores de crescimento neuronais

	Local de formação	Local de acção
Família dos factores de crescimento epidérmico "Epidermal growth factors"		
growth factor derivado de Schwanoma (SDGF)	Células de Schwann	Astrócitos Células de Schwann Fibroblastos
Família dos factores de crescimento epidérmico "Heparin binding growth factors"		
factor de crescimento ácido de fibroblastos (acidic-fibroblast growth factor (aFGF))	ubíquo	ubíquo
factor de crescimento básico de fibroblastos (basic-fibroblast growth factor (bFGF))	ubíquo	ubíquo
Família dos factores de crescimento de nervos "Nerve growth factors"		
nerve growth factor (NGF)	Células de Schwann Neurónios Melanócitos Neurónios colinérgicos no cérebro	Neurónios periféricos
factor neurotrófico derivado do cérebro (brain derived neurotrophic factor (BDNF))	Neurónios Células gliais	Neurónios dopaminérgicos no cérebro
Neurotrofina-3, neurotrofina-4 (NT-3, NT-4)	Vários tipos de células	Neurónios proprioceptivos periféricos
factor neurotrófico ciliar (Ciliary neurotrophic factor (CNTF))		Neurónios periféricos

Quadro 2: Papel de CDE e CHR na transcrição regulada pelo ciclo celular de cdc25 C, ciclina A e cdc2

Quadro 2

	<i>G₀</i>	Crescimento (<i>Growing</i>)	<i>Factor</i>
wt			
cdc25C	0,8	13,1	17,5
ciclina A	0,7	27,1	41,7
cdc2	1,0	41,2	41,2
mCDE (-13)			
cdc25C	7,6	11,6	1,5
ciclina A	13,4	23,9	1,8
cdc2	11,3	33,9	3,0
mCHR (-6/-3)			
cdc25C	14,4	21,0	1,5
ciclina A	15,5	28,3	1,8
cdc2	18,6	38,6	2,1

Os resultados das transfecções transientes em células HIH3T3 são representados como RLU/1000. mCDE: CDE mutado (pos. -13: G → T); mCHR: CHR mutado (pos. -6 a -3).

Lisboa, 28 de Abril de 2000

O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

h u A

REIVINDICAÇÕES

1. Substância activa para a profilaxia ou para a terapia de doenças do sistema nervoso central, caracterizada por conter uma construção de ADN que é constituída por uma sequência do activador, um módulo promotor regulado pelo ciclo celular e uma sequência de ADN para um factor neuro-específico.
2. Substância activa de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por o módulo promotor possuir os elementos CDE-CHR-Inr e conter as posições ≤ -20 a $\geq +30$ da área promotora cdc25C (sequência de nucleótidos (GCTGGCGGAAGGTTTGAATGGTCAACGCCTGCGGCTGTTGATATTCTTG), em que CDE significa o elemento dependente do ciclo celular "cell cycle dependent element" (sequência de nucleótidos TGGCGG), CHR significa a região de homologia do gene do ciclo celular "cell cycle gene homology region" (sequência de nucleótidos GTTTGAA) e Inr a posição de iniciação (posição +1) bem como as sequências vizinhas importantes para a iniciação, incluindo igualmente variantes com actividade funcional e mutantes do módulo promotor.
3. Substância activa de acordo com a reivindicação 1, caracterizada por conter uma sequência do activador que é regulada através de factores de transcrição formados nas células do endotélio ou em células gliais.
4. Substância activa de acordo com a reivindicação 2, caracterizada por conter como sequência do activador
 - o promotor de CMV, o intensificador de CMV ou o promotor de SV40 ou
 - a sequência do promotor para os transportadores de glucose-1 endoteliais específicos do cérebro, para a

f L A

endoglina, para o receptor VEGF 1 e 2, as quinases de tirosina de receptor til-1 ou til-2, o receptor B61, os ligandos B61 para endotelina, em especial endotelina B ou endotelina 1, para receptores de endotelina, para receptor de manose-6-fosfato, IL-1 α ou IL-1 β , receptor de IL-1, VCAM-1, factor de von Willebrand ou

- locais de ligação oligomerizados para factores de transcrição que são preferencial ou selectivamente activos em células do endotélio, como por exemplo GATA-2 com o seu local de ligação 5'-TTATCT-3' ou
- sequências dos promotores para a periaxina específica das células de Schwann, para sintetase de glutamina, a proteína específica da glia, a proteína das células gliais S100b, interleuquina-6, receptores de 5-hidroxi-triptamina, TNF α , IL-10 ou receptores do factor de crescimento semelhante a insulina ou
- a sequência do promotor de VEGF, a sequência do intensificador de VEGF ou a sequência de ADN de v-Src ou a sequência de ADN de c-Src que regulam o gene VEGF.

5. Substância activa de acordo com as reivindicações 1 a 3, caracterizada por a sequência de ADN codificar para o factor neuroespecífico de

- um factor de crescimento neuronal, em especial FGF, NGF, BDNF, NT-3, NT-4 ou CNTF ou
- TGF, um receptor de TNF solúvel, IL-10, um receptor de IL-1 solúvel ou um receptor de IL-6 solúvel ou os antagonistas do receptor de IL-1 ou uma proteína de fusão de uma citocina (p. ex. TGF β , IL-10 ou antagonista do receptor IL-1) ou um receptor de citocina solúvel (p. ex. receptor de TNF, receptor de IL-6 ou receptor de IL-1) com a fracção Fc da imunoglobulina humana ou

- uma hidroxilase de tirosina ou descarboxilase de dopa.

6. Substância activa de acordo com a reivindicação 1 a 5, caracterizada por conter as sequências de ADN de dois factores neuroespecíficos iguais ou diferentes, em que as duas sequências de ADN estão ligadas entre si através de uma sequência de ADN para o "*internal ribosome entry site*" (local interno de admissão no ribossoma).
7. Substância activa de acordo com a reivindicação 1 a 6, caracterizada por ser introduzida num vector.
8. Substância activa de acordo com a reivindicação 7, caracterizada por o vector ser um vírus.
9. Substância activa de acordo com a reivindicação 8, caracterizada por o vírus ser um retrovírus, um adenovírus, um vírus associado a adenovírus, um vírus de herpes simples ou um vírus de vaccinia.
10. Substância activa de acordo com a reivindicação 1 a 6, caracterizada por ser introduzida num plasmídeo.
11. Substância activa de acordo com a reivindicação 7 a 10, caracterizada por ser preparada num sistema de dispersão coloidal.
12. Substância activa de acordo com a reivindicação 11, caracterizada por o sistema de dispersão coloidal ser constituído por lipossomas.
13. Substância activa de acordo com a reivindicação 12, caracterizada por o sistema de dispersão coloidal ser constituído por ligandos de polilisina.
14. Substância activa de acordo com a reivindicação 7 a 13, caracterizada por ser completada num ligando que se liga a

f. l. A

estruturas de membrana de células do endotélio ou células gliais.

15. Substância activa de acordo com a reivindicação 14, caracterizada por o ligando

- ser um anticorpo policlonal ou monoclonal ou um fragmento de anticorpo respectivo que se liga com os seus domínios variáveis a estruturas de membrana de células do endotélio ou células gliais, ou
- ser uma substância que contém manose em posição terminal, uma citocina ou um factor de crescimento ou um fragmento ou uma sequência parcial respectivos que pode ligar em qualquer dos casos a receptores em células do endotélio ou células gliais.

16. Substância activa de acordo com a reivindicação 15, caracterizada por as estruturas de membrana

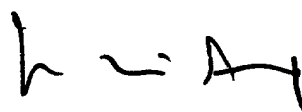
- constituírem um receptor para uma citocina ou um factor de crescimento, como IL-1, FGF, PDGF, VEGF (em especial FIT-1 e KDR), TGF β , insulina ou factor de crescimento tipo insulina (*Insulin-like Growth Factor* (ILGF)) ou
- constituírem uma molécula de adesão como SLeX, LFA-1, MAC-1, LECAM-1 ou VLA-4
- ou constituírem o receptor de manose-6-fosfato.

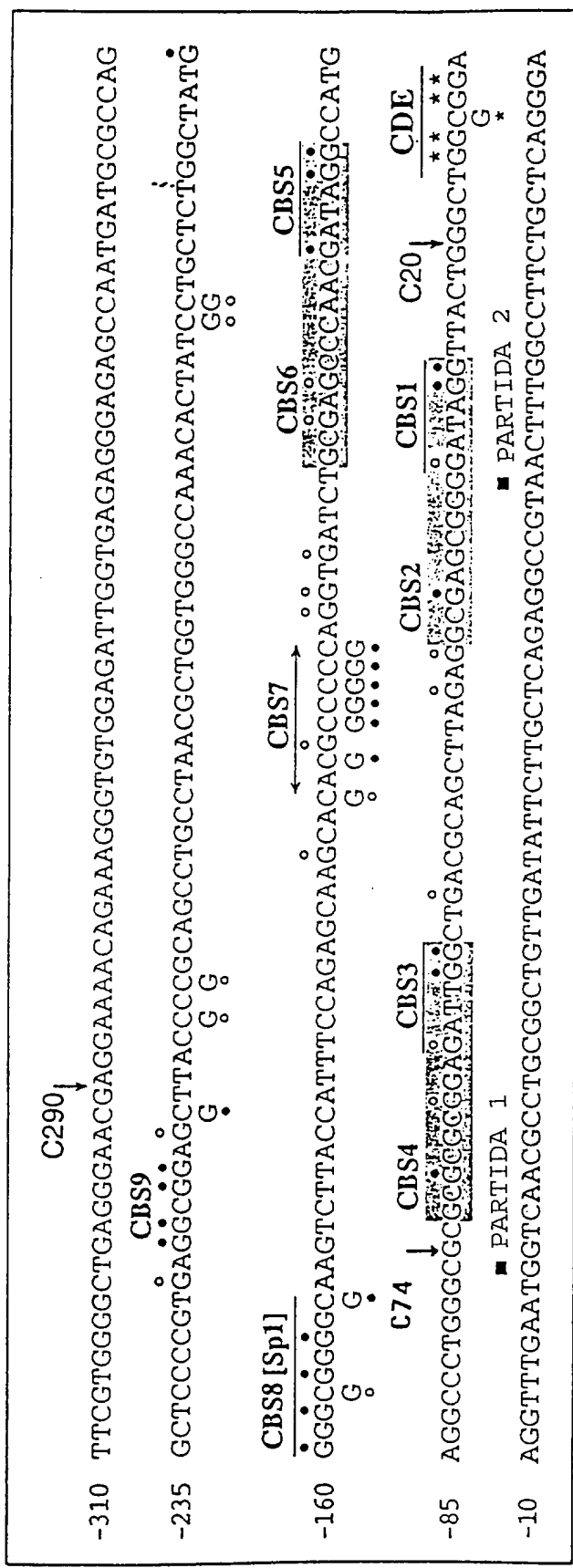
17. Substância activa de acordo com a reivindicação 1 a 16 num preparado medicinal para injeção por via intravenosa ou intra-arterial, para a aplicação local na região de um

trauma ou para injeção nos espaços ociosos do sistema nervoso central.

Lisboa, 28 de Abril de 2000

O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'L. A.', written in a cursive style.



T
 T
 T

Fig. 1

f l A

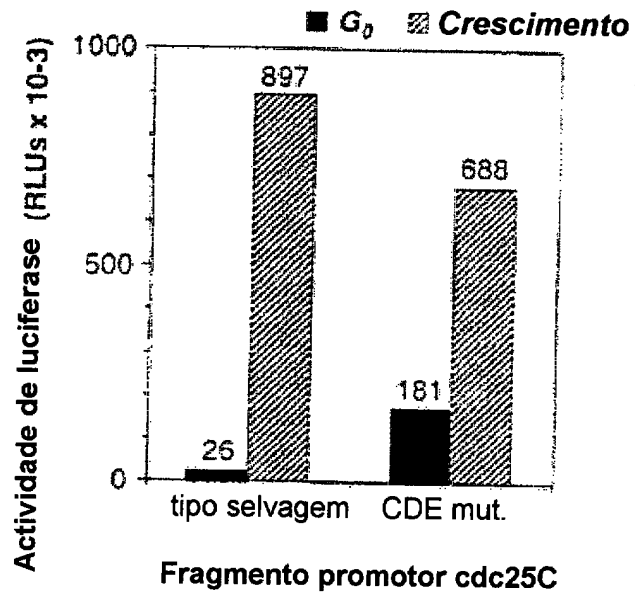


Fig. 2

Elementos intensificadores não específicos múltiplos

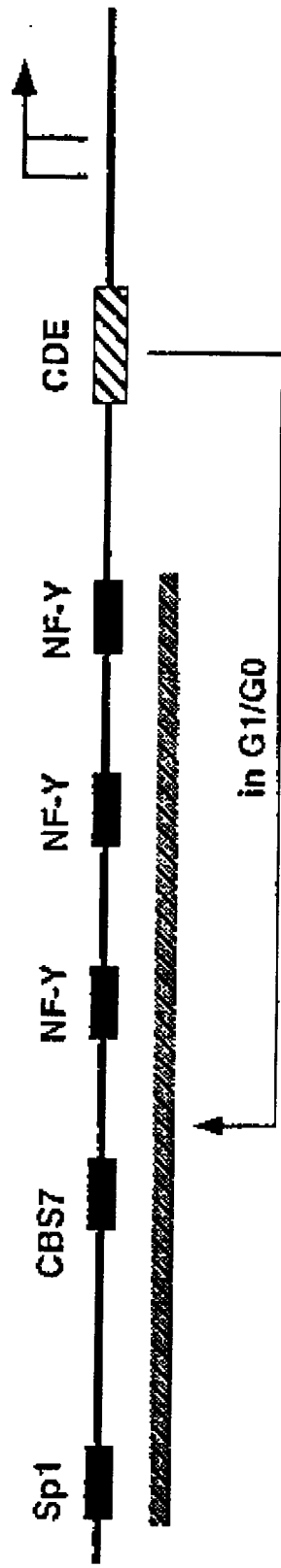


Fig. 3

1
5
1

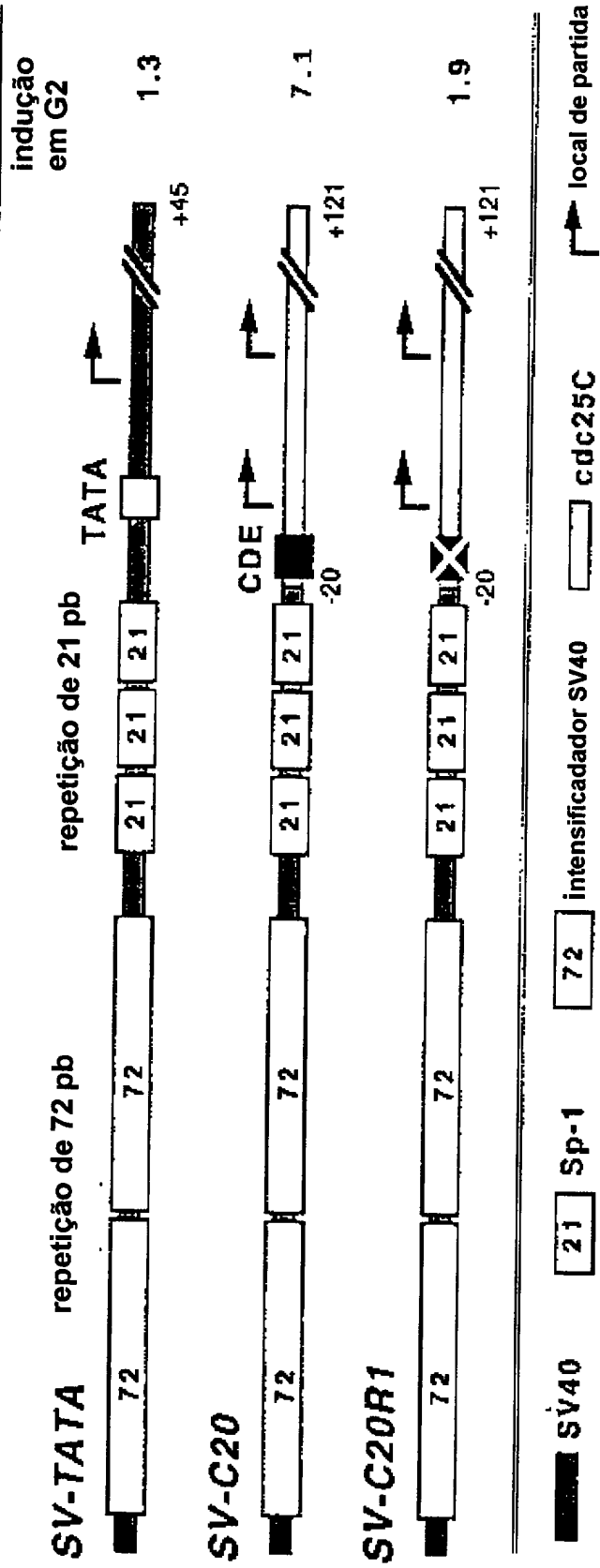
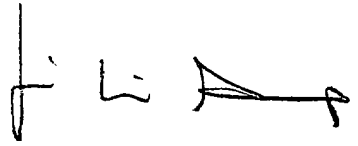
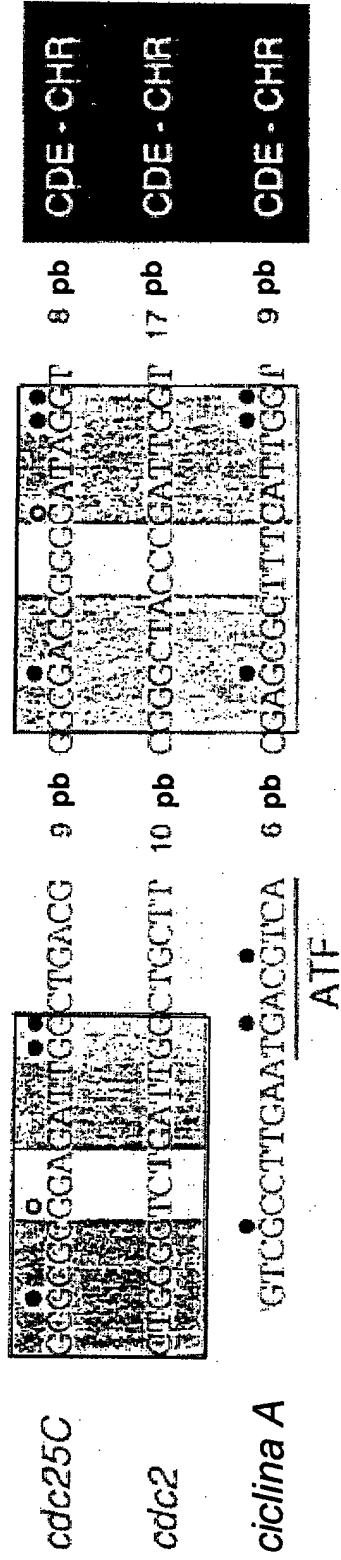


Fig. 4





F
E
I

Fig. 5

