

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0614419-5 A2**

(22) Data de Depósito: 15/08/2006
(43) Data da Publicação: 29/03/2011
(RPI 2099)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 7/00
C07K 14/47
A61K 38/18

(54) Título: **PEPTÍDEOS DERIVADOS DE GDNF**

(30) Prioridade Unionista: 16/08/2005 DK PA 2005 01153

(73) Titular(es): COPENHAGEN UNIVERSITY

(72) Inventor(es): Elisabeth Bock, Vladimir Berezin

(74) Procurador(es): Nellie Anne Daniel Shores

(86) Pedido Internacional: PCT DK2006000448 de 15/08/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/019860 de 22/02/2007

(57) Resumo: PEPTÍDEOS DERIVADOS DE GDNF A presente invenção relaciona-se aos fragmentos de peptídeos derivados das proteínas pertencendo à superfamília do TGE-beta, composições farmacêuticas compreendendo os referidos fragmentos de peptídeos e usos dos mesmos para tratamento de uma doença ou condição em que os efeitos de estimulação da diferenciação celular neuronal, sobrevivência celular neuronal, estimulação da plasticidade neural associada com aprendizagem e memória e/ou inibindo a resposta inflamatória são benéficas para tratamento.

"PEPTÍDEOS DERIVADOS DE GDNF"

Campos da Invenção

A presente invenção relaciona-se a fragmentos de peptídeos derivados das proteínas pertencendo à superfamília do TGF-beta, composições farmacêuticas compreendendo os referidos fragmentos e usos dos mesmos para o tratamento de uma doença ou condição em que os efeitos da estimulação da diferenciação celular neuronal, sobrevivência celular neuronal, estimulação da plasticidade neural associada com aprendizagem e memória e/ou inibição da resposta inflamatória são beneficiadas para tratamento.

Antecedente da Invenção

GDNF foi originalmente purificado e caracterizado no início da década 1990 como um fator neurotrófico que suporta a sobrevivência e diferenciação dos neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo, e na base das seqüências aminoácidas do GDNF, foi possível ser clone do gene GDNF (Lin et al, 1993). Neurturina (NRTN, também conhecido como NTN) foi isolado em 1996 baseados em sua habilidade de promover a sobrevivência de neurônios simpáticos (Kotzbauer et al, 1996). Subsequentemente, persepina (PSPN, também conhecidos como PSP) e artemina (ARTN, também conhecido como ART), foram clonados na base da homologia de seqüência (Milbrandt et al, 1998; Baloh et al, 1998). Supostamente, análises da Base de Dados do Genoma têm indicado a uma outra forma de descobrir outra família de ligantes GDNF funcionais (Airaksinen & Saarma, 2002).

Uma variedade de ações biológicas tem sido

relacionada para os GFLs, NRTN, PSPN, e ARTN, tipo GDNF, como promover a sobrevivência dos neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo (Lin *et al*, 1993; Milbrandt *et al*, 1998; Baloh *et al*, 1998a). A sobrevivência de várias outras subpopulações neuronais no SNC é suportada por GFLs, incluindo neurônios motores centrais (Milbrandt *et al*, 1998) e neurônios noradrenérgicos (Arenas *et al*, 1995). GDNF, NRTN, e ARTN também suporta a sobrevivência dos neurônios no SNP, incluindo simpático, parassimpático, sensorio (Lotbauer *et al*, 1996; Baloh *et al*, 1998), e neurônios antéricos (Hearn *et al*, 1998). Em adição para sua sobrevivência promovendo efeitos, o GFLs também promove diferenciação neuronal (Lin *et al*, 1993; Baloh *et al*, 1998a; Yan *et al*, 2003; Paratcha *et al*, 2003).

Como típico para proteínas secretadas, os quatro membros da família GDNF são sintetizados como pré pró-formas inativas. O peptídeo sinal é quebrado da pré pró-forma de GDNF, e pró-GDNF é secretada. Quebra adicional torna a pró-GDNF em GDNF madura de 134 aminoácidos longos. NRTN madura contém 100 aminoácidos, PSPN madura consiste de 96 aminoácidos, e ARTN madura contém 113 aminoácidos (Kotzbauer *et al*, 1996; Milbrandt *et al*, 1998; Baloh *et al*, 1998). Os GFLs são quite homólogos, dividindo de 53 a 64% de similaridade de seqüência. A identidade da(s) protease(s) quebrando os pró-GFLs de GFLs maduras tendo ainda ser determinada.

As seqüências de quatro GFLs revelam a existência de sete resíduos cisteína conservados dentro de proteínas

maduras. Esses resíduos são colocados em uma forma similar como os sete resíduos cisteína conservados encontrados em membros da superfamília do fator transformante de crescimento (TGF)- β . Portanto, embora eles mostrem menor que 20% de similaridade de sequência com os outros membros da família, os GFLs são considerados serem membros da superfamília do TGF- β , constituindo sua própria subfamília (Lin *et al*, 1993; Kotzbauer *et al*, 1996; Milbrandt *et al*, 1998; Baloh *et al*, 1998). Todos os membros da superfamília do TGF- β pertencem à cisteína nodal da superfamília do fator de crescimento nodal (Saarma & Sariola, 1999). As proteínas nesta família são caracterizadas por serem proteínas diméricas contendo um nodal topológico formado por três resíduos cisteína. Junto com dois aminoácidos adjacentes desses resíduos cisteína formam um anel covalente, através dos quais a terceira cisteína passa.

Sítios de ligação GFR α possíveis em GDNF têm sido investigados em dois estudos (Eket-jall *et al*, 1999; Baloh *et al*, 2000). O primeiro estudo identificou três aminoácidos carregados negativamente em dedo 1 e um dedo 2, que são críticos para ligação de GDNF para GFR α 1 (Eketjall *et al*, 1999). Esses resíduos são colocados na parte mais distal dos dedos, como são quatro aminoácidos hidrofóbicos (um no dedo 1, o resto no dedo 2) também mostrou ser crucial para ligação do GDNF a GFR α 1. Em adição, a região N-terminal flexível do GDNF é indicada ser de importância para ligação ao GFR α 1. Em contraste, os aminoácidos positivamente carregados concentrados em destilação, não parecem estar

envolvidos na ligação do GFR α 1 (Eketjall et al, 1999). Surpreendentemente, nenhum dos resíduos identificados no dedo 2 ou nenhum dos resíduos hidrofóbicos no dedo 1 foram requeridos para ligação do GDNF na presença de RET desde moléculas GDNF mutadas nessas posições foram ainda capazes de induzir fosforilação de RET. Deleção da região N-terminal não inibe também a fosforilação de RET. Os autores propuseram a existência de dois sítios de ligação distintos para GDNF em GFR α 1. Um sítio de ligação consistindo de receptores GFR α 1 sozinhos podem ser utilizados para ligação de GDNF na ausência de RET, enquanto outro sítio de ligação consistindo de resíduos de GFR α 1 e RET podem vir a uso, quando GDNF interage com um complexo GFR α 1-RET pré-associado (Eketlajj et al, 1999).

No estudo por Baloh et al (2000), foi encontrado que duas regiões no dedo 2 foram importantes para ativação induzida por GDNF de RET através de GFR α 1, onde o N-terminal flexível não foi requerido. Experimentos similares mostraram que as duas regiões correspondentes em NRTN e ARTN foram importantes para a habilidade desses GFLs de ativar RET através de GFR α 2 e GFR α 3, respectivamente. Para NRTN e ARTN, regiões compreendendo a maior parte N-terminal da grande α -hélice foram também requeridas para ativação de RET (Balch et al, 2000).

Em resumo, a existência de mais que um sítio ligante em GFLs está indicado de dois estudos, e embora eles pareçam ter alguma discrepância a cerca de qual dedo é mais importante, o trabalho de Eketjall et al (1999) e Baloh et

al (2000) destaca a importância das regiões dede na ligação de GDNF de seu complexo receptor e subsequentemente ativação de RET.

O entendimento da interação entre NCAM e GDNF/
 5 GFR α 1 é ainda muito limitado, mas estudos têm indicado que ambos GDNF e GFR α 1 ligam a NCAM, e que o ligante de NCAM a GDNF é grandemente potenciado em presença de GFR α 1 (Paratcha et al, 2003). Além disso, no mesmo estudo foi sugerido que o crescimento do neurito induzido por GDNF ocorre
 10 independentemente do FGFR e provavelmente também independentemente de interações trans NCAM homofílicas. A interação GDNF- GFR α -NCAM no fato pareceu interferir com interações NCAM homofílicas (Paratcha et al, 2003).

Referências

15 Airaksinen MS, Saarma M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. Nat. Rev. Neurosci. 2002, 3:222-94.

Arenas E, Trupp M, Akerud P, Ibanez CF. GDNF prevents degeneration and promotes the phenotype of brain
 20 noradrenergic neurons in vivo. Neuron. 1995; 15: 1465-73.

Balch RH, Tansey MG, Lampe PA, Fahmer TJ, Enomoto H, Simburger KS, Leitner ML, Araki T, Johnson EM Jr, Milbrandt J. Artemin, A novel member of the GDNF ligand family, supports peripheral and central neurons and signals
 25 through the GFR α 3-RET receptor complex. Neuron. 1998;21:1291-302.

Baloh RH, Tansey MG, Johnson EM Jr, Milbrandt J. Functional mapping of receptor specificity domains of glial

cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) family ligands and production of GFR α 1 RET-specific agonists. J. Biol. Chem. 2000; 275:3412-20.

Eketjall S., Fainzilber M, Murray-Rust J, Ibanez
5 CF. Distinct structural elements in GDNF mediate binding to GFR α 1 and activation of the GFR α 1-c-RET receptor complex. EMBO J. 1999 1; 18:5901-10.

Hearn CJ, Murphy M, Newgreen D. GDNF and ET-3
differentially modulate the numbers of avian enteric neural
10 crest cells and enteric neurons in vitro. Dev. Biol. 1998; 197:93-105.

Kotzbauer PT, Lampe PA, Heuckeroth RO, Golden JP, Creedon DJ, Johnson EM Jr, Milbrandt J. Neurtin, a relative
of glial-cell-line-derived neurotrophic factor. Nature.
15 1996; 384:467-70.

Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. Science. 1993; 260:1130-2.

Milbrandt J, de Sauvage FJ, Fahrner TJ, Baloh RH,
20 Leitner ML, Tansey MG, Lampe PA, Heuckeroth RO, Kotzbauer PT, Simburger KS, Golden JP, Davies JA, Vejsada R, Kato AC, Hynes M, Sherman D, Nishimura M, Wang LC, Vandlen R, Moffat B, Klein RD, Poulsen K, Gray C, Garces A, Johnson Em Jr, et al. Persephin, a novel neurotrophic factor related to GDNF
25 and neurturin. Neuron. 1998; 20:245-53.

Paratcha G, Ledda F, Ibanez CF. The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. Cell, 2003; 113:867-79.

Ronn LC, Ralets I, Hartz BP, Bech M, Berezin A, Berezin V, Moller A, Bock E. A simple procedure for quantification of neurite outgrowth based on stereological principles. J. Neurosci. Methods. 2000;100:25-32.

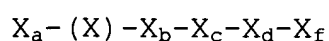
5 Saarma M, Sariola H. Other neurotrophic factors: glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). Microsc. Res. Tech. 1999;45:292-302.

 Yan H, Newgreen DF, Young HM. Developmental changes in neurite outgrowth responses of dorsal root and
10 sympathetic ganglia to GDNF, neurturin, and artemin. Dev. Dyn. 2003;227:395-401.

Resumo da Invenção

A presente invenção revela fragmentos de peptídeos curtos de proteínas pertencendo a superfamília do TGF-beta, em particular GDNF, NRTN, PSPN, ARTN, TGF-beta 1, TGF-beta
15 2, TGF-beta 3 e TGF-beta 4, capazes de estimular a diferenciação celular neuronal, sobrevivência celular neuronal e plasticidade neural associadas com aprendizagem e memória e capacidade de inibição da resposta inflamatória.
20 De acordo com a invenção, todos os fragmentos peptídicos descritos aqui são estruturalmente similares, em outras palavras eles compreendem um motivo aminoácido comum que é um pré-requisito para atividade biológica de peptídeos.

Então, o primeiro aspecto da presente invenção
25 relaciona-se a um peptídeo tendo uma sequência de 6 a 22 resíduos aminoácidos contíguos compreendendo o motivo de fórmula:



em que

X_a é resíduo aminoácido D, E, A ou G,

(x) é uma sequência de 2-3 resíduos aminoácidos ou um resíduo aminoácido único selecionado do grupo consistindo de resíduos aminoácidos A, D, E, G, I, K, L, P, Q. S. T e V,

X_b é resíduo aminoácido Y ou H, ou um resíduo aminoácido hidrofóbico, e pelo menos um de X_c , X_d ou X_f é um resíduo aminoácido carregado ou hidrofóbico.

A invenção revela sequências peptídicas particulares derivadas de GDNF, NRTN, PSPN, ARTN, TGF-beta 1, TGF-beta 2, TGF-beta 3 e TGF-beta 4, em que todos compreendem o motivo do acima e são capazes de estimular a diferenciação celular neuronal, sobrevivência celular neuronal e/ou plasticidade neural associadas com aprendizagem e memória.

Adicionalmente, a invenção relaciona-se a um composto compreendendo uma sequência peptídica do motivo acima, em particular um composto compreendendo uma sequência derivada de GDNF, NRTN, PSPN, ARTN, TGF-beta 1, TGF-beta 2, TGF-beta 3 ou TGF-beta 4.

Então, a invenção relaciona-se a usos de sequências peptídicas relvadas e compostos compreendendo as mesmas para a fabricação de um medicamento e/ou para a produção de um anticorpo. A invenção também se relaciona as composições farmacêuticas compreendendo peptídeos, compostos e/ou anticorpos da invenção.

Métodos de estimulação a diferenciação celular de neuritos, sobrevivência celular neuronal e/ou plasticidade

neuronal associada com aprendizagem e memória compreendendo uso de peptídeos, compostos, anticorpos e/ou composições farmacêuticas da invenção estão também no objetivo da proteção, bem como métodos de tratamento compreendendo a administração a um indivíduo em necessidade de uma quantidade efetiva de um peptídeo, composto, anticorpo ou composição farmacêutica da invenção.

Descrição dos Desenhos

Figura 1: crescimento de neurito induzido por GDNF nos neurônios do hipocampo primário. Células foram estimuladas com GDNF (1, 5, 10, 50 e 100 mg/mL) por 24 horas. Crescimento de neurônios no meio sozinho serviu como controle. Para o controle absoluto do comprimento do crescimento do neurito foram $11,65 \mu\text{m} \pm 1,57 \mu\text{m}$. Resultados são expressos como porcentagem de controle e apresentados como $\text{média} \pm \text{EP}$. A figura é baseada nos resultados de 5 experimentos independentes. A média do comprimento do crescimento do neurito foi comparada utilizando ANOVA de fator único para medidas repetidas. $F(5, 24) = 5,903$, $p < 0,01$, mostra que há um efeito do tratamento de GDNF estatisticamente significativo geral.

Figura 2: G1 não induz crescimento de neurito nos neurônios do hipocampo primário. Células foram estimulados com G1 (0,3, 1, 3, 9, e 27 $\mu\text{g/mL}$) por 24 horas. Neurônios crescidos em meio sozinho serviram como controle. Para controles o crescimento absoluto do crescimento do neurito foi $11,68 \mu\text{m} \pm 2,20 \mu\text{m}$ (A) ou $11,00 \mu\text{m} \pm 0,94 \mu\text{m}$ (B). Resultados são expressos como porcentagem de controle e

apresentados como média $\pm$ EP. A figura é baseada nos resultados de 5 (A) ou 4 (B) experimentos independentes. As médias dos comprimentos de crescimento de neurito foram comparadas utilizando ANOVA de fator único para medidas repetidas. $F(5, 24) = 0,4873$, $p=0,7823$, mostra que o efeito geral do tratamento G1 não é significativamente estatístico.

Figura 3: Crescimento de neurito induzido por G2 nos neurônios do hipocampo primário. Células foram estimuladas com G2 (0,1, 0,3, 1, 3, e 9 $\mu\text{g/mL}$) por 24 horas. O crescimento de neurônios no meio sozinho serviu como controle. Para controles o crescimento absoluto do crescimento de neurito foi $11,50 \mu\text{m} \pm 2,20 \mu\text{m}$. Resultados são expressos como porcentagem de controle e apresentada como média $\pm$ EP. A figura é baseada nos resultados de 4 experimentos independentes. A média dos comprimentos do crescimento de neuritos foi comparada utilizando ANOVA de fator único para medidas repetidas. $F(5, 18) = 91,91$, $p<0,0001$, mostra que há um efeito estatístico significativo geral do tratamento G2. O efeito das concentrações individuais de G2 foi comparado ao controle utilizando o pós-teste com teste de comparações múltiplas Tukeys.

Figura 4: G3 não induz crescimento de neurito em neurônios do hipocampo primário. Células foram estimuladas com G3 (0,3, 1, 3, 9, e 27 $\mu\text{g/mL}$) por 24 horas. Neurônios crescidos em meio sozinho serviram como controle. Para controles do crescimento absoluto do crescimento de neuritos foi $11,68 \mu\text{m} \pm 2,20 \mu\text{m}$ (A) ou $11,00 \mu\text{m} \pm 0,94 \mu\text{m}$ (B). Resultados são expressos com porcentagem de controle e

apresentados como médias $\pm$ EP. A figura é baseada nos resultados de 5 (A) ou 4 (B) experimentos independentes. A média dos comprimentos de crescimento de neurito foi comparada utilizando ANOVA de fator único para medidas repetidas. $F(5, 18) = 1,710$, $p=0,1833$, mostra que o efeito geral do tratamento G3 não é estatisticamente significativo.

Figura 0: crescimento do neurito induzido por GDNF no crescimento de neurônios do hipocampo em co-cultura com fibroblastos controles ou fibroblastos expressando NCAM. Neurônios foram crescidos em cima de ou fibroblastos controles (curva preta) ou fibroblastos expressando NCAM (curva vermelha) e estimulados com GDNF (1, 5, 10, 50, e 100 ng/mL) por 24 horas. Crescimento de neurônios no meio sozinho serviu como controles. Resultados são expressos como porcentagem de controle (neurônios não estimulados nos fibroblastos controles) e apresentado como média $\pm$ EP. Para controles no crescimento absoluto de fibroblastos controle do crescimento de neurito foi $38,97 \mu\text{m} \pm 0,21 \mu\text{m}$. A figura é baseada nos resultados de 4 experimentos independentes. As médias do comprimento do crescimento de neurito foram comparadas utilizando ANOVAs de fator único separadas para medidas repetidas. $F(5, 18) = 27,33$, $p<0,0001$, mostra que tem um efeito significativo geral do tratamento de GDNF para crescimento dos neurônios nos fibroblastos controles. $F(5,18) = 9,967$, $p<0,001$ mostra que existe um efeito significativo geral de tratamento GDNF para crescimento de neurônios em fibroblastos expressando NCAM. O efeito das concentrações individuais de GDNF foi comparado ao controle adequado

utilizando teste de comparações múltiplas Tukeys. * pretas indicam valores de p para comparação de crescimento de células não estimuladas em fibroblastos controles, enquanto * vermelho indica valores de p para comparação ao

5 crescimento de células não estimuladas em fibroblastos expressando NCAM. Os dois controles comparados utilizando um teste t pareado, que mostrou que eles são estatisticamente significativamente diferentes (valor de p indicado por + preta). Para cada concentração a diferença entre crescimento

10 de neurito no crescimento de neurônios nos fibroblastos controles e no crescimento de neurônios nos fibroblastos expressando NCAM foi calculado e expresso como porcentagem de controle (neurônios não estimulados em fibroblastos controles) (curva azul). ANOVA de fator único para medidas

15 repetidas mostrou que as diferenças médias não são todas as mesmas ($F(5, 18) = 5,835, p < 0,05$). A diferença nas concentrações individuais de GDNF foi comparada à diferença de dois controles adequados (o crescimento do neurito mediado por NCAM) utilizando o pós-teste com teste de

20 comparações múltiplas de Tukeys. * azuis indicam valores de p.

Figura 6: G1 interfere com crescimento de neurito induzido por NCAM em crescimento de neurônios de hipocampo em co-cultura com fibroblastos controles ou fibroblastos

25 expressando NCAM (curva vermelha) e estimulada com G1 (0,3, 1, 3, 9, 27 e 81 $\mu\text{g/mL}$) por 24 horas. Crescimento de neurônios em meio sozinho serviu como controles. Resultados são expressos como porcentagens de controle (neurônios não

estimulados nos fibroblastos controle) e apresentados como médias $\pm$ EP. Para controles no comprimento absoluto fibroblastos de controle de crescimento de neurito foram $34,64 \mu\text{m} \pm 0,63 \mu\text{m}$ para. A figura é baseada nos resultados

5 de 4 experimentos independentes. As médias de comprimento de crescimento de neurito foram comparadas utilizando ANOVAs de fator único separada para medidas repetidas. $F(4, 15) = 1,581$, $p=0,2422$, mostra que não existe efeito significativo geral do tratamento de G1 para crescimento de neurônios nos

10 fibroblastos controles. $F(4, 15) = 10,45$, $p<0,001$ mostra que existe um efeito significativo estatístico geral do tratamento G1 para crescimento de neurônio nos fibroblastos expressando NCAM. Este efeito parece ser inibitório em altas concentrações de G1. O efeito das concentrações individuais

15 de G1 foi comparado ao controle adequado utilizando o pós-teste com teste de comparações múltiplas de Tukeys. * vermelhos indicam valores de p para comparação do crescimento de células não estimuladas em fibroblastos expressando NCAM. Os dois controles foram comparados

20 utilizando um teste t pareado, que mostrou que eles são estatisticamente significante diferente (valor p indicado por + preta). Para cada concentração a diferença entre o crescimento de neurito no crescimento de neurônios nos fibroblastos controles e em crescimento de neurônios nos

25 fibroblastos expressando de NCAM foi calculado e expresso como porcentagem de controle (neurônios não estimulados em fibroblastos controles) (curva azul). ANOVA de fator único para medidas repetidas mostraram que a média de diferenças

não são todos os mesmos ($F(4, 15) = 3,389$, $p < 0,05$). A diferença em concentrações individuais de GDNFp2 foi comparada com a diferença de dois controles utilizando o pós-teste com teste de comparações múltiplas de Tukeys. * azuis indicam calores de p.

Figura 7: crescimento de neurito induzido por G2 em crescimento de neurônios de hipocampo em co-cultura com fibroblastos controles ou fibroblastos expressando NCAM. Neurônios foram crescidos em cima de ou fibroblastos controles (curva preta) ou fibroblastos expressando NCAM (curva vermelha) e estimulado com (G2 (0,1, 0,3, 1, 3, e 9 $\mu\text{g/mL}$) por 24 horas. Neurônios crescidos em meio sozinho serviram como controles. Resultados são expressos como porcentagem de controle (neurônios não estimulados em fibroblastos controles) e apresentados como médias $\pm$ EP. Para controles no comprimento absoluto de fibroblastos controles do crescimento neurito foi $38,74 \mu\text{m} \pm 0,47 \mu\text{m}$ para. A figura é baseada nos resultados de 4 experimentos independentes. A média de comprimentos de crescimento de neurito foram comparadas utilizando ANOVAs de fator único separados para medidas repetidas. $F(5, 18) = 81.76$, $p < 0,0001$, mostra que existe um efeito significativo geral do tratamento G2 para neurônios crescidos nos fibroblastos controles. $F(5,18) = 176,6$, $p < 0,0001$ mostra que existe um efeito significativo geral do tratamento G2 para o crescimento dos neurônios em fibroblastos expressando NCAM. O efeito das concentrações individuais de G2 foi comparado ao controle adequado utilizando pós-teste com teste de comparações

múltiplas de Tukeys. * pretos indicam valores de p para comparação com o crescimento de células não estimuladas em fibroblastos controles, enquanto * vermelhos indicam valores de p para comparação do crescimento de células não estimuladas em fibroblastos expressando NCAM. Os dois controles foram comparados utilizando um teste t pareado, que mostrou que eles são estatisticamente significativamente diferentes (valores de p indicados por + preta). Para cada concentração a diferença entre o crescimento do neurito no crescimento de neurônios nos fibroblastos controles e em neurônios em fibroblastos expressando NCAM foram calculados e expressos como porcentagem de controle (neurônios não estimulados em fibroblastos controles) (curva azul). ANOVA de fator único para medidas repetidas mostrou que as médias de diferenças não são todas as mesmas ($F_{(5,18)} = 3,761$, para $p < 0,05$). A diferença nas concentrações individuais de GDNF ou GDNFp1 foi comparada para a diferença de dois controles adequados (o crescimento de neurito mediada por NCAM) utilizando o pós-teste com teste de comparações múltiplas de Tukeys. *azuis indicam valores de p.

Figura 8: G3 interfere com crescimento de neurito induzido por NCAM no crescimento neurônios de hipocampo em co-cultura com fibroblastos controles ou fibroblastos expressando NCAM. Neurônios foram crescidos em cima de ou fibroblastos controles (curva preta) ou fibroblastos expressando NCAM (curva vermelha) e estimulado com G3 (0,3, 1, 3, 9, 27 e 81 $\mu\text{g/mL}$) por 24 horas. Neurônios crescidos em meio sozinho serviram como controles. Resultados são

expressos como porcentagem de controle (neurônios não estimulados em fibroblastos controles) e apresentados como médias $\pm$ EP. Para controles no comprimento absoluto de fibroblastos controles do crescimento neurito foram $34,20 \mu\text{m} \pm 0,68 \mu\text{m}$. A figura é baseada nos resultados de 4 experimentos independentes. A média de comprimentos de crescimento de neurito foram comparadas utilizando ANOVAs de fator único separados para medidas repetidas. $F(4, 15) = 2,440$, $p < 0,1039$, mostra que não existe um efeito significativo geral do tratamento GDNFp3 para neurônios crescidos nos fibroblastos controles. $F(4,15) = 5,967$, $p < 0,01$ mostra que existe um efeito significativo estatístico geral do tratamento G3 para o crescimento dos neurônios em fibroblastos expressando NCAM. Este efeito parece ser inibitório em concentrações mais altas de G3. O efeito das concentrações individuais de G3 foi comparado ao controle adequado utilizando pós-teste com teste de comparações múltiplas de Tukeys. * vermelhos indicam valores de p para comparação com o crescimento de células não estimuladas em fibroblastos expressando NCAM. Os dois controles foram comparados utilizando um teste t pareado, que mostrou que eles são estatisticamente significativamente diferentes (valores de p indicados por + preta). Para cada concentração a diferença entre o crescimento do neurito no crescimento de neurônios nos fibroblastos controles e em crescimentos de neurônios em fibroblastos expressando NCAM foram calculados e expressos como porcentagem de controle (neurônios não estimulados em fibroblastos controles) (curva azul). ANOVA

de fator único para medidas repetidas mostrou que as médias de diferenças não são todas as mesmas ($F(4,15)=1,314$, $p=0,3199$). A diferença nas concentrações individuais de GDNFp2 foi comparada para a diferença de dois controles
 5 utilizando o pós-teste com teste de comparações múltiplas de Tukeys. *azuis indicam valores de p.

Figura 9: Envolvimento de NCAM no crescimento de neurito mediado por GDNF ou G2; Neurônios hipocampais transfectados com cyt-NCAM-A, cyt-NCAM-B ou vetor vazio
 10 foram crescidos em fibroblastos controles e estimulados com 10 ng/mL de GDNF ou 3 µg/mL de GDNFp1 por 18 horas. Meio sozinho foi adicionado aos controles. ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

Figura 10: Envolvimento de NCAM no crescimento de neurito mediado por GDNF ou G2. Neurônios hipocampais
 15 transfectados com cyt-NCAM-A, cyt-NCAM-B ou vetor vazio foram crescidos em fibroblastos expressando NCAM e estimulados com 10 ng/mL de GDNF ou 3 µg/mL de GDNFp1 por 18 horas. Meio sozinho foi adicionado aos controles. ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

Figura 11: O inibidor PP2 Fyn-quinase diminui o crescimento do neurito induzido por GDNF nos neurônios do hipocampo. Neurônios foram crescidos em cima de ou
 20 fibroblastos controles (curva preta) ou fibroblastos expressando NCAM (curva vermelha). 10 ng/mL de GDNF foi
 25 utilizado para estimulação, e neurônios foram incubados com PP2 (0,2, 1, 5, e 25 µM) por 24 horas. Neurônios estimulados com GDNF, mas sem PP2 serviram como controles positivos. Crescimento de neurônios em meio sozinho serviram como

controles negativos, e são indicados pelos círculos pretos e vermelhos não conectados às curvas. Resultados são expressos como porcentagem de controle negativo (neurônios não estimulados nos fibroblastos controles) e apresentados como médias $\pm$ EP. A figura é baseada nos resultados de 6 experimentos independentes. A média dos comprimentos de neuritos foram comparadas utilizando ANOVAs de fator único separados. *** e +++ $p < 0,001$ quando comparados aos controles correspondentes.

Figura 12: O inibidor PP2 Fyn-quinase diminui o crescimento do neurito induzido por G2 nos neurônios do hipocampo. Neurônios foram crescidos em cima de ou fibroblastos controles (curva preta) ou fibroblastos expressando NCAM (curva vermelha). 3 $\mu\text{g/mL}$ de G2 foi utilizado para estimulação, e neurônios foram incubados com PP2 (0,2, 1, 5, 25 e 100 μM para) por 24 horas. Neurônios estimulados com G2, mas sem PP2 serviram como controles positivos. Crescimento de neurônios em meio sozinho serviram como controles negativos, e são indicados pelos círculos pretos e vermelhos não conectados às curvas. Resultados são expressos como porcentagem de controle negativo (neurônios não estimulados nos fibroblastos controles) e apresentados como médias $\pm$ EP. A figura é baseada nos resultados de 6 experimentos independentes. A média dos comprimentos de neuritos foram comparadas utilizando ANOVAs de fator único separados. *** e +++ $p < 0,001$ ou ++++ $p < 0,0001$ quando comparados aos controles correspondentes.

Figura 13: O inibidor de FGFR SU5402 diminui o

crescimento do neurito induzido por GDNF nos neurônios do hipocampo. Neurônios foram crescidos em cima de ou fibroblastos controles (curva preta) ou fibroblastos expressando NCAM (curva vermelha). 10 ng/mL de GDNF foi utilizado para estimulação, e neurônios foram incubados com SU5402 (1, 5, e 25 μ M). Neurônios estimulados com GDNF, mas sem SU5402 serviram como controles positivos. Neurônios crescidos em meio sozinho serviram como controles negativos, e são indicados pelos círculos pretos e vermelhos não conectados às curvas. Resultados são expressos como porcentagem de controle negativo (neurônios não estimulados nos fibroblastos controles) e apresentados como médias $\pm$ EP. As médias de comprimento do crescimento de neurito foram comparadas utilizando ANOVAs de fator único. * pretas indicam valores de p para comparação ao crescimento do controle positivo nos fibroblastos controles, enquanto * vermelhos indicam valores de p para comparação com o crescimento do controle positivo nos fibroblastos expressando NCAM. Os dois controles negativos foram comparados utilizando um teste t pareado, que mostrou que eles são estatisticamente significativamente diferentes (valor de p indicado por + preta).

Figura 14: O inibidor de FGFR SU5402 diminui o crescimento do neurito induzido por G2 nos neurônios do hipocampo. Neurônios foram crescidos em cima de ou fibroblastos controles (curva preta) ou fibroblastos expressando NCAM (curva vermelha). 3 μ g/mL de GDNFp1 foi utilizado para estimulação, e neurônios foram incubados com

SU5402 (1, 5, 25, e 100 μ M para) por 24 horas. Neurônios estimulados com G2, mas sem SU5402 serviram como controles positivos. Neurônios crescidos em meio sozinho serviram como controles negativos, e são indicados pelos círculos pretos e vermelhos não conectados às curvas. Resultados são expressos como porcentagem de controle negativo (neurônios não estimulados ou fibroblastos controles) e apresentados como médias $\pm$ SEM. As médias de comprimento do crescimento de neurito foram comparadas utilizando ANOVA de fator único. O efeito de concentrações individuais de SU5402 foi comparado ao controle positivo utilizando pós-teste com teste de comparações múltiplas de Tukeys. * pretas indicam valores de para comparação ao crescimento do controle positivo nos fibroblastos controles, enquanto * vermelhos indicam valores de p para comparação com o crescimento do controle positivo nos fibroblastos expressando NCAM. Os dois controles negativos foram comparados utilizando um teste t pareado, que mostrou que eles são estatisticamente significativamente diferentes (valor de p indicado por + preta).

Figura 15: Transfecção com FGFR dominante negativo diminui crescimento de neurito mediada por GDNF ou G2. Neurônios do hipocampo transfectados com dnFGFR, wtFGFR ou vetor vazio foram crescidos nos fibroblastos controles e estimulados com 10 ng/mL de GDNF ou 3 μ g/mL de GDNFp1 por 18 horas. Médio sozinho foi adicionado aos controles. A figura é baseada em resultados de 5 experimentos independentes. Avaliação estatística foi feita por aplicação do teste t pareado. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$, quando comparado aos

controles correspondentes.

Figura 16: Transfecção com FGFR dominante negativo diminui crescimento de neurito mediada por GDNF ou G2. Neurônios do hipocampo transfectados com dnFGFR, wtFGFR ou
 5 vetor vazio foram crescidos nos fibroblastos expressando NCAM e estimulados com 10 ng/mL de GDNF ou 3 µg/mL de GDNFp1 por 18 horas. Médio sozinho foi adicionado aos controles. A figura é baseada em resultados de 5 experimentos independentes. Avaliação estatística foi feita por aplicação
 10 do teste t pareado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, quando comparado aos controles correspondentes.

Figura 17: Efeito da artemina no crescimento do neurito de neurônios granulares cerebelares (CGN). * $p < 0,05$, quando comparado ao controle não tratado.

15 Figura 18: Efeito do peptídeo A1 no crescimento do neurito de CGN. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, quando comparado ao controle não tratado.

Figura 19: Efeito do peptídeo A2 no crescimento do neurito de CGN. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, e
 20 **** $p < 0,0001$, quando comparado ao controle não tratado.

Figura 20: Efeito do peptídeo A3 no crescimento do neurito de CGN. *** $p < 0,001$, e **** $p < 0,0001$, quando comparado ao controle não tratado.

Figura 21: Efeito de neurturina no crescimento do
 25 neurito de CGN. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$, quando comparado ao controle não tratado.

Figura 22: Efeito do peptídeo N1 no crescimento do neurito de CGN. * $p < 0,05$, quando comparado ao controle não

tratado.

Figura 23: Efeito do peptídeo N2 no crescimento do neurito de CGN. $*p<0,05$ e $p<0,0001$, quando comparado ao controle não tratado.

5 Figura 24: Efeito do peptídeo N3 no crescimento do neurito de CGN. $*p<0,05$, quando comparado ao controle não tratado.

Figura 25: Efeito de um peptídeo derivado de GDNF, Gah (SEQ ID NO:9; ET-TYDKILKNLSRNR), na sobrevivência de
10 neurônios dopaminérgicos. Diagrama indica que Gah aumentar a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos.

C3d é um controle positivo (o peptídeo que está aumentado na sobrevivência de neurônios dopaminérgicos, ver Dittlevsen et al, J. Neurochem., 2003).

15 Figura 26: Análise de ligação por ressonância de plasmon de superfície (SPR). Ligação de um peptídeo derivado de GDNF, Gah (SEQ ID NO:9 ETTYDKILKNLSRNR), para os módulos Igl-2 de NCAM. Resultados indicam que o peptídeo Gah é provavelmente parte do sítio de ligação do GDNF para a
20 molécula de adesão celular neural (NCAM).

Figura 27: Análise de ligação por ressonância de plasmon de superfície (SPR). SPR mostra a ligação de um peptídeo derivado de GDNF, Gah (SEQ ID NO:9 ETTYDKILKNLSRNR), para o receptor $GFR\alpha 1$.

25 Figura 28: Análise de ligação por ressonância de plasmon de superfície (SPR). A figura mostra a ligação do peptídeo derivado de GDNF, Gi (SEQ ID NO:16 DDLSFLDDNLVY), para o receptor $GFR\alpha 1$.

Figura 29: Efeito de um peptídeo derivado de artemina, ArtGah (SEQ ID NO:10, RSPHDLSLASLLGAG), na sobrevivência de neurônios granulares cerebelares (CGN). Diagrama indica que ArtGah aumenta a sobrevivência de CGNs.

5 Figura 30: Efeito de um peptídeo derivado de artemina, ArtGg (SEQ ID NO:2, VPVRALGLGHRSDDEL), na sobrevivência de neurônios granulares cerebelares (CGN). Diagrama indica que ArtGg aumenta a sobrevivência de CGNs.

10 Figura 31: Efeito de um peptídeo derivado de artemina, ArtGi (SEQ ID NO: 17, EAVSFMDVNSTWR), na sobrevivência de neurônios granulares cerebelares (CGN). Diagrama mostra que ArtGi aumenta a sobrevivência de CGNs.

15 Figura 32: Efeito de um peptídeo derivado de neurturina, NeuGg (SEQ ID NO:3, VRVSELGLGYASDET), na sobrevivência de neurônios granulares cerebelares (CGN). Diagrama mostra que NeuGg aumenta a sobrevivência de CGNs.

20 Figura 33: Efeito de um peptídeo derivado de neurturina, NeuGi (SEQ ID NO:18, DEVSFLDAHSRY), na sobrevivência de neurônios granulares cerebelares (CGN). Diagrama mostra que NeuGi aumenta a sobrevivência de CGNs.

Figura 34: Análise de ligação por ressonância de plasmon de superfície (SPR). A figura mostra a ligação do peptídeo derivado de neurturina, NeuGah (SEQ ID NO:11 VYDLGLRRLRQRR), para os receptores GFR α .

25 Figura 35: Análise de ligação por ressonância de plasmon de superfície (SPR). A figura mostra a ligação do peptídeo derivado de neurturina, NeuGg (SEQ ID NO:3 VRVSELGLGYASDET), para os receptores GFR α .

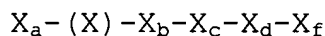
Figura 36: Análise de ligação por ressonância de plasmon de superfície (SPR). A figura mostra a ligação do peptídeo derivado de neurturina, NeuGi (SEQ ID NO:18 DEVSFLDAHSRY), para os receptores GFR α .

5 Figura 38: Análise de ligação por ressonância de plasmon de superfície (SPR). A figura mostra a ligação de um peptídeo derivado de artemina, ArtGi (EAVSFMDVNSTWR), para os receptores GFR α .

Descrição Detalhada da Invenção

10 Seqüências Peptídicas

Primeiro aspecto da invenção relaciona-se a um peptídeo tendo uma seqüência de 6 a 22 resíduos aminoácidos contíguos compreendendo o motivo:



15 em que

X_a é resíduo aminoácido D, E, A ou G,

(x) é uma seqüência de 2-3 resíduos aminoácidos ou um resíduo aminoácido único selecionado do grupo consistindo de resíduos aminoácidos A, D, E, G, I, K, L, P, Q, S, T e V,

20 X_b é resíduo aminoácido Y ou H, ou um resíduo aminoácido hidrofóbico, e pelo menos um de X_c , X_d ou X_f é um resíduo aminoácido carregado ou hidrofóbico.

De acordo com a invenção, em uma modalidade preferida X_a pode ser um resíduo aminoácido ácido, por exemplo, E ou D. Em outra modalidade preferida X_a pode ser A ou G.

Em algumas modalidades a posição (x) do motivo acima pode preferivelmente ser ocupada por uma seqüência de

quaisquer dois resíduos aminoácidos, em que uma seqüência preferida é uma seqüência de qualquer dois dos seguintes resíduos L, G, A, S, T, K ou I, em que as seqüências L-G, L-A, L-S, T-Q, T-T ou K-I são mais preferidos.

5 Em outra(s) modalidade(s) pode(m) ser uma seqüência de quaisquer três resíduos aminoácidos, preferivelmente os resíduos selecionados de L, G, A, S, T, K, I, em que mais preferida é a seqüência L-X-G, X sendo qualquer resíduo aminoácido, e a mais preferida seqüência é
10 L-Q-G.

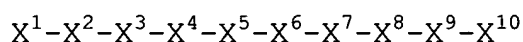
 Em ainda outras modalidades (x) pode ser representado por qualquer resíduo aminoácido único, preferivelmente um resíduo aminoácido carregado ou hidrofóbico. Mais preferivelmente o resíduo aminoácido pode
15 ser selecionado de D, E, A, V ou P.

 O resíduo na posição X_b do motivo acima em uma modalidade preferida pode ser A, L, V ou W. Em outra modalidade preferida X_b por ser H. Ainda em outra modalidade preferida X_b pode ser Y.

20 De acordo com a invenção X_c , X_d ou X_f pode ser independentemente qualquer resíduo aminoácido, entretanto, é preferido que pelo menos um de X_c , X_d ou X_f é selecionado de um resíduo aminoácido carregado ou hidrofóbico. Em particular, um resíduo carregado ou hidrofóbico é preferido
25 na posição X_f , em que entre os resíduos hidrofóbicos, resíduos A, I, V, L ou M são mais preferidos, e entre os carregados são mais preferidos os resíduos R, E ou D.

 A invenção ainda relaciona-se a um peptídeo

compreendendo uma seqüência aminoácida de fórmula



em que

X^1 é um resíduo aminoácido selecionado de D, A, E

5 ou H,

X^2 é um resíduo aminoácido selecionado de L, G, T,

D, A, E, V ou P,

X^3 é um resíduo aminoácido selecionado de G, Q, I,

S, G, L, T, V ou A,

10 X^4 é um resíduo aminoácido selecionado de L, W, G,

A, Y, H, S, F, P ou T,

X^5 é um resíduo aminoácido selecionado de G, K, M, A,

R, L, S, F ou I,

X^6 é um resíduo aminoácido selecionado de Y, H, W, K,

15 N, S, R, A, M, L, D ou V,

X^7 é um resíduo aminoácido selecionado de E, R, A,

I, V, W, L, D ou Y,

X^8 é um resíduo aminoácido selecionado de T, S, H,

L, R, D, V, A ou Y,

20 X^9 é um resíduo aminoácido selecionado de K, D, E,

R, G, Q, A, S, N, H, V ou I,

X^{10} é um resíduo aminoácido selecionado de E, P, N,

A, R, G, L ou S,

em que a referida seqüência aminoácida está

25 compreendida no motivo conforme descrito acima.

Um peptídeo compreendendo a seqüência aminoácida acima é preferivelmente 10 a 22 resíduos aminoácidos de comprimento, ou um fragmento das mesmas compreendendo pelo

menos 6 resíduos aminoácidos compreendendo o motivo da invenção. De acordo com a invenção tal sequência aminoácida preferivelmente compreende uma sequência selecionada das seguintes seqüências:

- | | |
|----|----------------------------------|
| 5 | LNVTDLGLGYETKEE (SEQ ID NO:1) |
| | VPVRALGLGHRDEL (SEQ ID NO:2) |
| | VRVSELGLGYASDET (SEQ ID NO:3) |
| | LSVAELGLGYASEEK (SEQ ID NO:4) |
| | IDFRKDLGWKWIHEPKG (SEQ ID NO:5) |
| 10 | IDFKRDLGWKWIHEPKG (SEQ ID NO:6) |
| | IDFRQDLGWKVVHEPKG (SEQ ID NO:7) |
| | IDLQGMKWAKNWWLEPPG (SEQ ID NO:8) |
| | ETTYDKILKNLSRNR (SEQ ID NO:9) |
| | RSPHDLASLLGAG (SEQ ID NO:10) |
| 15 | ARVYDLGLRRLRQRR (SEQ ID NO:11) |
| | RTQHGLALARLQGQG (SEQ ID NO:12) |
| | WSLDTQYSKVLALYN (SEQ ID NO:13) |
| | WSSDTQHSRVLSLYN (SEQ IS NO:14) |
| | RSADTTHSTVLGLYN (SEQ ID NO:15) |
| 20 | DDLSFLDDNLVY (SEQ ID NO:16) |
| | EAVSFMDVNSTW (SEQ ID NO:17) |
| | DEVSFLEDAHSRY (SEQ ID NO:18) |
| | DVAFLDDRHRWQ (SEQ ID NO:19) |
| | EPLPIVYYVGRK (SEQ ID NO:20) |
| 25 | EPLTILYYIGKT (SEQ ID NO:21) ou |
| | EPLTILYYVGRT (SEQ ID NO:22) |

Em algumas modalidades preferidas o peptídeo pode compreender uma das seguintes seqüências:

LNVTDLGLGYETKEE (SEQ ID NO:1)
 VPVRALGLGHRDEL (SEQ ID NO:2)
 VRVSELGLGYASDET (SEQ ID NO:3) ou
 LSVaelGLGYASEEK (SEQ ID NO:4), ou fragmento das

5 mesmas.

Em outras modalidades preferidas o peptídeo pode compreender uma das seguintes seqüências:

IDFRKDLGWKWIHEPKG (SEQ ID NO:5)
 IDFKRDLGWKWIHEPKG (SEQ ID NO:6)
 10 IDFRQDLGWKVVHEPKG (SEQ ID NO:7) ou
 IDLQGMKWAKNWWLEPPG (SEQ ID NO:8), ou um fragmento

das mesmas.

Em outras modalidades preferidas o fragmento pode compreender uma das seguintes seqüências:

15 ETTYDKILKNLSRNR (SEQ ID NO:9)
 RSPHDLASLLGAG (SEQ ID NO:10)
 ARVYDLGLRRLRQRR (SEQ ID NO:11) ou
 RTQHGLALARLQGQG (SEQ ID NO:12), ou um fragmento

dos mesmos.

20 Em ainda outras modalidades preferidas o fragmento pode compreender uma das seguintes seqüências:

WSLDTQYSKVLALYN (SEQ ID NO:13)
 WSSDTQHSRVLSLYN (SEQ IS NO:14) ou
 RSADTTHSTVLGLYN (SEQ ID NO:15), ou fragmentos dos

25 mesmos.

Em ainda outras modalidades preferidas o peptídeo pode compreender uma das seguintes seqüências:

DDLSFLDDNLVY (SEQ ID NO:16)

EAVSFMDVNSTWR (SEQ ID NO:17)

DEVSFLEDAHSRY (SEQ ID NO:18) ou

DVAFLDDRHRWQ (SEQ ID NO:19), ou um fragmento dos
mesmos.

5 Algumas modalidades podem preferivelmente tratar
de peptídeo que compreende uma das seguintes seqüências:

EPLPIVYYVGRK (SEQ ID NO:20)

EPLTILYYIGKT (SEQ ID NO:21) ou

EPLTILYYVGRT (SEQ ID NO:22), ou um fragmento dos
10 mesmos.

Em algumas modalidades preferidas a invenção
tratar de um peptídeo que compreende as seqüências:

VPVRALGLGHRSDLE (SEQ ID NO:2)

VRVSELGLGYASDET (SEQ ID NO:3)

15 ETTYDKILKNLSRNR (SEQ ID NO:9)

RSPHDLASLLGAG (SEQ ID NO:10)

ARVYDLGLRRLRQRR (SEQ ID NO:11)

DDLSEFLDDNLVY (SEQ ID NO:16)

EAVSFMDVNSTWR (SEQ ID NO:17)

20 DEVSFLEDAHSRY (SEQ ID NO:18).

Como já mencionado acima, peptídeos da invenção
compreendem de 6 a 22 resíduos aminoácidos contíguos.
Entretanto, o comprimento de um peptídeo pode ser
preferivelmente selecionado, por exemplo, na variação de 6 a
25 10 resíduos aminoácidos, tais como 7 a 9 resíduos
aminoácidos, ou na variação de 11 a 15 resíduos aminoácidos,
tal como, por exemplo, 12 a 14 resíduos aminoácidos. O
comprimento de um peptídeo pode também ser na variação de 16

a 20 resíduos aminoácidos, por exemplo, 17 a 19 resíduos aminoácidos. Ele também pode ser de 21 a 22 resíduos aminoácidos.

Por exemplo, em uma modalidade preferida o
5 peptídeo pode ser uma seqüência de 18 resíduos aminoácidos. Então, uma seqüência de 18 resíduos aminoácidos preferida da invenção é a seqüência IDLQGMKWAKNWVLEPPG (SEQ ID NO:8).

Em outra modalidade preferida o peptídeo pode ser uma seqüência de 17 resíduos aminoácidos. Neste caso, uma
10 seqüência de 17 resíduos aminoácidos pode ser selecionada das seguintes seqüências aminoácidas:

IDFRKDLGWKWIHEPKG (SEQ ID NO:5)

IDFKRDLGWKWIHEPKG (SEQ ID NO:6) ou

IDFRQDLGWKVVHEPKG (SEQ ID NO:7).

15 Ainda, em outra modalidade preferida o peptídeo pode ser uma seqüência de 15 resíduos aminoácidos. Tal seqüência pode ser preferível selecionada das seguintes seqüências:

LNVTDLGLGYETKEE (SEQ ID NO:1)

20 VPVRALGLGHRSDDEL (SEQ ID NO:2)

VRVSELGLGYASDET (SEQ ID NO:3)

LSVAELGLGYASEEK (SEQ ID NO:4)

ETTYDKILKNLSRNR (SEQ ID NO:9)

RSPHDLASLLGAG (SEQ ID NO:10)

25 ARVYDLGLRRLRQRR (SEQ ID NO:11)

RTQHGLALARLQGQG (SEQ ID NO:12)

WSLDTQYSKVLALYN (SEQ ID NO:13)

WSSDTQHSRVLSLYN (SEQ IS NO:14) ou

RSADTTHSTVLGLYN (SEQ ID NO:15).

Ainda, em outra modalidade preferida o peptídeo pode ser uma seqüência de 12 resíduos aminoácidos. Tal peptídeo pode ser preferivelmente selecionado para formar as seguintes seqüências:

DDLFLDDNLVY (SEQ ID NO:16)

EAVSFMDVNSTWR (SEQ ID NO:17)

DEVSLDAHSRY (SEQ ID NO:18)

DVAFLLDRHRWQ (SEQ ID NO:19)

10 EPLPIVYYVGRK (SEQ ID NO:20)

EPLTILYYIGKT (SEQ ID NO:21) ou

EPLTILYYVGRT (SEQ ID NO:22).

Conseqüentemente, um peptídeo consistindo de qualquer das seguintes seqüências

15 LNVTDLGLGYETKEE (SEQ ID NO:1)

VPVRALGLGHRDEL (SEQ ID NO:2)

VRVSELGLGYASDET (SEQ ID NO:3)

LSVAELGLGYASEEK (SEQ ID NO:4)

IDFRKDLGWKWIHEPK (SEQ ID NO:5)

20 IDFKRDLGWKWIHEPKG (SEQ ID NO:6)

IDFRQDLGWKVVHEPKG (SEQ ID NO:7)

IDLQGMKWAKNWWLEPPG (SEQ ID NO:8)

ETTYDKILKNLSRNR (SEQ ID NO:9)

RSPHDLASLLGAG (SEQ ID NO:10)

25 ARVYDLGLRRLRQRR (SEQ ID NO:11)

RTQHGLALARLQGQ (SEQ ID NO:12)

WSLDTQYSKVLALYN (SEQ ID NO:13)

WSSDTQHSRVLSLYN (SEQ IS NO:14)

RSADTTHSTVLGLYN (SEQ ID NO:15)

DDLFLDDNLVY (SEQ ID NO:16)

EAVSFMDVNSTWR (SEQ ID NO:17)

DEVSFLDAHSRY (SEQ ID NO:18)

5 DVAFLDDRHRWQ (SEQ ID NO:19)

EPLPIVYYVGRK (SEQ ID NO:20)

EPLTILYYIGKT (SEQ ID NO:21) ou

EPLTILYYVGRT (SEQ ID NO:22)

é uma das modalidades preferidas da invenção.

10 No presente pedido o código de uma letra padrão para resíduos aminoácidos é aplicado bem como o código de três letras padrão. Abreviações para aminoácidos são de acordo com as recomendações em IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature Eur. J. Biochem., 1984, vol. 184, 15 pp 9-37. Através da descrição e reivindicações ou o código de três letras ou o código de uma letra para aminoácidos naturais são utilizados. Onde a forma L ou D não tenha sido especificada ela é para ser entendida que o aminoácido em questão tem a forma natural L, cf. Purê & Appl. Chem. Vol. 20 (56(5) pp 595-624 (1984) ou a forma D, a fim de que os peptídeos formados possam ser constituídos de aminoácidos de forma L, forma D, ou uma seqüência de formas L e formas D misturadas).

Onde nada é especificado é para ser entendido que 25 o aminoácido C-terminal de um peptídeo da invenção existe como um ácido carboxílico livre, este pode também ser especificado como "-OH". Entretanto, o aminoácido C-terminal de um composto da invenção pode ser o derivado aminado, que

é indicado como "-NH₂". Onde nada mais é declarado o aminoácido N-terminal de um polipeptídeo compreende um grupo amino livre, este pode também ser especificado como "H-".

Onde nada mais é especificado aminoácido pode ser
5 selecionado de qualquer aminoácido, se de ocorrência natural ou não, tal como alfa aminoácidos, beta aminoácidos, e/ou gama aminoácidos. Conseqüentemente, o grupo compreende mas não é limitado a: Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met, Gly, Ser, Thr, Cys, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His Aib,
10 Nal, Sar, Irn, análogos de Lisina, DAP, DAPA e 4Hyp.

Também, de acordo com a invenção as modificações dos compostos/peptídeos podem ser feitas, tais como, por exemplo, glicosilação e/ou acetilação de aminoácidos.

Resíduos aminoácidos básicos são de acordo com a
15 invenção representados pelos resíduos de aminoácidos Arg, Lys, e His, resíduos aminoácidos acídicos - pelos resíduos de aminoácidos Glu e Asp. Resíduos aminácidos básicos constituem um grupo de resíduos aminoácidos carregados. O grupo de resíduos aminoácidos hidrofóbicos é representado
20 pelos resíduos de aminoácidos Leu, Ile, Val, Ohe, Trp, Tyr, e Met.

Em uma modalidade variante pode ser entendido como seqüências aminoácidas exibindo gradualmente divergindo da seqüência pré-determinada preferida, como o número e
25 finalidades de inserções, deleções e substituições incluindo substituições conservativas aumentadas. Esta diferença é medida como uma redução na homologia entre a seqüência pré-determinada e o variante.

A invenção relaciona-se a seqüência de peptídeo/fragmentos de ocorrência natural, preparados sinteticamente/recombinante, e/ou seqüência de peptídeo/fragmentos preparados por meios de clivagem enzimática/química de um polipeptídeo maior, em que a referida seqüência de peptídeo/fragmentos são partes integrais dos referidos polipeptídeos maiores. A invenção relaciona-se a seqüências peptídicas individuais isoladas.

A invenção também se relaciona às variantes de seqüências de peptídeos descritas acima.

Em um aspecto o termo "variante de uma seqüência peptídica" significa que os peptídeos podem ser modificados, por exemplo, por substituição de um ou mais resíduos aminoácidos. Ambos os aminoácidos L-aminoácidos e D-aminoácidos pode ser utilizados. Outra modificação pode compreender derivados de tais ésteres, açúcares etc. Exemplos são metil e acetil ésteres.

Em outro aspecto, variantes dos fragmentos de peptídeos de acordo com a invenção podem compreender, dentro da mesma variante, ou fragmentos dos mesmos ou entre variantes diferentes, ou fragmentos dos mesmos, pelo menos uma substituição, tal como uma pluralidade de substituições introduzidas independentemente de uma outra. Variantes do complexo, ou fragmentos dos mesmos podem então compreender substituições conservativas independentemente de uma outra, em que pelo menos uma glicina (Gly) do referido variante, ou fragmentos dos mesmos é substituído com um aminoácido selecionado do grupo de aminoácidos consistindo de Ala, Val,

Leu, e Ile, e independentemente os mesmos, variantes, ou fragmentos dos mesmos, em que pelo menos uma alanina (Ala) dos referidos variantes, ou fragmentos dos mesmos é substituído com um aminoácido selecionado do grupo de aminoácidos consistindo de GLy, Val, Leu, e Ile, e independentemente dos mesmos, variantes, ou fragmentos dos mesmos, em que pelo menos uma valina (Val) do referido variante, ou fragmentos dos mesmos é substituído com um aminoácido selecionado do grupo de aminoácidos consistindo de Gly, Ala, Leu, e Ile, e independentemente dos mesmos, variantes, ou fragmentos dos mesmos, em que pelo menos uma leucina (Leu) do referido variante, ou fragmentos dos mesmos é substituído com um aminoácido selecionado do grupo de aminoácidos consistindo de Gly, Ala, Val, e Ile, e independentemente dos mesmos, variantes, ou fragmentos dos mesmos, em que pelo menos uma isoleucina (Ile) dos referidos variantes, ou fragmentos dos mesmos é substituído com um aminoácido selecionado do grupo de aminoácidos consistindo de Gly, Ala, Val e Leu, e independentemente dos mesmos, variantes, ou fragmentos dos mesmos em que pelo menos um ácido aspártico (Asp) do referido variante, ou fragmentos dos mesmos é substituído com um aminoácidos selecionado do grupo de aminoácidos consistindo de GLu, Asn, e Gln, e independentemente dos mesmos, variantes, ou fragmentos dos mesmos, em que pelo menos uma asparagina (Asn) dos referidos variantes, ou fragmentos dos mesmos é substituído com um aminoácido selecionado do grupo de aminoácidos consistindo de Asp, Glu, e Gln, e independentemente dos mesmos,

variantes, ou fragmentos dos mesmos, em que pelo menos uma glutamina (Gln) dos referidos variantes, ou fragmentos dos mesmos é substituído com um aminoácido selecionado do grupo de aminoácidos consistindo de Asp, Glu, e Asn, e em que pelo
5 menos uma fenilalanina (Phe) dos referidos variantes, ou fragmentos dos mesmos é substituída com um aminoácido selecionado do grupo de aminoácidos consistindo de Tyr, Trp, His, Pro, e preferivelmente selecionados do grupo de aminoácidos consistindo de Tyr e Trp, e independentemente
10 dos mesmos, variantes, ou fragmentos dos mesmos, em que pelo menos uma tirosina (Tyr) dos referidos variantes, ou fragmentos dos mesmos é substituído com um aminoácido selecionado do grupo de aminoácidos consistindo de Phe, Trp, His, Pro, preferivelmente um aminoácido selecionado do grupo
15 de aminoácidos consistindo de Phe e Trp, e independentemente dos mesmos, variantes, ou fragmentos dos mesmos, em que pelo menos uma arginina (Arg) do referido fragmento é substituído com um aminoácido selecionado do grupo de aminoácidos consistindo de Lys e His, e independentemente dos mesmos,
20 variantes, ou fragmentos dos mesmos, em que pelo menos uma lisina (Lys) dos referidos variantes, ou fragmentos dos mesmos é substituído com um aminoácido selecionado do grupo de aminoácidos consistindo de Arg e His, e independentemente dos mesmos, variantes, ou fragmentos dos mesmos, e
25 independentemente dos mesmos, variantes, ou fragmentos dos mesmos, e em que pelo menos uma prolina (Pro) dos referidos variantes, ou fragmentos dos mesmos é substituído com um aminoácido selecionado do grupo de aminoácidos consistindo

de Phe, Tyr, Trp, e His, e independentemente dos mesmos, variantes, ou fragmentos dos mesmos, em que pelo menos uma cisteína (Cys) dos referidos variantes, ou fragmentos dos mesmos é substituído com um aminoácido selecionado do grupo
 5 de aminoácidos consistindo de Asp, Glu, Lys, Arg, His, Asn, Gln, Ser, Thr, e Tyr.

Outros critérios para um variante de uma sequência de peptídeo são discutidos abaixo.

É então seguido do acima que o mesmo equivalente
 10 funcional de um fragmento peptídeo, ou fragmento do referido equivalente funcional compreende mais que uma substituição aminoácida conservativa de mais que um grupo de aminoácidos conservativos como definido aqui acima. O termo "substituição aminoácida conservativa" é utilizado
 15 sinonimamente aqui como o termo "substituição aminoácida homóloga".

Os grupos de aminoácidos conservativos são como os seguintes:

P, A, G (neutro, fracamente hidrofóbico),
 20 S, T (neutro, amina ácida)
 Q, N (hidrofílica, amina ácida)
 E, D (hidrofílica, acídica)
 H, K, R (hidrofílica, básica)
 A, L, I, V, M, F, Y, W (hidrofóbica, aromática)
 25 C (formando uma ligação cruzada)

Substituições conservativas podem ser introduzidas em qualquer posição de um peptídeo pré-determinado preferido da invenção ou fragmento do mesmo. Este pode, entretanto ser

desejável introduzir substituições não conservativas, particularmente, mas não limitados a, substituição não conservativa em qualquer uma ou mais posições.

Uma substituição não conservativa levando a
5 formação de um fragmento equivalente funcionalmente do peptídeo da invenção pode, por exemplo, i) diferir substancialmente em polaridade, por exemplo, um resíduo com uma cadeia lateral não polar (Ala, Leu, Pro, Trp, Val, Ile, Leu, Phe ou Met) substituído por um resíduo com uma cadeia
10 lateral polar tal como Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, ou Gln ou um aminoácido carregado tal como Asp, Arg, ou Lys, ou substituindo um resíduo carregado ou um resíduo polar por um não polar; e/ou, ii) diferir substancialmente no seu efeito na orientação da estrutura do peptídeo tal como substituição
15 de ou para Pro ou Gly por outro resíduo; e/ou iii) difere substancialmente na carga elétrica, por exemplo, substituição de um resíduo carregado negativamente tal como Glu ou Asp para um resíduo positivamente carregado tais como Lys, His ou Arg (e vice versa); e/ou iv) difere
20 substancialmente no volume estérico, por exemplo, substituição de um resíduo grande tais como His, Trp, Phe ou Tyr para um tendo uma cadeia lateral menor, por exemplo, Ala, Gly ou Ser (e vice versa).

A substituição de aminoácidos pode em uma
25 modalidade ser feita baseada nos seus valores de hidrofobicidade e hidrofiliicidade e a similaridade relativa dos substituintes da cadeia lateral do aminoácido, incluindo carga, tamanhos e semelhantes. Exemplarmente substituições

aminoácidas que tomam várias das precedentes características em consideração são bem conhecidas pelos versados na técnica e incluem: arginina e lisina; glutamato e aspartato; serina e treonina; glutamina e asparagina; e valina, leucina e isoleucina.

Como foi mencionada acima a presente invenção relaciona-se aos fragmentos, variantes e homólogos das seqüências peptídicas descritas acima.

No presente contexto

i) um fragmento é uma seqüência que tem pelo menos 40% mais preferivelmente em pelo menos 50%, mais preferivelmente pelo menos 60%, mais preferivelmente pelo menos 70%, mais preferivelmente pelo menos 80%, mais preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente pelo menos 95% do comprimento de uma seqüência correspondendo a uma seqüência compreendendo o motivo da invenção, em particular uma seqüência selecionada das seqüências de SEQ ID Nos:1-22. É preferido que um fragmento de uma seqüência selecionada das seqüências de SEQ ID Nos:1-22 compreende pelo menos 4 resíduos aminoácidos do motivo $X_a-(x)-X_b-X_c-X_d-X_f$ que é descrito acima, mais preferivelmente resíduos $X_b-X_c-X_d-X_f$ do referido motivo, tal como, por exemplo, seqüências DLSFLDDNLVY (SEQ ID NO:23), VSFMDVNSTWR (SEQ ID NO:24), EVSFLDAHSRY (SEQ ID NO:25) que são os fragmentos de seqüências identificadas como SEQ ID NO:16, 17 e 18 correspondentemente;

ii) uma variante é uma seqüência aminoácida tendo pelo menos 60%, mais preferivelmente pelo menos 70%, mais

preferivelmente pelo menos 80%, mais preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente 95% de homologia a uma sequência compreendendo o motivo da invenção, em particular a uma sequência selecionada das seqüências de SEQ ID Nos: 1-
5 22, ou é uma sequência aminoácida tendo pelo menos 60%, mais preferivelmente pelo menos 70%, mais preferivelmente pelo menos 80%, mais preferivelmente pelo menos 90%, mais preferivelmente 95% de aminoácido positivos unidos comparados a uma sequência compreendendo o motivo da
10 invenção, em particular a uma sequência de SEQ ID NOS:1-22. Um aminoácido positivo unido é definido aqui como uma identidade ou similaridade definida por propriedades físicas e/ou químicas dos aminoácidos tendo à mesma posição em duas seqüências comparadas. Aminoácidos positivos unidos
15 preferidos da presente invenção são K a R, E a D, L a M, Q a E, I a V, I a L, A a S, Y a W, K a Q, S a T, N a S e Q a R. A homologia de uma sequência aminoácida com outro aminoácido é definida como uma porcentagem de aminoácidos idênticos nas seqüências combinadas. A homologia das seqüências pode ser
20 calculada utilizando algoritmos bem conhecidos tais como BLOSUM 30, BLOSUM 40, BLOSUM 45, BLOSUM 50, BLOSUM 55, BLOSUM 60, 62, BLOSUM 65, BLOSUM 70, BLOSUM 75, BLOSUM 80, BLOSUM 85, ou BLOSUM 90;

iii) um homólogo é uma sequência aminoácida que
25 tem menos que 60% mas mais que 30%, tal como 50-59%, por exemplo, 55%, tal como 40-49%, por exemplo, 45%, tal como 30-39%, por exemplo, 35% de homologia para uma sequência compreendendo o motivo da invenção, em particular a uma

seqüência de SEQ ID Nos: 1-22.

É presumido que fragmentos, variantes e homólogos como aqui definidos acima permanecem em pelo menos alguma atividade biológica da seqüência original, por exemplo, uma
5 capacidade de estimular a plasticidade neural, tal como associada com diferenciação celular neural e/ou tal como associada com memória e aprendizagem, estimulando de sobrevivência celular, tais como inibição da apoptose, ativação do receptor de uma proteína que a referida
10 seqüência original é derivada.

Como mencionado acima, a invenção relaciona-se ambos, a peptídeos de ocorrência natural, preparados sinteticamente ou recombinantemente e peptídeos preparados por meios de quebra enzimática/química de uma seqüência
15 polipeptídica maior. Os peptídeos produzidos por quebra enzimática de uma seqüência polipeptídica maior vêm como peptídeos, que são preparados por meios de expressão recombinante ou por meios de síntese química, em que as referidas seqüências peptídicas são seqüências integrais dos
20 polipeptídeos maiores ou proteínas, são de acordo com a invenção derivadas de seqüências dos referidos polipeptídeos maiores ou proteínas.

A invenção preferivelmente relaciona-se a peptídeos derivados das seqüências das proteínas pertencendo
25 a superfamília do TGF-beta de proteínas, em particular, GDNF, ARTN, NRTN, PSTN, TGF-beta 1, TGF-beta 2, TGF-beta 3 e TGF-beta 4.

Então, em uma modalidade um peptídeo da invenção

pode ter ou compreender uma sequência correspondente a uma sequência integral de fato neurotrófico derivado da glia (GDNF). Tal peptídeo de acordo com a invenção é derivado do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF). Exemplos de

5 sequências derivadas de GDNF que encontram o critério para uma sequência de peptídeo da invenção são SEQ ID NOs: 1, 9 e 16.

Um peptídeo, de acordo com a invenção, pode ter ou compreender uma sequência de peptídeo derivada de artemina

10 (ARTN). Sequências de peptídeo derivadas de ARTN da invenção são identificadas aqui como SEQ ID NOs:2, 10 e 17. Uma sequência de peptídeo pode também derivar de neurturina (NRTN) ou persefina (PSTN). As sequências da invenção derivadas de NRTN e PSTN são identificadas aqui como SEQ ID

15 NOs: 3, 11 e 18 e SEQ ID NOs: 4, 12 e 19 correspondentemente.

Um peptídeo da invenção pode compreender uma sequência derivada do fator de crescimento transformador beta 1 (TGF-beta 1), fator de crescimento transformador beta

20 2 (TGF-beta 2), fator de crescimento transformador beta 3 (TGF-beta 3), ou fator de crescimento transformador beta 4 (TGF-beta 4), em que sequências preferidas derivadas dessas proteínas são identificadas aqui como SEQ ID NOs:5-8, 13-15 ou 20-22, correspondentemente.

25 De acordo com a presente invenção uma sequência de peptídeo isolada como descrita acima pode ser formulada como um composto.

Um composto pode conter uma cópia única de uma

seqüência aminoácida individual selecionada de qualquer dos descritos acima, ou ela pode conter duas ou mais cópias de tal seqüência aminoácida. Isto significa que o composto da invenção pode ser formulado como um monômero de uma
5 seqüência de peptídeo, tal como contendo uma seqüência peptídica individual única, ou ela pode ser formulada como um multímero de uma seqüência de peptídeo, isto é, contendo duas ou mais seqüências de peptídeos individuais, em que as referidas seqüências de peptídeo individual podem ser
10 representadas por duas ou mais cópias da mesma seqüência ou por duas ou mais seqüências de peptídeos individuais diferentes. Um multímero pode também compreender uma combinação de seqüência de comprimento inteiro e um ou mais fragmentos dos mesmos. Em uma modalidade um composto pode
15 conter duas ou mais seqüências aminoácidas, tal composto é definido aqui como dímero, em outra modalidade um composto pode conter mais de duas seqüências aminoácidas, tais como exemplos, três, quatro ou mais seqüências. A presente invenção preferivelmente relaciona-se a compostos contendo
20 duas ou mais seqüências peptídicas da invenção. Entretanto, compostos contendo 3, 5, 6, 7, 8 ou mais seqüências estão também no objetivo da invenção.

Os fragmentos de peptídeos formulados como dímeros ou multímeros podem ter as seqüências de aminoácidos
25 idênticas, ou elas pode ter diferentes seqüências aminoácidas. Um exemplo de tal composto pode ser um composto contendo SEQ ID NO:1 e SEQ ID NO:9, outro exemplo pode ser um composto contendo SEQ ID NO:1 e SEQ ID NO:16. Quaisquer

outras combinações das seqüências da invenção podem ser feitas dependendo de diferentes modalidades. As seqüências podem ser conectadas a cada outra através de ligação peptídica, ou conectadas a cada outra através de uma
5 molécula ligante ou agrupamento.

Um composto da invenção pode conter duas ou mais cópias idênticas de uma seqüência, tal como, por exemplo, duas cópias de uma seqüência selecionada de SEQ ID NOs: 1-22, em que as referidas duas seqüências podem ser conectadas
10 a cada outra através de uma molécula ligante ou agrupamento. Um composto em que as seqüências são conectadas através do grupo ligante é preferido. Um exemplo de tal grupo ligante pode ser um ácido di-, tri- ou tetracarboxílico aquiral. Ácidos di-, tri- ou tetracarboxílicos aquirais e um método
15 de produção tal como um composto (um método ligante de montagem (LPA)) são descritos em WO0018791 e WO2005014623. Outro exemplo de um possível ligante pode ser o aminoácido lisina. Seqüências peptídicas individuais podem ser ligadas a uma molécula núcleo tal como lisina formando assim um
20 multímero dendrítico (dendrímico) de uma(s) seqüência(s) peptídica individual. Produção de dendrímeros é também bem conhecida na técnica (PCT/US90/02039, Lu et al, (1991) Mol Immunol. 28:623-630; Defoort et al, (1992) Int J. Pept Prot Res., 40:214-221; Drijfhout et al (1991) Int J Pept Prt Res.
25 (37:27-32), e dendrímeros são no presente amplamente utilizados na pesquisa e em aplicações médicas. É uma modalidade preferida da invenção prover um composto dendrimérico compreendendo quatro seqüências aminoácidas

individuais ligadas a molécula núcleo lisina. É também preferida que pelo menos uma de quatro seqüências aminoácidas individuais compreendam uma seqüência aminoácida de fórmula definida acima. É ainda mais preferido se todas
5 as quatro seqüências aminoácidas de um composto dendrimérico individualmente compreender uma seqüência aminoácida de fórmula definida acima.

Compostos multiméricos da invenção, tais como LPA-dímeros ou Lisina-dendrímeros, são compostos preferidos da
10 invenção. Entretanto, outros tipos de compostos multiméricos compreendendo duas ou mais seqüências da invenção podem ser preferidos dependendo das modalidades.

2. Atividade Biológica

Uma seqüência de peptídeo da invenção e um
15 composto compreendendo uma seqüência da invenção possuem atividade biológica. A invenção preferivelmente relaciona-se a uma atividade biológica selecionada de

- capacidade de estimulação da plasticidade neural associada com diferenciação celular neural, por exemplo,
20 estimulação do crescimento do neurito,

- capacidade da plasticidade neural associada com memória e aprendizagem, por exemplo, estimulando a eficácia sináptica,

- capacidade de estimulação da sobrevivência
25 celular, por exemplo, inibindo apoptose,

- capacidade de ligação de um receptor alfa da família do GDNF (GFR alfa) e ativação ou inibição de sinal de transdução, tal como transdução de sinal associada com

receptor de tirosina quinase RET ou associado com molécula de adesão celular neural (NCAM),

- capacidade de ligação a um componente de um complexo de molécula de adesão celular neural (NCMA)/GFR.

5 Então, em uma modalidade preferida um peptídeo, de acordo com a invenção, se liga a NCAM.

Então, em uma modalidade uma sequência de peptídeo isolada como descrito acima é capaz de ligar ao receptor GFRalfa selecionado de GFR alfa 1, GFR alfa 2, GFR alfa 3 ou
10 GFR alfa 4.

Os autores da presente invenção tem identificado um motivo aminoácido que está presente em um grupo de proteínas pertencendo a superfamília do TGF beta de proteínas, em particular, proteínas GDNF< ARTN, NRTN, PSTN,
15 TGF beta 1, TGF beta 2, TGF beta 3 e TGF beta 4, e associado a presença deste motivo com a atividade biológica das referidas proteínas e fragmentos de peptídeos da invenção derivadas dos mesmos. O motivo, de acordo com a invenção é essencial para ligação da sequência de peptídeo da invenção
20 para o receptor, em particular para o receptor GFR alfa, ainda mais particular para GFR alfa 1, GFR alfa 2, GFR alfa 3 ou GFR alfa 4.

Receptores GFR alfa são receptores principais no cérebro. Receptores GFR afã fazem um complexo receptor
25 multicomponente junto com receptor de tirosina quinase RET sinalizando através do qual dirige a diferenciação de células precursoras neurais, crescimento axonal, promoção de sobrevivência neuronal, plasticidade neural associada com

aprendizagem e memória particular. A capacidade de seqüências peptídicas da invenção de ligação e ativando o GFR alfa -Ret ou complexo receptor serve para modular as respostas biológicas dependente da atividade dos referidos
5 complexos receptor. Conseqüentemente, a invenção provê um método de modular a atividade do complexo receptor GFRalfa-Ret compreendendo o uso de uma seqüência peptídeo isolada da invenção ou um composto compreendendo a referida seqüência. Em modalidade preferida, a invenção relaciona-se a um método
10 para ativar o receptor GFR alfa.

Em outra modalidade, uma seqüência peptídeo isolada como descrito acima é capaz de ligar ao complexo receptor GFR alfa-molécula de adesão celular neural (NCAM) e ativando ou inibindo dessa forma a transdução de sinal
15 associada à NCAM.

NCAM desempenha um papel de molécula de adesão celular principal de células neuronais que tem ao mesmo tempo uma molécula do tipo receptor que associada com vias de transdução de sinal intracelular múltiplas nas células
20 neuronais. Tem sido recentemente mostrado que o receptor GFR alfa recruta NCAM em um complexo de sinalização que é ativado por ligante GDNF ao GFR alfa (Paratcha et al (2003) Cell 113:867-879).

Então, de acordo com a invenção uma seqüência
25 peptídeo isolada da invenção é capaz de estimular a diferenciação celular neuronal através de ativar um dos complexos receptores GFN alfas descritos acima. O termo "diferenciação neuronal" é entendido aqui ambos como

diferenciação de células precursoras neurais, ou células tronco neurais, e ainda diferenciação de células neurais, tais como, por exemplo, maturação de células neuronais. Um exemplo de tal diferenciação pode ser crescimento de neurito
5 de neurônios imaturos, ramificação de neuritos, e também regeneração de neurônio.

Então, uma modalidade preferida da invenção refere-se a atividade biológica de uma seqüência peptídeo associada com estimulação da diferenciação de precursores
10 neurais/células tronco ou neurônios imaturos, em outra modalidade preferida a invenção se relaciona a estimulação do crescimento do neurito de neurônios maduros, por exemplo, neurônios que foram traumatizados mas sobreviveram e estão comprometidos com a regeneração dos processos danosos.
15 Conseqüentemente, a invenção também se relaciona a um método para estimular a diferenciação celular neuronal compreendendo uso de uma seqüência peptídeo da invenção ou um composto compreendendo a referida seqüência.

Uma das modalidades mais preferidas da invenção
20 relaciona-se a atividade das seqüências peptídeo em conexão com aprendizagem e memória, em particular, a capacidade de uma seqüência peptídeo para estimular a plasticidade sináptica, formação da espinha dorsal, eficácia sináptica. Então, a invenção também se relaciona a um método para
25 estimulação da memória e/ou aprendizagem compreendendo o uso de uma seqüência peptídeo da invenção e/ou composto compreendendo a referida seqüência. A invenção relaciona-se a ambas, a memória de curto termo e memória de longo termo.

Uma sequência peptídeo da invenção pode também estimular a sobrevivência celular neuronal. A invenção relaciona-se a capacidade de estimular a sobrevivência celular neuronal devido a ambos, trauma e doença degenerativa. Conseqüentemente, a invenção relaciona-se a um método para estimulação da sobrevivência celular, preferivelmente sobrevivência celular neuronal por uso de uma sequência peptídeo da invenção e/ou composto compreendendo a referida sequência.

Em ainda outra modalidade uma sequência peptídeo da invenção pode modular a adesão celular, em particular adesão celular mediada NCAM. O termo "modulando a adesão celular" inclui ambas, estimulação e inibição da adesão celular. Esta atividade de uma sequência peptídeo que influencia um ótimo número de processos no desenvolvimento e sistema neural adulto, e tem uma ótima relevância a um número de condições patológicas, por exemplo, câncer. Então, um método para modular a adesão celular, em particular adesão celular mediada por NCAM, por uso de uma sequência peptídeo da invenção ou um composto compreendendo a referida sequência está também no objetivo da invenção.

As seqüências de peptídeo da invenção e compostos compreendendo os mesmos são biologicamente ativas ambas, substâncias solúveis/móveis do meio de crescimento celular e substâncias imóveis do substrato de crescimento celular. Em algumas modalidades pode ser preferido usar um peptídeo ou um composto compreendendo os mesmos como uma substância solúvel, enquanto em outras modalidades pode ser preferido

usar uma sequência peptídeo como substrato celular. Entretanto, sequências peptídeo solúveis ou compostos compreendendo os mesmos são mais preferidos.

Em outra modalidade, a sequência peptídeo da
5 invenção é também capaz de inibir um processo inflamatório, em particular um processo inflamatório no cérebro.

Inflamação é uma reação de defesa causada por dano tecidual devido a uma injúria mecânica ou bacteriana, vírus ou outras infecções do organismo. A resposta inflamatória
10 envolve três estágios principais: primeiro, dilatação de capilares para aumentar o fluxo sanguíneo; segundo, mudanças estruturais microvasculares e escape de proteínas do plasma da corrente sanguínea; e terceiro a transmigração leucocitária através do endotélio e acúmulo no local da
15 injúria e infecção. A resposta inflamatória começa com uma liberação de mediadores inflamatórios. Mediadores inflamatórios são solúveis, moléculas difusíveis que agem localmente no local do dano tecidual e infecção, e em locais mais distantes, influenciando eventos conseqüentes da
20 resposta inflamatória. Mediadores inflamatórios podem ser exógenos, por exemplo, produtos bacterianos ou toxinas, ou endógenos, que são produzidos dentro do sistema imune por ele mesmo, bem como células teciduais injuriadas, linfócitos, células mastócitos e proteínas do sangue.

25 Neuroinflamação desempenha um papel proeminente na progressão da doença de Alzheimer e pode ser responsável para degeneração nas regiões vulneráveis tal como o hipocampo. Neuroinflamação é associada com níveis elevados

de glutamato extracelular e potencialmente uma estimulação aumentada de receptores glutamato N-metil-D-aspartato.

Antiinflamatória é outra atividade biológica importante da sequência peptídeo da invenção. Então, a invenção relaciona-se a peptídeo antiinflamatório, que é capaz de servir como um inibidor da resposta inflamatória sustentada, em particular no cérebro.

A presença contínua de mediadores inflamatórios, tal como, por exemplo, TNF alfa no corpo em resposta da presença sustentada de produtos bacterianos ou mesmo bactérias vivas localmente durante dias ou semanas seguindo trauma e/ou infecção promove as reações a inflamação, tal como, por exemplo, calor, edema, e dor. A resposta inflamatória sustentada tem sido comprovada ser muito nocivo para o corpo. Se produtos bacterianos ou bactérias vivas se tornam espalhados universalmente no corpo do seu local foca a reação inflamatória se torna decisiva e fora de controle e leva a sepse que eventualmente evolui ainda para sepse severa e choque séptico. Peptídeos antiinflamatórios podem ser utilizados para bloquear ou suprimir a decisiva da resposta inflamatória sustentada representada por uma cascata de citocina massiva e nociva no sangue e órgãos vitais tais como pulmão, fígado, intestino, cérebro e rins.

No presente contexto pelo termo "composto antiinflamatório" significa um composto que é capaz de pelo menos uma das seguintes atividades:

i) diminuir ou inibir a expressão gênica nas células imunes, preferivelmente monócitos/macrófagos em

reposta aos produtos bacterianos, bactéria viva ou trauma para produzir mediadores inflamatórios endógenos incluindo receptores para mediadores inflamatórios e fatores de transcrição envolvidos na transdução de sinal dos mediadores inflamatórios, os referidos mediadores sendo preferivelmente selecionados do grupo compreendendo citocinas, selecionadas do grupo TNF alfa, IL-1, IL-6, G-CSF, GM-CSF, M-CSF. Quimiocinas selecionadas do grupo compreendendo IL-8, MCP-1, receptores selecionados do grupo fator tecidual e IL-2R alfa,

ii) diminuição ou inibição da produção de bradicinina pela fase de contato de sistema,

iii) diminuição ou inibição do potencial de atração para monócitos, e/ou

iv) diminuição ou inibição do tempo de vida de monócitos, neutrófilos e outras células imunes servindo como um indutor de apoptose,

v) diminuição ou inibição de células endoteliais vasculares para expressar a adesão de moléculas, a referida adesão de moléculas sendo preferivelmente selecionadas do grupo compreendendo PECAM, ICAM-1, E-selectinas, VCAM-1

vi) diminuição ou inibição da ativação do sistema de fase de contato para produzir bradicinina levando ao aumento da permeabilidade vascular,

vii) estimular a síntese de um mediador antiinflamatório selecionado do grupo de IL-10 e IL-12,

viii) inibição da ativação do complemento,

ix) diminuição do risco da degeneração celular

neural na presença de neuroinflamação crônica, por exemplo, neurônios que expressam receptores N-metil-D-aspartato glutamato.

Um dos exemplos não limitados de atividade biológica das seqüências peptídeo da invenção e compostos compreendendo os mesmos são descritos na aplicação abaixo.

Estimulação do Crescimento de Neurito

Substâncias com o potencial para promover o crescimento de neurito bem como estimular a regeneração e/ou diferenciação de células neuronais, tais como certos fatores tróficos endógenos, são principais alvos na pesquisa para compostos que facilitam, por exemplo, regeneração neuronal e outras formas de plasticidade neuronal. Para avaliar o potencial do presente composto, a habilidade para estimular o crescimento do neurito relacionada a sinalização, interfere com adesão celular, estimula crescimento de neurito, regeneração de nervos, podem ser investigados. Compostos da presente invenção são mostrados para promover o crescimento e é assim considerado serem bons promotores de regeneração de conexões neuronais, e assim de recuperação funcional após os danos bem como promotores de função neuronal em outras condições onde tal efeito é requerido.

No presente contexto "diferenciação" é relacionado aos processos de maturação de neurônios e extensão de neuritos, que tomam lugar após a última divisão celular dos referidos neurônios. Os compostos da presente invenção podem ser capazes de parar a divisão celular neural e iniciando a maturação das referidas células, tais como extensão da

iniciação de neuritos. De outra forma, "diferenciação" é relacionada a iniciação do processo de transformação de genética, bioquímica, morfológica e fisiológica de células do progenitor neuronal, células neurais imaturas ou células tronco embrionárias levando a formação de células tendo características funcionais de célula neuronal normal como tais características são definidas na técnica. A invenção define "células neurais imaturas" como uma célula que tem pelo menos uma característica de célula neural aceita na técnica como um traço característico para a célula neural.

De acordo com a presente invenção um composto compreendendo pelo menos uma das seqüências peptídeo acima é capaz de estimular o crescimento do neurito. A invenção relaciona-se ao melhoramento/estimulação do crescimento de neurito tal como cerca de 75% de melhoramento/estimulação acima do valor do crescimento de neurito das células controle/não estimuladas, por exemplo 50%, tal como cerca de 150%, por exemplo, 100%, tal como cerca de 250, por exemplo 200%, tal como cerca de 350%, por exemplo 300%, tal como cerca de 450%, por exemplo, 400%, tal como cerca de 500%.

Estimação da capacidade de um composto candidato para estimular o crescimento do neurito pode ser feita por usar qualquer método conhecido ou ensaio para estimação do crescimento do neurito, tal como, por exemplo, como o descrito nos Exemplos abaixo.

De acordo com a invenção um composto tem atividade neuritogênica ambos como um componente imóvel insolúvel do substrato de crescimento celular e como um componente

solúvel do meio de crescimento celular. No presente contexto "imóvel" significa que o composto é ligado/preso a uma substância que é insolúvel em água ou uma solução de água e assim ela se torna insolúvel em tal solução também. Para 5 aplicações médicas, ambos os compostos insolúvel e insolúvel são considerados pela aplicação, entretanto, compostos solúveis são referidos. Sob "composto solúvel" é entendido um composto, que é solúvel em água ou uma solução de água.

Produção de Seqüências de Peptídeo Individuais

10 As seqüências de peptídeo da presente invenção podem ser preparados por qualquer método sintético convencional, tecnologias de DNA recombinante, clivagem enzimática de proteínas de comprimento completo cujas seqüências peptídicas são derivadas de, ou uma combinação 15 dos métodos referidos.

Preparação Recombinante

Então, em uma modalidade os peptídeos da invenção são produzidos pelo uso de tecnologias de DNA recombinante.

A seqüência de DNA codificando um peptídeo ou a 20 correspondente proteína de comprimento completo o peptídeo originado de pode ser preparado sinteticamente por métodos padrões estabelecidos, por exemplo, o método fosfoamidina descrito por Beaucage e Caruthers, 1981, Tetrahedron Lett. 22:1859-1869, ou o método descrito por Matthes et al, 1984, 25 EMBO J. 3:801-805. De acordo com o método fosfoamidina, oligonucleotídeos são sintetizados, por exemplo, em um sintetizador de DNA automático, purificado, anelado, ligado e clonado em vetores adequados.

A sequência DNA codificando um peptídeo pode também ser preparado por fragmentação das sequências DNA codificando a proteína de comprimento completo correspondente do peptídeo original, utilizando DNAase I de acordo com o protocolo padrão (Sambrook et al, Molecular cloning: A Laboratory manual. 2ª ed, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NI, 1989). A presente invenção relaciona-se a proteínas de comprimento completo selecionada dos grupos de proteínas identificadas acima. O DNA codificando as proteínas de comprimento completo da invenção possa alternativamente ser fragmentado utilizando endonucleoases de restrição específicas. Os fragmentos de DNA são ainda purificados utilizando procedimentos padrões descritos em Sambrook et al, Molecular cloning: A Laboratory manual, 2ª ed, CSHL Press, Cold Spring Harbor, NI, 1989.

A sequência de DNA codificando uma proteína de comprimento completo pode também ser de origem genômica ou cDNA, por exemplo, obtidos por preparação de uma biblioteca genômica ou cDNA e selecionando para sequências de DNA codificando para toda ou parte de proteína de comprimento completo por hibridização utilizando padrões de oligonucleotídeos sintéticos de acordo com técnicas padrões (cf. Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor, 1989). A sequência de DNA pode também ser preparada por reação em cadeia polimerase utilizando iniciadores específicos, por exemplo, como descrito em US 4.683.202 ou Salki et al, 1988. Science 239:487-491.

A sequência de DNA é então inserida em um vetor de expressão recombinante, que pode ser qualquer vetor, que pode convenientemente ser sujeito a procedimentos de DNA recombinante. A escolha do vetor sempre dependerá da célula hospedeira que ele vai ser introduzido. Então, o vetor pode ser um vetor replicante livremente, isto é, um vetor que existe como uma entidade extracromossomal, a replicação do qual é independente da replicação cromossomal, por exemplo, um plasmídeo. Alternativamente, o vetor pode ser um que, quando introduzido em uma célula hospedeira, é integrado no genoma da célula hospedeira e replicado junto com o(s) cromossomo(s) em que ele tenha sido integrado.

No vetor, a sequência de DNA codificando um peptídeo ou uma proteína de comprimento completo deve ser operavelmente conectado a uma sequência promotora adequada. O promotor pode ser qualquer sequência de DNA, que mostra atividade transcricional na célula hospedeira de escolha e pode ser derivado de genes codificando proteínas ou homólogas ou heterólogas para a célula hospedeira. Exemplos de promotores adequados para direcionar a transcrição da sequência de DNA codificante nas células mamíferas são o promotor SV 40 (Subramani *et al*, 1981, *Mol. Cell Biol.* 1:854-864), a promotor MT-1 (gene metalotioneína) (Palmiter *et al*, 1983, *Science* 222:809-814) ou o promotor tardio principal adenovírus 2. Um promotor adequado para uso em células de inseto é o promotor poliedrina (Vasuvedan *et al*, 1992, *FEBS Lett.* 311:7-11). Promotores adequados para uso em células de leveduras hospedeiras incluem promotores de genes

glicolíticos de levedura (Hitzeman et al, 1980, J. Biol. Chem. 255:12073-12080; Alber e Kawasaki, 1982, J. Mol. Appl. Gen. 1:419-434) ou genes de deidrogenase álcool (Young et al, 1982, em Genetic Engineering of Microorganisms for
5 Chemicals, Hollaender et al, eds., Plenum Press, NI), ou promotores TPI1 (US 4.599.311) ou ADH2- ϕ c (Russell et al, 1983, Nature 304:652-654). Promotores adequados para uso em células hospedeiras de fungos filamentosos são, por exemplo, o promotor ADH3 (McKnight et al, 1985, EMBO J. 4:2093-2099)
10 ou o promotor tpiA.

A seqüência de DNA codificante pode também ser operacionalmente conectada a um terminador adequado, tal como o terminado do hormônio de crescimento humano (Palmitier et al, op. cit) ou promotores (para hospedeiros
15 fúngicos) o TPI1 (Alber e Kawasaki, op. cit) ou ADH3 (McKnight et al, op. cit). O vetor pode ainda compreender elementos tais como sinais de poliadenilação (por exemplo, de SV 40 ou a região 5' Elb de adenovírus), seqüências enhancer transcripcionais (por exemplo, o enhancer SV 40) e
20 seqüências enhancer traducionais (por exemplo, uma codificando adenovírus VA RNAs).

O vetor de expressão recombinante pode ainda compreender uma seqüência de DNA capacita o vetor para replicar na célula hospedeira em questão. Um exemplo de tal
25 seqüência (quando a célula hospedeira é uma célula mamífera) é a origem SV 40 de replicação. O vetor pode também compreender um marcador selecionável, por exemplo, um gene do produto do qual complementa um defeito na célula

hospedeira, tal como o gene codificando a diidrofolato redutase (DHFR) ou um que confira resistência a um fármaco, por exemplo, neomicina, hidromicina ou metotrexato.

Os procedimentos utilizados para ligar as
5 seqüências de DNA codificando os peptídeos ou proteínas de comprimento completo, o promotor e o terminador, respectivamente, e para inseri-los em vetores adequados contendo a informação necessária para replicação, são bem conhecidos pelos versados na técnica (cf., por exemplo,
10 Sambrook et al, na obra citada).

Para obter peptídeos recombinantes da invenção as seqüências de DNA podem ser úteis fusionadas com uma seqüência de segundo peptídeo e uma clivagem de protease no sítio da seqüência codificante, dando uma construção de DNA
15 codificando a proteína de fusão, em que o local de clivagem da protease codificando a seqüência posicionada entre o fragmento HBP e segundo peptídeo codificando o DNA, inserido em um vetor de expressão recombinante, e expresso em células hospedeiras recombinantes. Em uma modalidade, o referido
20 segundo peptídeo selecionado de, mas não limitado ao grupo compreendendo glutathione-S-redutase, timosina de bezerro, tioredoxina bacteriana ou variantes naturais ou sintéticos ubiquitinados humanos, ou peptídeos dos mesmos. Em outra modalidade, uma seqüência peptídeo compreendendo um local de
25 clivagem de protease pode ser o Fator Xa, com a seqüência aminoácida IEGR, enteroquinase, com a seqüência aminoácida DDDDK, trombina, com a seqüência aminoácida LVPR/GS, ou *Acharombacter lyticus*, com a seqüência aminoácida XKX, sítio

de clivagem.

A célula hospedeira em que o vetor de expressão é introduzido pode ser qualquer célula que seja capaz de expressão de peptídeos ou proteínas de comprimento completo, e é preferivelmente uma célula eucariótica, tais como células invertebradas (inseto) ou células vertebradas, por exemplo, oócitos *Xenopus laevis* ou células mamíferas, em particular células de inseto e mamíferas. [Exemplos de linhagens de células mamíferas adequadas são as linhagens celulares HEK293 (ATCC CRL-1573), COS (ATCC CRL-1650), BHK (ATCC CRL-1632, ATCC CCL-10) ou CHO (ATCC CCL-61)]. Métodos de transfectar células mamíferas e expressando as seqüências de DNA introduzidas nas células são descritas em, por exemplo, Kaufman e Sharp, J. Mol. Biol. 159, 1982, pp. 601-621; Southern e Berg, 1982, J. Mol. Appl. Genet. 1:327-341; Loyter et al, 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 79:422-426; Wigler et al, 1978, Cell 14:725; Corsaro e Pearson, 1981, em Somatic Cell Genetics 7, p.603; Graham e van der Eb, 1973, Virol. 52:456; e Neumann et al, 1982, EMBO J. 1:841-845.

Alternativamente, células de fungos (incluindo células de levedura) podem ser utilizadas como células hospedeiras. Exemplos de células de levedura adequadas incluem células de *Saccharomyces* spp. ou *Schizosaccharomyces* spp. em cepas particulares de *Saccharomyces cerevisiae*. Exemplos de outras células fúngicas são células de fungos filamentosos, por exemplo, *Aspergillus* spp. ou *Neurospora* spp., em cepas particulares de *Aspergillus oryzae* ou *Aspergillus niger*. O uso de *Aspergillus* spp. para a

expressão de proteínas é descrita em, por exemplo, EP 238 023.

O meio utilizado para as culturas de células pode ser qualquer meio convencional adequado para crescimento de células de mamíferos, tal como meio contendo soro ou livre de soro contendo suplementos apropriados, ou um meio adequado para crescimento de inseto, levedura ou células fúngicas. Meios adequados são disponíveis de fornecedores comerciais ou podem ser preparados de acordo com fórmulas publicadas (por exemplo, em catálogos da American Type Culture Collection).

Os peptídeos ou proteínas de comprimento completo recombinantemente produzidos pelas células pode então ser recuperadas do meio de cultura por procedimentos convencionais incluindo a separação de células de hospedeiro do meio por centrifugação ou filtração, precipitando os componentes proteínáceos do sobrenadante ou filtrado por meios de um sal, por exemplo, sulfato de amônio, purificação por uma variedade de procedimentos cromatográficos, por exemplo, HPLC, cromatografia de troca iônica, cromatografia por afinidade, ou semelhantes.

Preparação Sintética

Os métodos para produção sintética de peptídeos são bem conhecidos na técnica. Descrições detalhadas bem como práticas de recomendação para produção de peptídeos sintéticos podem ser encontradas em Synthetic Peptides: A User's Guide (Advances in Molecular Biology), Grant G. A., ed., Oxford University Press, 2002, ou em: Pharmaceutical

Formulation: Development of Peptides and Proteins, Frokjaer e Hovgaard eds., Taylor e Francis, 1999.

Peptídeos podem, por exemplo, ser sintetizados por uso de química Fmoc e com cisteínas protegidas por Acm. Após
5 purificação por HPLC de fase reversa, peptídeos podem ser ainda processados para obter, por exemplo, isoformas modificadas cíclicas ou C- ou N-terminal. Os métodos para ciclização e modificação terminal são bem conhecidos na técnica e descritos em detalhes nos manuais citados acima.

10 Em uma modalidade preferida as seqüências de peptídeo da invenção são produzidas sinteticamente, em particular, pelo método Síntese de Peptídeo Assistida por Seqüência (SAPD).

Por peptídeos SAPS podem ser sintetizados ou
15 analisados em um recipiente de polietileno equipado com um filtro de polipropileno para filtração ou em uma versão de fluxo contínuo do método de fase sólida de poliamida (Dryland, A. e Sheppard, R. C. (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. I, 125-137) em um sintetizador de peptídeo
20 completamente mecanizado utilizando 9-fluorenílmétiloxicarbonil (Fmoc) ou tert-butiloxicarbonil, (Boc) como grupo protetor N-α-amino e grupos de proteção comum adequado para funcionalidade de cadeia lateral.

Quando sintetizado, seqüências peptídeos
25 individuais podem então ser formuladas como multímeros utilizando técnicas bem conhecidas na técnica, por exemplo, dímeros das seqüências podem ser obtidos pelo método de LPA descritas em WO 00/18791, polímeros dendriméticos pela

síntese MAP descrita em PCT/US90/02039.

Anticorpo

É um objetivo de a presente invenção prover um anticorpo, fragmento ligador de antígeno ou proteína recombinate do mesmo capaz de reconhecer e seletivamente ligar a um epítopo em GDNF, ARTN, NRTN, PSTN, TGF beta 1, TGD beta 2, TGF beta 3 e/ou TGF beta 4, o referido epítopo compreendendo o motivo da invenção ou uma seqüência selecionada de SEQ ID NOs:1-22, ou um fragmento da referida seqüência.

Pelo termo "epítopo" significa o grupo específico de átomos (em uma molécula de antígeno) que é reconhecida por (que é do antígeno) anticorpos (assim causando uma resposta imune). O termo "epítopo" é o equivalente para o termo "determinante antigênico". O epítopo pode compreender 3 ou mais resíduos aminoácidos, tais como, por exemplo, resíduos aminoácidos 4, 5, 6, 7, 8, localizados em bem próximos, tal como dentro de uma seqüência aminoácida contígua, ou localizada em partes distantes da seqüência aminoácida de um antígeno, mas devido a proteína dobrada ter sido aproximada a cada outra.

Moléculas de anticorpos pertencentes a uma família de proteínas do plasma chamadas imunoglobulinas que bloqueiam a construção básica, a prega ou domínio da imunoglobulina, é utilizado em várias formas em muitas moléculas do sistema imune e outros sistemas de reconhecimento biológico. Uma imunoglobulina típica tem quatro cadeias polipeptídicas, contendo uma região de

ligação de antígeno conhecida como uma região variável e uma região conhecida não variante como a região constante.

Anticorpos nativos e imunoglobulinas são usualmente glicoproteínas heterotetraméricas de cerca de 5 150.000 daltons, compostas de duas cadeias leves idênticas (L) e duas cadeias pesadas (H) idênticas. Cada cadeia leve é ligada a uma cadeia pesada por uma ligação dissulfeto covalente, enquanto o número de ligações dissulfetos varia entre as cadeias pesada de diferentes isotipos de 10 imunoglobulinas. Cada cadeia pesada e leve pode também ter pontes de dissulfeto intracadeias regularmente espaçadas. Cada cadeia pesada tem em uma terminação um domínio variável (VH) seguida por um número de domínios constantes. Cada cadeia leve tem um domínio variável em uma terminação (VL) e 15 um domínio constante em sua outra terminação. O domínio constante de cadeia leve é alinhado com o primeiro domínio constante de cadeia pesada, e o domínio variável de cadeia leve é alinhado com o domínio variável da cadeia pesada. Resíduos aminoácidos particulares são acreditados para 20 formar uma interface entre os domínios variáveis de cadeia leve e pesada (Novotny J, & Haber E. Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 82(14):4592-6, 1985).

Dependendo das seqüências aminoácidas do domínio constante de suas cadeias pesadas, imunoglobulinas podem ser 25 determinadas a classes diferentes. Existem pelo menos cinco (5) classes principais de imunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, e várias dessas podem ser ainda divididas em subclasses (isotipos), por exemplo, IgG-1, IgG-2, IgG-3 e

IgG-4; IgA-1 e IgA-2. Os domínios constantes de cadeias pesadas que correspondem a diferentes classes de imunoglobulinas são chamadas alfa (α), delta (δ), epsilon (ϵ), gama (γ) e mu (μ), respectivamente. As cadeias leves de anticorpos podem ser assigned por um de dois tipos claramente distintos, chamados kappa (κ) e lambda (λ), baseados nas seqüências amino de seu domínio constante. As subunidades de estruturas e configurações tri-dimensionais de diferentes classes de imunoglobulinas são bem conhecidas.

O termo "variável" no contexto de domínio variável de anticorpos, refere-se ao fato que certas porções dos domínios variáveis diferem extensivamente na seqüência entre anticorpos. Os domínios variáveis são para ligar e determinar a especificidade de cada anticorpo particular para seu antígeno particular. Entretanto, variabilidade não é igualmente distribuída através de domínios variáveis de anticorpos. É concentrado em três segmentos chamados de regiões determinantes de complementariedade (CDRs) também conhecidos como regiões hipervariáveis ambos nos domínios da cadeia leve e cadeia pesada variáveis.

As porções mais altamente conservadas de domínios variáveis são chamadas de regiões conservadas (RC). Os domínios variáveis de cada cadeia pesada e leve nativas compreendem quatro regiões FR, largamente uma configuração adotando folha β , conectadas por três CDRs, que formam alças conectoras, e em alguns casos formando parte da estrutura folha β . Os CDRs em cada cadeia são mantidos juntos em proximidade pelas regiões FR e, com os CDRs de outra cadeia,

contribuem para a formação do sítio de ligação de antígeno dos anticorpos. Os domínios constantes não são envolvidos diretamente na ligação de anticorpo para um antígeno, mas
5 exibe várias funções efetoras, tal como participação do anticorpo na toxicidade celular dependente de anticorpo.

Um anticorpo que é contemplado para uso na presente invenção então pode estar em qualquer de uma variedade de formas, incluindo uma imunoglobulina inteira, um fragmento de anticorpo tal como Fv, Fab, e fragmentos
10 similares, um anticorpo de cadeia única que incluir as regiões determinantes de complementaridade de domínio variáveis (CDR), e formas semelhantes, todas das quais caem sob o termo amplo "anticorpo", como aqui utilizado. A presente invenção contempla o uso de qualquer especificidade
15 de um anticorpo, policlonal ou monoclonal, e não é limitado a anticorpos que reconhecem e imunoreagem com um antígeno específico. Em modalidades preferidas, no contexto de ambos, métodos terapêuticos e de seleção descritos abaixo, um anticorpo ou fragmento do mesmo é utilizado que é
20 imuno-específico para um antígeno ou epítopo da invenção.

O termo "fragmento de anticorpo" refere-se a uma porção de um anticorpo de comprimento completo, geralmente o antígeno ligante ou região variável. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem Fab, Fab', F(ab')₂ e fragmentos Fv; A
25 digestão de anticorpos papaína produz dois fragmentos de ligação de antígeno idênticos, chamado o fragmento Fab, cada com um sítio de ligação de antígeno único, e um resíduo de fragmento "Fc", assim chamado por sua habilidade de

cristalizar facilmente. Tratamento de pepsina produz um fragmento $F(ab')_2$ que tem dois fragmentos de ligação de antígeno que são capazes de antígeno de ligação cruzada, e um outro fragmento residual (que é denominado pFc').

5 Fragmentos adicionais podem incluir dianticorpos, anticorpos lineares, moléculas de anticorpo de cadeia única, e anticorpos multiespecíficos formados de fragmentos de anticorpos. Como aqui utilizado, "fragmento funcional" com respeito a anticorpos, referem-se a fragmentos F_v , $F(ab)$ e
10 $F(ab')_2$.

O termo "fragmento anticorpo" é aqui utilizado alternadamente com o termo "fragmento de ligação a antígeno".

Fragmentos de anticorpo podem ser pequenos como
15 cerca de 4 aminoácidos, 5 aminoácidos, 6 aminoácidos, 7 aminoácidos, 9 aminoácidos, cerca de 12 aminoácidos, cerca de 15 aminoácidos, cerca de 17 aminoácidos, cerca de 18 aminoácidos, cerca de 20 aminoácidos, cerca de 25 aminoácidos, cerca de 30 aminoácidos ou mais. Em geral, um
20 fragmento de anticorpo da invenção pode ter qualquer tamanho superior ao limite enquanto ele tem propriedades similares ou imunológicas relativas ao anticorpo que se liga com especificidade a um epítopo compreendendo uma seqüência de peptídeo selecionada de qualquer das seqüências
25 identificadas aqui como SEQ ID NOs: 1-22 ou fragmento das referidas seqüências. Então, no contexto da presente invenção o termo "fragmento de anticorpo" é idêntico ao termo "fragmento de ligação de antígeno".

Fragmentos de anticorpos retêm algumas habilidades para ligar seletivamente com seu antígeno ou receptor. Alguns tipos de fragmentos de anticorpos são definidos como segue:

5 (1) Fab é o fragmento que contém um fragmento de ligação de antígeno monovalente de uma molécula de anticorpo. Um fragmento Fab pode ser produzido por digestão do anticorpo total com a enzima papaína para produzir uma cadeia leve intacta e uma porção de uma cadeia pesada.

10 (2) Fab' é o fragmento de uma molécula de anticorpo pode ser obtida por tratamento do anticorpo total com pepsina, seguida por redução, para produzir uma cadeia leve intacta e uma porção da cadeia pesada. Dois fragmentos Fab' são obtidos por molécula de anticorpo.

15 Fragmentos Fab' difere dos fragmentos Fab pela adição de uns poucos resíduos na terminação carboxil da cadeia pesada do domínio CH1 incluindo uma ou mais cisteínas da região dobradiça do anticorpo.

20 (3) (Fab')₂ é o fragmento de um anticorpo que pode ser obtido pelo tratamento do anticorpo total com a enzima pepsina sem redução subsequente.

 (4) F(ab')₂ é um dímero de dois fragmentos Fab' mantido junto por duas ligações dissulfeto.

25 Fv é o fragmento de anticorpo mínimo que contém um reconhecimento de antígeno completo e sítio de ligação. Esta região consiste de um dímero de um domínio variável de cadeia pesada e uma leve em uma associação não covalente estreita (dímero VH-VL). É nesta configuração que os três

CDRs de cada domínio variável interage para definir um sítio de ligação de antígeno na superfície do dímero VH-VL. Coletivamente, os seis CDRs conferem especificidade de ligação de antígeno do anticorpo. Entretanto, mesmo um
5 domínio variável único (ou metade de um Fv compreendendo somente três CDRs específicos para um antígeno) tem a habilidade de reconhecer e ligar ao antígeno, embora em uma menor afinidade que o sítio de ligação inteiro.

(5) Anticorpo de cadeia única ("SCA"), definido
10 como uma molécula geneticamente produzida contendo a região variável da cadeia leve, a região variável da cadeia pesada, ligada por um ligante polipeptídeo adequado como uma molécula de cadeia única geneticamente fusionada. Tais anticorpos de cadeia única são também referidos como "Fv de
15 cadeia única" ou fragmentos de anticorpos "sFv". Geralmente, o polipeptídeo Fv ainda compreende um ligador polipeptídeo entre os domínios VH e VI que permite o sFv formar a estrutura desejada para ligação de antígeno. Para uma revisão de sFv ver Pluckthun em The Pharmacology of
20 Monoclonal Antibodies 113: 269-315 Rosenberg e Moore eds. Springer-Verlag, NY, 1994.

O termo "dianticorpos" refere-se a um fragmento de anticorpo pequeno com dois sítios de ligação de antígeno, cujos fragmentos compreendem um domínio variável de cadeia
25 pesada (VH) conectado a um domínio variável de cadeia leve (VL) na mesma cadeia polipeptídica (VH-VL). Pelo uso de um ligador que é muito curto para permitir o pareamento entre os dois domínios da mesma cadeia, os domínios são forçados a

parear com domínios complementares de outra cadeia e criar dois sítios de ligação de antígeno. Dianticorpos são descritos mais completamente em, por exemplo, EP 404.097; WO 93/11161, e Hollinger et al, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 5 90:6444-6448 (1993).

A invenção contempla ambos, anticorpo policlonal e monoclonal, fragmentos de ligação a antígeno e proteínas recombinantes dos mesmos, que são capazes de se ligar a um epítopo de acordo com a invenção.

10 A preparação de anticorpos policlonais é bem conhecida pelos versados na técnica. Ver, por exemplo, Green et al, 1992. Production of Polyclonal Antisera, em: Immunochemical Protocols (Manson, ed.), páginas 1-5 (Humana Press); Coligan, et al, Production of Polyclonal Antisera in 15 Rabbits, Rats Mice and Hamsters, em: Current Production of Polyclonal Antisera in Rabbits, Rats Mice and Hamsters, em: Current Protocols in Immunology, seção 2.4.1, que são aqui incorporados por referência.

A preparação de anticorpos monoclonais da mesma 20 forma é convencional. Ver, por exemplo, Kohler & Milstein, Nature, 256:495-7 (1975); Coligan et al, seções 2.5.1-2.6.7; e Harlow et al, em: Antibodies: A Laboratory Manual, páginas 726, Cols Spring Harbor Pub. (1988). Anticorpos monoclonais podem ser isolados e purificados de culturas de hibridomas 25 por uma variedade de técnicas bem estabelecidas. Tais técnicas de isolamento incluem cromatografia por afinidade com Sefarose Proteína-A, cromatografia por exclusão de tamanho, e cromatografia de troca iônica. Ver, por exemplo, Coligan

et al, seções 2.7.1-2.7.12 e seções 2.9.1-2.9.3; Bames et al, Purification of Immunoglobulin G (IgG) em: Methods in Molecular Biology, 1992, 10:79-104, Humana Press, NI.

Métodos de manipulação in vitro e in vivo de anticorpos monoclonais são bem conhecidos por aqueles versados na técnica. Por exemplo, os anticorpos monoclonais a serem utilizados de acordo com a presente invenção podem ser feitos pelo método de hibridoma primeiro descrito por Kohler e Milstein, 1975, Nature 256, 495-7, ou pode ser feito pelos métodos recombinantes, por exemplo, como descrito em EUA 4.816.567. Os anticorpos monoclonais para uso com a presente invenção podem também ser isolados de bibliotecas de fagos de anticorpo utilizando as técnicas descritas em Clackson et al, 1991, Nature 352:624-628, bem como em Marks et al, 1991, J Mol Biol 222: 581-597. Outro método envolve humanização de um anticorpo monoclonal por meio recombinante para gerar anticorpos contendo seqüências humanas específicas e reconhecíveis. Ver, para revisão, Holmes et al, 1997, J Immunol 158:2192-2201 e Vaswani et al, 1998, Annals Allergy, Asthma & Immunol 81:105-115.

O termo "anticorpo monoclonal" como aqui utilizado refere-se a um anticorpo obtido de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, isto é, os anticorpos individuais compreendendo a população são idênticos exceto para possível ocorrência de mutações naturais que podem estar presentes em quantidades menores. Anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo direcionados contra um sítio antigênico único. Além disso,

em contraste às preparações de anticorpo policlonal convencional que tipicamente incluem diferentes anticorpos direcionados contra determinantes diferentes (epítomos), cada anticorpo monoclonal é direcionado contra um
5 determinante único no antígeno. Em adição a sua especificidade, os anticorpos monoclonais são vantajosos porque eles são sintetizados pela cultura de hibridoma, não contaminada por outras imunoglobulinas. O modificador "monoclonal" indica o caráter do anticorpo como sendo obtido
10 de uma população de anticorpos substancialmente homogênea, e não ser construída como requerendo produção do anticorpo por qualquer método particular.

Os anticorpos monoclonais aqui especificamente incluem anticorpos "quiméricos" (imunoglobulinas) em que uma
15 porção da cadeia pesada e/ou leve é idêntica com ou homóloga às seqüências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie particular ou pertencendo a uma classe ou subclasse de anticorpo particular, enquanto os resíduos da(s) cadeia(s) são idênticos com ou homóloga as seqüências
20 correspondentes em anticorpos derivados de outras espécies ou pertencendo a outra classe ou subclasse de anticorpo, bem como fragmentos de tais anticorpos, contanto que eles exibam a atividade biológica desejada (EUA 4.816.567); Morrison *et al*, 1984, Proc Natl Acad Sci 81:6851-6855.

25 Métodos de fazer fragmentos de anticorpo são conhecidos na técnica (ver, por exemplo, Harlow e Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1988, aqui incorporado por referência).

Fragments de anticorpo da presente invenção podem ser preparados por hidrólise proteolítica do anticorpo ou por expressão em *E. coli* de DNA codificando o fragmento. Fragmentos de anticorpo podem ser obtidos por digestão de

5 pepsina ou papaína de anticorpos inteiros por métodos convencionais. Por exemplo, fragmentos de anticorpos podem ser produzidos por clivagem enzimática de anticorpos com pepsina para prover um fragmento 5S denotado F(ab')₂. Este fragmento pode ser ainda clivado utilizando um agente

10 redutor tiol, e opcionalmente um grupo bloqueador para os grupos sulfidril resultando de clivagem de ligações dissulfeto, para produzir fragmentos monovalentes 3.5S Fab'. Alternativamente, uma clivagem enzimática utilizando produtos pepsina produz dois fragmentos monovalentes Fab' e

15 um fragmento Fc diretamente. Esses métodos são descritos, por exemplo, em EUA 4.036.945 e EUA 4.331.647, e referências contidas nas mesmas. Essas patentes são aqui incorporadas em suas totalidades por referência.

Outros métodos de clivagem de anticorpos, tais

20 como separação de cadeias pesadas para formar fragmentos de cadeia leve-pesada monovalentes, ainda clivagem de fragmentos, ou outras técnicas enzimáticas, químicas ou genéticas possa também ser utilizada, contanto que os fragmentos se ligam ao antígeno que é reconhecido pelo

25 anticorpo intacto. Por exemplo, fragmentos Fv compreendem uma associação de cadeias VH e VL. Esta associação pode ser não covalente ou as cadeias variáveis podem ser ligadas por uma ligação dissulfeto intermolecular ou ligação cruzada por

químico tal como glutaraldeído. Preferivelmente, os fragmentos Fv compreendem cadeias VH e VL conectadas por um ligador peptídeo. Essas proteínas ligantes de antígeno de cadeia única (sFv) são preparadas por construção de um gene
5 estrutural compreendendo seqüências de DNA codificando os domínios VH e VL conectados por um oligonucleotídeo. O gene estrutural é inserido em um vetor de expressão, que é subsequentemente introduzido em uma célula hospedeira tal como *E. coli*. As células hospedeiras recombinantes
10 sintetizam uma cadeia polipeptídica única com um peptídeo ligador trazendo os dois domínios V. Métodos para produção de sFvs são descritos, por exemplo, por Whitlow, et al, 1991, em: *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 2:97; Bird et al, 1988, *Science* 242:423-426; EUA 4.946.778; e Pack et al, 1993, *BioTechnology* 11:1271-77.

Outra forma de um fragmento de anticorpo é um peptídeo codificando para uma região determinante de complementaridade única (CDR). Peptídeos CDR ("unidades de reconhecimento mínimo") são sempre envolvidos no
20 reconhecimento e ligação de antígeno. Peptídeos CDR podem ser obtidos por clonagem ou construção de genes codificando o CDR de um anticorpo de interesse. Tais genes são preparados, por exemplo, pelo uso da reação em cadeia polimerase para sintetizar a região variável do RNA das
25 células produtoras de anticorpo. Ver, por exemplo, Larrick et al, *Methods: a Companion to Methods in Enzymology*, Vol. 2, página 106 (1991).

A invenção contempla formas humanas e humanizadas

de anticorpos não humanos (por exemplo, murino). Tais anticorpos humanizados são imunoglobulinas quiméricas, cadeias de imunoglobulinas ou fragmentos das mesmas (tais como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ ou outras subseqüentes ligadoras de antígenos de anticorpos) que contém uma seqüência mínima derivada de imunoglobulina não humana, tal como o epítopo reconhecedor da seqüência. Para a maior parte, anticorpos humanizados são imunoglobulinas (anticorpo recipiente) em que resíduos de uma região determinante de complementaridade (CDR) do recipiente são substituídos por resíduos de um CDR de umas espécies não humanas (doador de anticorpo) tais como camundongo, rato ou coelho tendo a especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Anticorpo(s) humanizado(s) contendo uma (a) seqüência (s) mínima de anticorpo(s) da invenção, tal como uma(s) seqüência (s) reconhecendo o(s) epítopo(s) descrito(s) aqui, em uma das modalidades preferidas da invenção.

Em alguns exemplos, resíduos de regiões conservadas Fv da imunoglobulina humana são substituídos por resíduos não humanos correspondentes. Além disso, anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados ou no anticorpo recipiente nem no CDR importado ou seqüências de regiões conservadas. Essas modificações são feitas para ainda refinar e aperfeiçoar o desempenho do anticorpo. Em geral, anticorpos humanizados compreenderão substancialmente todos de pelo menos um, e tipicamente dois, domínios variáveis, em que toda ou substancialmente todas as regiões CDR correspondem aquelas de uma imunoglobulina não

humana e todas ou substancialmente todas das regiões FR são aquelas de uma seqüência consenso de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado otimamente também compreenderá pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente aquela de uma imunoglobulina humana. Para 5 detalhes adicionais, ver: Jones *et al*, 1986, Nature 321, 522-525; Reichmann *et al*, 1988, Nature 332, 323-329; Presta, 1992, Curr Op Struct Biol 2:593-596; Holmes *et al*, 1997, J Immunol 158:2192-2201 e Vaswani, *et al*, 1998, Annals 10 Allergy, Asthma & Immunol 81:105-115.

A geração de anticorpos pode ser alcançada por qualquer método padrão na técnica para produção de anticorpos policlonais e monoclonais utilizando fragmentos naturais ou recombinantes de GDNF, ARTN, NRTN, PSTN, TGF 15 beta 1, TGF beta 2, TGF beta 3 e TGF beta 4, o referido fragmento compreendendo uma seqüência selecionada da SEQ ID NO:1-22, como um antígeno. Tais anticorpos podem ser também gerados utilizando variantes, homólogos ou fragmentos de seqüências de peptídeo de SEQ ID NOs:1-22, os referidos 20 variantes, homólogos e fragmentos são seqüências de peptídeo imunogênico que encontram os seguintes critérios:

(i) sendo uma seqüência aminoácida contígua de pelo menos 6 aminoácidos;

(ii) compreendendo p motivo da invenção.

25 Os anticorpos podem também serem produzidos in vivo pelo indivíduo a ser tratado, por exemplo, pela administração de um fragmento imunogênico de acordo com a invenção ao referido indivíduo. Conseqüentemente, a presente

invenção ainda relaciona-se a uma vacina compreendendo um fragmento imunogênico descrito acima.

O pedido também se relaciona a um método para produzir um anticorpo da invenção do referido método
5 compreendendo um passo de prover um fragmento imunogênico descrito acima.

A invenção relaciona-se a ambos os anticorpos, que são capazes de modular, tal como aumentar ou atenuar a função biológica de GDNF, ARTN, NRTN, PSTN, TGF beta 1, TGF
10 beta 2, TGF beta 3 e TGF beta 4, em particular uma função relacionada a diferenciação celular neural, sobrevivência e/ou plasticidade, e para um anticorpo, que pode reconhecer e especificamente se ligar as proteínas tardias sem modular a atividade biológica da mesma.

15 A invenção relaciona-se ao uso dos anticorpos acima para 1) aplicações terapêuticas quando da modulação da atividade de GDNF, ARTN, NRTN, PSTN, TGF beta 1, TGF beta 2, TGF beta 3 e TGF beta 4 humana é necessário, 2) detectar e/ou monitorar as proteínas tardias in vitro e/ou in vivo
20 para propósitos diagnósticos, 3) propósitos de pesquisa.

Composição Farmacêutica

A invenção também se relaciona a uma composição farmacêutica compreendendo um ou mais dos compostos definidos acima, em que o composto é capaz de estimular o
25 crescimento do neurito e/ou diferenciação celular neural, sobrevivência de células neurais e/ou estimulação do aprendizado e/ou memória. Então, a invenção se relaciona a uma composição farmacêutica capaz de estimular a

diferenciação de células neuronais e/ou estimular a regeneração de células neuronais, e/ou estimular a plasticidade neuronal em conexão com aprendizado e memória, e/ou estimulando a sobrevivência de células neurais.

5 No presente contexto, o termo "composição farmacêutica" é utilizado sinonimamente com o termo "medicamento".

 Em uma composição as seqüências de peptídeo podem ser formuladas como compreendendo fragmentos de peptídeos
10 individuais isolados ou multímeros ou dímeros dos mesmos como discutido acima.

 A composição farmacêutica pode ter os efeitos descritos acima nas células in vitro ou in vivo, em que a composição é administrada a um paciente.

15 O medicamento da invenção compreende uma quantidade efetiva de um ou mais dos compostos como definido acima, ou uma composição como definido acima em combinação com os aditivos farmacêuticamente aceitáveis. Tal medicamento pode adequadamente ser formulado para
20 administração oral, percutânea, intramuscular, intravenosa, intracraniana, intratecal, intracerebroventricular, intranasal ou pulmonar.

 Estratégias no desenvolvimento de formulação de medicamentos e composições baseadas nos compostos da
25 presente invenção geralmente correspondem a estratégias de formulação para qualquer outro produto fármaco baseado em proteína. Problemas potenciais e a orientação requerida para superar esses problemas são distribuídos com vários livros

textos, por exemplo, "Therapeutic Peptides and Protein Formulation. Processing and Delivery Systems", Ed. A;K; Banga, Technomic Publishing AG, Basel, 1995.

Injetáveis são normalmente preparados ou como
5 soluções líquidas ou suspensões, formas sólidas adequadas para solução em, ou suspensão em, líquido antes a injeção. A preparação pode também ser emulsificada. O ingrediente ativo é sempre misturado com excipientes que são farmacologicamente aceitáveis e compatíveis com o ingrediente ativo.
10 Excipientes adequados são, por exemplo, água, salina, dextrose, glicerol, etanol ou semelhantes, e combinações dos mesmos. Em adição, se desejado, a preparação pode conter menores quantidades de substâncias auxiliares tais como agentes umidificantes ou emulsificantes, agentes tamponantes
15 de pH, ou que aumentam a efetividade ou transporte da preparação.

Formulações dos compostos da invenção podem ser preparadas por técnicas conhecidas por um versado na técnica. As formulações podem conter veículos
20 farmacologicamente aceitáveis e excipientes incluindo microesferas, lipossomos, microcápsulas, nanopartículas ou semelhantes.

A preparação pode adequadamente ser administrada por injeção, opcionalmente no local onde o ingrediente ativo
25 é para exercer seu efeito. Formulações adicionais que são adequadas para outros modos de administração incluem supositórios, nasal, pulmonar e em alguns casos, formulações orais. Para supositórios, ligantes tradicionais e veículos

incluem polialquilenos glicóis ou triglicerídeos. Tais supositórios podem ser formados de misturas contendo o(s) ingrediente(s) ativo(s) na variação de 0,5% a 10%, preferivelmente 1-2%. Formulações orais incluem tais excipientes normalmente empregados como, por exemplo, graus farmacêuticos de manitol, lactose, amido, esterato de magnésio, sacarina sódica, celulose, carbonato de magnésio e semelhantes. Essas composições tomam a forma de soluções, suspensões, comprimidos, pílulas, cápsulas, formulações de liberação controlada ou pós e geralmente contêm 10-95% do (s) ingrediente(s) ativo(s), preferivelmente 25-70%.

Outras formulações são tais adequadas para administração nasal e pulmonar, por exemplo, inaladores e aerossóis.

O composto ativo pode ser formulado como formas neutras ou sais. Sais farmacêuticamente aceitáveis incluem sais de adição ácida (formados com os grupos amino livres do composto peptídeo) e que são formados com ácidos inorgânicos tais como, por exemplo, ácidos clorídrico ou fosfórico, ou tais ácidos orgânicos com ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido mandélico, e semelhantes. Sais formados com o grupo carboxila livre podem também ser derivados de bases inorgânicas tais como, por exemplo, hidróxido de sódio, de potássio, de amônio, de cálcio, ou férrico, e tais bases orgânicas como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína e semelhantes.

As preparações são administradas em uma forma

compatível com a formulação de dosagem, e em tal quantidade como será terapeuticamente efetiva. A quantidade a ser administrada depende no paciente a ser tratado, incluindo, por exemplo, o peso e idade do paciente, a doença a ser tratada e o estágio de doença. Variações de dosagem adequadas são por quilo do peso corporal normalmente da ordem de vários cem μg do ingrediente ativo por administração com uma variação preferida de cerca de 0,1 μg a 5000 μg por quilo do peso corporal. Utilizando formas monoméricas dos compostos, as dosagens adequadas são sempre na variação de cerca de 0,1 μg a 5000 μg por quilo do peso corporal, tal como na variação de cerca de 0,1 μg a 3000 μg por quilo de peso corporal, e especialmente na variação de cerca de 0,1 μg a 1000 μg por quilo de peso corporal. Utilizando formas multiméricas dos compostos, as dosagens adequadas são sempre na variação de 0,1 μg a 1000 μg por quilo do peso corporal, tal como na variação de cerca de 0,1 μg a 750 μg por quilo do peso corporal, e especialmente na variação de cerca de 0,1 μg a 500 μg por quilo do peso corporal como na variação de cerca de 0,1 μg a cerca de 250 μg por quilo do peso corporal. Em particular, quando dosagens menores administradas nasalmente são utilizadas quando administradas por outras vias. Administração pode ser feita uma vez ou pode ser seguida por administrações subseqüentes. A dosagem será também dependente da via de administração e variará com a idade e peso do paciente a ser tratado. Uma dosagem preferida de formas multiméricas pode ser no intervalo de 1 mg a 70 mg por 70 kg de peso corporal.

Para algumas indicações uma aplicação localizada ou substancialmente localizada é preferida.

Alguns dos compostos da presente invenção são suficientemente ativos, mas para alguns dos outros, o efeito
5 será aumentado se a preparação ainda compreender aditivos farmacêuticamente aceitáveis e/ou veículos. Tais aditivos e veículos serão conhecidos na técnica. Em alguns casos, será vantajoso incluir um composto, que promova distribuição da substância ativa para seu alvo.

10 Em muitos exemplos, será necessário administrar a formulação de tempo múltiplo. A administração pode ser uma infusão contínua, tal como infusão ou administração intraventricular em mais doses tais como mais vezes por dia, diariamente, mais vezes em uma semana, semanalmente etc.

15 Preferivelmente o medicamento será administrado dentro de 8 horas do fator inicial, tal como dentro de 5 horas do fator inicial. Muitos dos compostos exibem um efeito de longo termo pelo qual a administração dos compostos pode ser conduzida com longos intervalos, tais como 1 semana ou 2
20 semanas.

Em conexão com o uso em nervos guias, a administração pode ser contínua ou em porções menores baseados sob liberação controlada do(s) composto(s) ativo(s). Além disso, precursores podem ser utilizados para
25 controle da taxa de liberação e/ou o sítio de liberação. Outros tipos de implantes e bem como administração oral pode similarmente ser baseados sob liberação controlada e/ou o uso de precursores.

Como discutido acima, a presente invenção relaciona-se ao tratamento de indivíduos para indução da diferenciação, estimulando a regeneração, plasticidade e sobrevivência de células neurais in vitro ou in vivo, o
5 referido tratamento envolvendo a administração de uma quantidade efetiva de um ou mais compostos como definido acima.

Outra estratégia para administração é implantar ou injetar células capazes de expressar e secretar o composto
10 em questão. Assim o composto pode ser produzido no local onde ele vai agir.

Tratamento

Em um aspecto adicional, a presente invenção relaciona-se a referidos peptídeos, fragmentos, ou variantes
15 dos mesmos para uso na indução da diferenciação e/ou estimulação da regeneração, plasticidade e/ou sobrevivência de células neurais. O uso é para o tratamento para prevenir doenças e condições do sistema nervoso central e periférico, e dos músculos ou de vários órgãos.

20 Tratamento pelo uso de compostos/composições de acordo com a invenção é uma das modalidades úteis para indução da diferenciação, modulação da proliferação, estimulação da regeneração, plasticidade neuronal e sobrevivência de células sendo implantadas ou
25 transplantadas. Isto é particularmente útil quando do uso de compostos tendo um efeito de longa duração.

Então, o tratamento compreende tratamento e/ou profilaxia de morte celular na relação de doenças ou

condições dos sistemas nervoso central e periférico, tais como dano nervoso pós-operatório, dano nervoso traumático, por exemplo, resultando de injúria da espinha vertebral, mielinização impedida de fibras nervosas, danos pós-esquemáticos, por exemplo, resultando de um derrame, demência multi-infarto, esclerose múltipla, degeneração nervosa associada com diabetes mellitus, degeneração neuromuscular, esquizofrenia, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, ou doença de Huntington.

10 Também, em relação a doenças ou condições dos músculos incluindo condições com função impedida das conexões neuromusculares, tais como distúrbios de atrofia muscular genética ou traumática; ou para o tratamento de doenças ou condições de vários órgãos, tais como condições
15 degenerativas das gônadas, do pâncreas, tais como diabetes mellitus tipo I e II, do rim, tal como nefrose dos compostos de acordo com a invenção pode ser utilizada para induzir a diferenciação, modulação da proliferação, estimulação da regeneração, plasticidade neuronal e sobrevivência, isto é,
20 estimulação da sobrevivência.

Em ainda uma modalidade adicional para uso do composto e/ou composição farmacêutica é para a estimulação da habilidade para aprender e/ou para a memória de curto e/ou longo termo.

25 Em particular, o composto e/ou composição farmacêutica da invenção pode ser utilizado no tratamento de condições clínicas, tais como psicoses, tais como condições psicóticas orgânicas pré-senil, psicoses alcoólicas,

psicoses de fármacos, condições psicóticas orgânicas transientes, doença de Alzheimer, lipidoses cerebral, epilepsia, paresia geral (sífilis), degeneração hepatolenticular, coréia de Huntington, doença de Jakob-
5 Creutzfeldt, esclerose múltipla, doença de Pick do cérebro, sífilis, distúrbios esquizofrênicos, psicoses afetivas, distúrbios neuróticos, distúrbios de personalidade, incluindo caráter neurose, distúrbio de personalidade não psicótica associada com síndromes de cérebro orgânica,
10 distúrbio de personalidade paranóide, personalidade fanática, personalidade paranóica (distúrbio), traços paranóicos, desvio e distúrbios sexual, retardo mental, doença no sistema nervoso e sentidos órgãos, anomalias cognitivas, doença inflamatória do sistema nervoso central,
15 tais como meningite, encefalite, degenerações cerebrais tais como doença de Alzheimer, doença de Pick, degeneração senil do cérebro, comunicação hidrocéfalo, hidrocéfalo obstrutiva, doença de Parkinson incluindo outra doença piramidal extra e distúrbios do movimento anormal, doença espinocerebelar,
20 ataxia cerebelar, de Maria, Sanger-Brown, dissinergia cerebellaris mioclônica, degeneração cerebelar primária, tais como atrofia muscular espinal, familiar, juvenil, atrofia muscular espinhal adulta, doença neuronal motora, esclerose lateral amiotrófica, doença neuronal motora,
25 paralisia bulbar progressiva, paralisia pseudobulbar, esclerose lateral primária, outras doenças celulares do corno anterior, doença celular do corno anterior, não específica, outras doenças da espinha vertebral,

siringomielia e siringobulbia, mielopatias vasculares, infarto agudo da espinha vertebral (embólico) (não embólico), trombose arterial da espinha vertebral, edema da espinha vertebral, mielopatia necrótica sub-aguda, 5 degeneração da espinha vertebral combinada sub-aguda em doenças classificadas em outro lugar, mielopatia, induzida por fármaco, mielite induzida por radiação, distúrbios do sistema nervoso autonômico, distúrbios autonômicos periféricos, simpatéticos, parassimpatéticos, ou sistema 10 vegetativo, disautonomia familiar [síndrome Riley-Day], neuropatia autonômica periférica idiopática, síncope ou síndrome do sinus da carótida, distrofia ou paralisia simpática cervical; neuropatia autonômica periférica em distúrbios classificados em outro lugar, amiloidose, doenças 15 do sistema nervoso periférico, lesões do plexo braqueal, síndrome da costela cervical, síndrome costoclavicular, síndrome anterior escaleno, síndrome da saída torácica, neurite braquial ou radiculite, incluindo em recém nascido, inflamatória e neuropatia tóxica, incluindo polineurite 20 infectiva aguda, síndrome de Guillain-Barre, polineurite pós-infecciosa, polineuropatia em doença vascular de colágeno, distúrbios afetando as múltiplas estruturas do olho, endoftalmite purulenta, doenças do ouvido e processo mastóide, anormalidade de órgãos e tecidos leves em recém 25 nascidos, incluindo no sistema nervoso, complicações da administração de anestésico ou outra sedação em labor e distribuição, doenças na pele incluindo infecção, problema de circulação insuficiente, injúrias, incluindo após

cirurgia, injúria por esmagamento, queimaduras. Injúrias
 para nervos e espinha vertebral, incluindo divisão do nervo,
 lesão na continuidade (com ou sem ferida aberta), neuroma
 traumático (com ou sem ferida aberta), paralise transiente
 5 traumática (com ou sem ferida aberta), punção acidental ou
 laceração durante procedimento medido, injúria do nervo
 óptico e vias, injúria do nervo óptico, nervo craniano
 segundo, injúria de quiasma óptico, injúria da vias ópticas,
 injúria do córtex visual, cegueira não específica, injúria
 10 de outro(s) nervo(s) craniano(s), injúria de outros e nervos
 não especificados. Envenenamento por fármacos, substâncias
 medicinais e biológicas, distúrbios de atrofia muscular
 traumático ou genético; ou para o tratamento de doenças ou
 condições de vários órgãos, tais como condições
 15 degenerativas das gônadas, dos pâncreas, tais como diabetes
 mellitus tipo I e II, do rim, tal como nefrose.

Inflamação do cérebro é sempre consequência de
 infecção, processos auto-imunes, toxinas, e outras
 condições.

20 Infecções virais são relativamente causas
 freqüentes desta condição. Encefalite pode ocorrer como
 manifestação primária ou secundária de INFECÇÕES POR
 TOGAVIRIDAE; INFECÇÕES POR HERPESVIRIDAE; INFECÇÕES POR
 ADENOVIRIDAE; INFECÇÕES POR FLAVIVIRIDAE; INFECÇÕES POR
 25 BUNYAVIRIDAE; INFECÇÕES POR PICORNAVIRIDAE; INFECÇÕES POR
 PARAMYXOVIRIDAE; INFECÇÕES POR ORTHOMYXOVIRIDAE; INFECÇÕES
 OR RETROVIRIDAE; e INFECÇÕES POR ARENAVIRIDAE.

Conseqüentemente, um peptídeo, com posto ou

composição farmacêutica da invenção pode ser utilizada para tratamento de inflamação no cérebro associada com uma infecção viral.

Um grande corpo de dados clínicos e experimentais indicam que a ativação do complemento é um mecanismo importante para injúria neuronal e da glia nas síndromes Guillain-Barré. Inibição da ativação do complemento conseqüentemente pode ser esperado limitar a progressão da doença (Halstead et al (2005) *Annals of Neurology* 58:203-21).

Então, em outra modalidade, uma seqüência peptídeo, um composto e composição farmacêutica podem ser utilizados para tratamento da síndrome Guillain-Barré, duas formas variantes, tal como síndrome Miller Fisher, e outros distúrbios neuromusculares dependente de complemento.

Seqüências de peptídeo, compostos e composição farmacêutica podem também ser utilizados para tratamento de criança com autismo.

Autismo é um distúrbio cerebral que começa cedo na infância e persiste através da maioridade; afeta três áreas cruciais do desenvolvimento: comunicação, interação social, e área criativa ou imaginativa. É estimado afligir entre 2 e 5 de cada 1000 crianças e é quatro vezes mais provavelmente de acometer meninos que meninas. Crianças com autismo têm dificuldades em interação social e comunicação e podem mostrar comportamento repetitivo e ter ligações não usuais a objetos ou rotinas.

Nos anos recentes, têm sido aconselhados de

irregularidades do sistema imune em crianças com autismo.

Então, uma sequência de peptídeo, composto ou uma composição compreendendo os mesmos podem vantajosamente ser utilizados para tratamento de inflamação, em particular
5 inflamação do cérebro.

Um aspecto adicional da invenção é um processo de produção da composição farmacêutica, compreendendo mistura de uma quantidade efetiva de um ou mais dos compostos da invenção, ou uma composição farmacêutica de acordo com a
10 invenção com um ou mais aditivos ou veículos farmacêuticamente aceitáveis, e administrar uma quantidade efetiva de pelo menos um do referido composto, ou referida composição farmacêutica a um paciente.

Em uma modalidade do processo como mencionado
15 acima, os compostos são utilizados em combinação com um dispositivo prostético, em que o dispositivo é um guia nervoso prostético. Então, em um aspecto adicional, a presente invenção relaciona-se a um guia nervoso prostético, caracterizado em que ele compreende um ou mais dos compostos
20 ou composição farmacêutica como definido acima. Guias nervosos são conhecidos na técnica.

Outro aspecto da invenção relaciona-se ao uso de um composto como definido acima.

Em particular, o uso de um composto de acordo com
25 a invenção é para a produção de uma composição farmacêutica. A composição farmacêutica é preferivelmente para o tratamento ou profilaxia de qualquer das doenças e condições mencionadas acima.

Em ainda um aspecto adicional a invenção relaciona-se a um método de tratamento de uma doença ou condição como discutida acima por administração de um composto como aqui definido.

5 Exemplos

1. Efeito de proteínas GDN, artemina e neurturina e fragmentos de peptídeo A1, A2, A3, G1, G2, G3, N1 e N2 derivados dessas proteínas na diferenciação celular neuronal

Peptídeos

10 G1 LNVTDLGLGYETKEE (SEQ ID NO:1) fragmento GDNF

A1 VPVRALGLGHRDEL (SEQ ID NO:2) fragmento

artemina

N1 VRVSELGLGYASDET (SEQ ID NO:3) fragmento

neurturina

15 G2 ETTYDKILKNLSRNR (SEQ ID NO:9) fragmento GDNF

A2 RSPHDLASLLGAG (SEQ ID NO:10) fragmento

artemina

N2 ARVYDLGLRRLRQRR (SEQ ID NO:11) fragmento

neurturina

20 G3 DLSFLDDNLVY (SEQ ID NO:23) fragmento GDNF

A3 VSFMDVNSTWR (SEQ ID NO:24) fragmento

artemina

N3 EVSFLDAHSRY (SEQ ID NO:25) fragmento

neurturina

25 Métodos

As diferentes versões do ensaio de crescimento de neurito foram utilizadas neste estudo, monoculturas e co-culturas.

Em monoculturas, neurônios são crescidos diretamente no plástico e somente o estímulo neuritogênico é um apresentado pela substância adicionada. Em co-culturas, neurônios são crescidos em cima de uma monocamada confluyente
5 de fibroblastos expressando NCAM-140 (LBN110) ou fibroblastos controles negativos NCAM (LVN212). NCAM nos neurônios interagem com NCAM ou células LBN110 assim estimulando o crescimento de neurito dos neurônios. Este sistema então permite o estudo de interações NCAM-NCAM e
10 interações entre NCAM e outras moléculas.

Para todos os experimentos células foram crescidas em meio neurobasal com suplementos como descrito acima em um volume final de 300 μ L/poço em lâminas Lab Tek® Permanox Chamber de 8 poços ou 500 μ L/poço em lâminas Lab Tek®
15 Permanox Chamber de 4 poços.

Para monoculturas, neurônios do hipocampo primário foram plaqueados em lâminas Lab Tek® Permanox Chamber de 8 poços em uma densidade de 10.000 células/poço.

Para co-culturas, células L foram plaqueadas em
20 lâminas Lab Tek® Permanox Chamber de 8 poços em uma densidade de 100.000 células/poço, exceto para experimentos de transfecção onde células foram plaqueadas em lâminas Lab Tek® Permanox Chamber de 4 poços em uma densidade de 200.000 células/poço. Células L foram crescidas por 24 horas em DMEM
25 suplementado com 10% (v/v) de SFB, 1% (v/v) de glutamax, 100 U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina, 2,5 μ g/mL de fungizona, e 567 μ g/mL de neomicina (G418), seguido por duas lavagens em meio neurobasal com suplementos antes dos

neurônios do hipocampo primário serem plaqueados em uma densidade de 7.000 células/poço em lâminas de 8 poços ou 20.000 células/poço em lâminas de 4 poços.

Para avaliar os efeitos dos peptídeos no crescimento do neurito, GDNF e os peptídeos, G1, G2, G3, A1, A2, A3, N1, N2 e N3 foram diluídos para as concentrações apropriadas e adicionados aos neurônios aproximadamente 10 minutos após cultura. Meio sozinho foi adicionado aos controles, e células foram incubadas por 24 horas.

Para avaliar o envolvimento de diferentes vias de transdução de sinal intracelular inibidores farmacológicos, em particular o inibidor de FGFR SU5402 e inibidor da Fyn-quinase PP2, foram diluídos às concentrações apropriadas e adicionados aos neurônios imediatamente após plaqueio. Após 10 minutos GDNF, GDNFp1 ou meio (controles) foi adicionado e células foram incubadas por 24 horas.

Adicionalmente, neurônios foram transientemente transfectados com uma versão negativa dominante do FGFR (dnFGFR). Como uma alternativa para o uso de um inibidor farmacológico FGFR. O plasmídeo dnFGFR codifica um FGFR que não possui o domínio quinase. Este receptor mutante inibe a função do FGFR selvagem por unir em dímeros que faltam à atividade quinase. A transfecção com um vetor vazio serviu como controle. Transfecção foi também feita com wtFGFR a fim de acessar o efeito da super-expressão do FGFR.

Para investigar o papel do NCAM-180 e NCAM-140, respectivamente, transfecções foram realizadas com plasmídeos codificando ou o domínio citoplasmático de NCAM-

180 ou NCAM-140. Os domínios citoplasmáticos superexpressos competem com os domínios citoplasmáticos das moléculas NCAM endógenas por alvos citoplasmáticos, provavelmente funcionando como inibidores da sinalização de NCAM-180 ou NCAM-140. Transfecção com um vetor vazio serviu como controle.

Transfecções foram feitas com um dispositivo Nucleofector® e um kit Rat Neuron Nucleofector® (Amaya Inc., Gaithersburg, MD, EUA). Este método de transfecção é baseado na eletroporação em combinação com uma solução Nucleofector® contendo agentes lipofílicos. Esses agentes formam lipossomos contendo o plasmídeo DNA, que então entra nas células durante a eletroporação. O método permite a transfecção de células não divididas tais como neurônios. 3 µg do plasmídeo de interesse foram misturados com a solução Nucleofector® e neurônios do hipocampo primário foram ressuspensos na mistura, eletroporado no dispositivo Nucleofector®, e transferido para o meio neurobasal com suplementos e 5% (v/v) de SFB. Células foram então incubadas por 2 horas após os quais eles foram ressuspensos em meio sem soro, contadas, plaqueadas e incubados por 6 horas antes do GDNF ou GDNFp1 ser adicionado. Meio sozinho foi adicionado ao controle e células foram incubadas por 18 horas.

Todas as transfecções transientes neste estudo incluíram co-transfecção com um plasmídeo codificando EGFP, que permite a identificação de células transfectadas. Para garantir que todas as células expressando EGFP também são

transfectadas com o plasmídeo de interesse, uma proporção de 1:5 entre o plasmídeo codificando EGFP e o plasmídeo de interesse foi utilizado (isto é, 0,5 µg de plasmídeo codificando EGFP foi utilizado para cada transfecção).

5 Experimentos de crescimento de neurito foram terminados após o tempo fixo por fixação das células. Para visualizar neurônios e seus neuritos, imunocoloração de GAP-43 foi feita. Esta coloração é específica para neurônios. Células transfectadas e seus neuritos devem ser visíveis sem
10 imunocoloração devido a fluorescência emitida por GFP; Neste estudo entretanto, foi encontrado que a intensidade da fluorescência própria do GFP foi muito fraco para prover a qualidade da imagem requerida para a própria identificação ou células transfectadas e análises de comprimentos de
15 neuritos. GFP é uma proteína citoplasmática, e desde que neuritos finos somente contêm um volume pequeno de citoplasma, GFP é somente encontrado em pequenas quantidades na maioria dos neuritos. Assim, um protocolo de coloração dupla, onde células foram imunocoradas contra GFP e GAP-43,
20 foi adotado. Este protocolo permitiu a identificação de células transfectadas na base da coloração GFP em combinação com visualização de neuritos baseada na coloração GAP-43.

Sem remoção prévia o meio de 300 µL/poço (lâminas de 8 poços) ou 500 µL/poço (lâminas de 4 poços) de uma
25 solução de PBS contendo 0,4 mM de CaCl₂, 0,05 M de sacarose e 8% (v/v) de formaldeído foi adicionado para as culturas por 20 minutos. Células foram então lavadas por 10 minutos em PBS seguido por lavagem em PBS com 1% (p/v) em BSA por 20

minutos, após os quais as células foram incubadas com anticorpos primários por uma noite a 4°C.

Anticorpos de coelho anti-rato GAP-43 foram diluídos 1:1000 para corar células não tranfectadas e 1:2000 para corar células transfectadas. Anticorpos anti-GFP de camundongo foram diluídos 1:1000. Anticorpos foram diluídos em uma solução de PBS contendo 7% (v/v) de SFB para bloquear a ligação não específica, 50 mM de glicina para bloquear o formaldeído utilizando para fixação, 0,2% (v/v) de saponina para permeabilizar células, e 0,02% (v/v) de NaN₃ para preservar anticorpos para uso tardio.

No próximo dia células foram lavadas por 10 minutos em PBS seguido por lavagem em PBS com 1% (p/v) de BSA por 20 minutos. Células foram então incubadas com anticorpos secundários diluídos em PBS com 1% (p/v) BSA por uma hora em temperatura ambiente. Anticorpos cabra anti-coelho IgG conjugados a Alexa 488 foram diluídos 1:1000 para células não transfectadas e 1:2000 para células transfectadas. Anticorpos cabra anti-camundongo IgG conjugados a Alexa 546 foram diluídos 1:1000. Finalmente células foram lavadas 3x7 minutos em PBS e montadas com meio de aumentada fluorescência.

Microscópio fluorescente assistido por computador foi feito utilizando um microscópio invertido diafoto Nikon (Nikon, Tóquio, Japão) com uma objetiva Nikon Plan 20x acoplada a uma câmera de vídeo (Grungid Electronics Germany). Para cada condição em todos os experimentos de imagens de aproximadamente 200 células (células não

transfectadas) ou 100 células (células transfectadas) foram obtidas em séries sistemáticas de campos de visão, em que a posição da primeira imagem foi escolhida aleatoriamente como descrito por Ronn et al (2000c). Este dá a todas as células uma chance igual de ser escolhida. Para cada campo de visão de células transfectadas coradas por GFP foi gravada primeiro (luz verde) antes de mudar a luz para azul e gravar a coloração GAP-43. Luz foi então mudada para preto antes de mover para o próximo campo de visão.

Crescimento de neurito foi analisado por contagem do número de interseções entre neuritos e linhagens teste em uma estrutura de contagem imparcial utilizando um programa pacote "ProcessLength" desenvolvido no Laboratório de Proteína (Ronn et al, 2000). Crescimento do neurito pode então ser quantificado como o número de interseções por células, que se relaciona ao comprimento absoluto de neuritos (L) por células pela fórmula: $L = (\pi d I) / 2$ (I= o número de interseções por células, d= a distancia vertical entre duas linhas paralelas na estrutura).

Resultados

Uma parte importante de diferenciação neuronal é o crescimento de axons e dendritos, coletivamente conhecido como neuritos. O ensaio de crescimento de neurito é então um ensaio de diferenciação neuronal, e é sempre utilizado para teste do potencial neuritogênico de uma dada substância. Em essência, neurônios são crescidos por certo período de tempo em presença da molécula de interesse, após o que o crescimento de neuritos é quantificado. Além disso, pela

aplicação de diferentes inibidores, o mecanismo de transdução de sinal sustentando a resposta neuritogênica vista pode ser investigada.

5 2. Efeitos de peptídeos derivados de GDNF, Artemina, Neurturina na sobrevivência neuronal.

Cultura celular primária

Neurônios Dopaminérgicos

Neurônios dopaminérgicos foram preparados de
10 embriões de ratos Wistar no dia 15 embrionário (Charles River, Sulzfeld, Germany or Mollegaard, Denmark). Uma rata grávida foi sacrificada e o útero foi tomado e mantido no gelo em solução de sal balanceada de Hanks (HBSS; Gibco, BRL). A parte ventral do mesencéfalo foi dissecada dos
15 cérebros embriônicos, homogeneizados no gelo na solução de sal balanceada de Gey (GBSS; Gibco, BRL) suplementado com 5 g de glicose/ L (Sigma-Aldrich) e depois tripsinizado. As células dissociadas foram lavadas em presença de DNase 1 e inibidor de tripsina de soja (Sigma-Aldrich).

20 *Neurônios Granulares Cerebelares*

Neurônios granulares cerebelares (CGN) foram preparados ratos Wistar sete dias após o nascimento largely como previamente descrito por Schousboe et al (1989). Tecido cerebelar foi dissecado em solução Krebs-Ringer modificado
25 mantido no gelo, e tratada como descrito para os neurônios do hipocampo acima. Todas as culturas foram incubadas a 37°C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. Todos os animais foram manuseados de acordo com as normas nacionais

para o bem estar animal.

Ensaio de Sobrevivência

Neurônios Dopaminérgicos

Neurônios dopaminérgicos foram plaqueados em uma
5 densidade de 150.000 células/cm² em placas de cultura de
célula de 24 poços revestida com poli-D-lisina como descrito
acima. Os neurônios foram deixados para diferenciar por seis
dias sem ou com várias concentrações de peptídeo, após os
quais 6-OHDA foi adicionado em uma concentração de 100 µM
10 por duas horas. Uma solução estoque foi preparada por
dissolução de 6-OHDA a uma concentração de 10 mM em 0,1%
(p/v) de metabissulfito de sódio a fim de prevenir a
oxidação. Após duas horas com 6-OHDA, o meio foi trocado
para meio Neurobasal com suplementos e peptídeo, e as
15 culturas celulares foram ainda incubados por 24 horas,
fixados e imunocorados por tirosina hidroxilase, 98 imagens
para cada condição experimental em cada experimento
individual foram automaticamente gravada por vídeo.

Neurônios Granulares Cerebelares

20 Culturas primárias de CGN foram plaqueadas em uma
densidade de 100.000 células/cm² em lâminas permanox de 8
poços revestido com poli-L-lisina em meio Neurobasal-A
(Gibco, BRL) suplementado com 2% (v/v) B27, 0,5% (v/v) de
glutamax, 100 /mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina
25 e KCl, fazendo a concentração final de KCl no meio 40 mM. 24
horas após o plaqueio, citosina-β-D-arabinofuranosida (Ara-
C; Sigma-Aldrich) foi adicionada a uma concentração final de
10 µM para evitar proliferação de células da glia, após os

quais os neurônios foram permitidos diferenciar por seis dias adicionais a 37°C. Morte celular apoptótica foi induzida por lavar duas vezes e mudar o meio para Meio Basal Eagle (BME; Gibco BRL) suplementado com 1% (v/v) glutamina, 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina, 3,5 D-glicose/L e 1% (v/v) piruvato de sódio (Gibco BRL) junto com várias concentrações de peptídeo. Assim a concentração de potássio nas culturas foi reduzida a 5 mM de KCl (D'Mello et al, 1993). Dois dias após a indução de apoptose, as células foram fixadas com 4% (v/v) de formaldeído e coradas com Hoechst 33258 por 25 minutos como descrito por Kruman et al (1997). Imagens de 1000-1500 neurônios foram aleatoriamente gravados para cada grupo em cada experimento utilizando microscópio de fluorescência assistido por computador como descrito para o ensaio de crescimento de neurito do hipocampo. Núcleos de neurônios mortos e vivos foram contados utilizando o programa pacote Prima desenvolvido no Laboratório Proteína, e a fração dos neurônios vivos relativos ao número total de neurônios foram estimadas.

Resultados

Resultados são revelados e resumidos na figura 25 e figuras 29 a 33.

3. Ligação de peptídeos derivados de GDNF, artemina e neurturina para GFR e NCAM.

Análise de Ressonância Plasmon de Superfície (SPR)

Análises de ligação foram feitas empregando um Instrumento BIAcoreX (Biosensor AB, Uppsala, Suécia) a 25°C utilizando 10 mM pH 7.4 de fosfato de sódio contendo 150 mM

de NaCl como tampão de corrida (salina tamponada com fosfato, PBS). A taxa de fluxo foi 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Dados foram analisados por ajuste de curva não linear utilizando o programa do fabricante. O receptor de proteínas, por exemplo, NCAM Ig1-Ig2 e proteínas GFR, foram imobilizadas em um chip sensor CM5 utilizando um kit acoplador amina (Biosensor AB) como segue: o chip foi ativado por 20 μL de solução de ativação; a proteína foi imobilizada utilizando 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteína em 10 mM de tampão fosfato de sódio pH 6.0; o chip foi bloqueado por 35 μL de solução bloqueadora. A curva correspondendo à diferença entre a ligação ao receptor e um chip branco foi utilizado para análises.

Resultados

Resultados são revelados e resumidos nas figuras 26 a 28 e figuras 34 a 38.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Copenhagen University

<120> "Peptídeos derivados de GDNF"

<130> P1059PC00

<160> 25

<170> PantenIn versão 3.3

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Leu Asn Val Thr Asp Leu Gly Leu Gly Tyr Glu Thr Lys Glu Glu

1

5

10

15

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Val Pro Val Arg Ala Leu Gly Leu Gly His Arg Ser Asp Glu Leu

1

5

10

15

<210> 3

<212> 23

<222> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Val Arg Val Ser Glu Leu Gly Leu Gly Tyr Ala Ser Asp Glu Thr

1 5 10 15

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Leu Ser Val Ala Glu Leu Gly Leu Gly Tyr Ala Ser Glu Glu Lys

1 5 10 15

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Ile Asp Phe Arg Lys Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Ile Asp Phe Lys Arg Asp Leu Gly Trp Lys Trp Ile His Glu Pro Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Ile Asp Phe Arg Gln Asp Leu Gly Trp Lys Trp Val His Glu Pro Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 8

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Ile Asp Leu Gln Gly Met Lys Trp Ala Lys Asn Trp Val Leu Glu Pro

1 5 10 15

Pro Gly

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Glu Thr Thr Tyr Asp Lys Ile Leu Lys Asn Leu Ser Arg Asn Arg

1 5 10 15

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Arg Ser Pro His Asp Leu Ser Leu Ala Ser Leu Leu Gly Ala Gly

1 5 10 15

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Ala Arg Val Tyr Asp Leu Gly Leu Arg Arg Leu Arg Gln Arg Arg

1 5 10 15

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Arg Thr Gln His Gly Leu Ala Leu Ala Arg Leu Gln Gly Gln Gly

1 5 10 15

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Trp Ser Leu Asp Thr Gln Tyr Ser Lys Val Leu Ala Leu Tyr Asn

1 5 10 15

<210> 14

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Trp Ser Ser Asp Thr Gln His Ser Arg Val Leu Ser Leu Tyr Asn
 1 5 10 15

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Arg Ser Ala Asp Thr Thr His Ser Thr Val Leu Gly Leu Tyr Asn
 1 5 10 15

<210> 16

<211> 12

<212> LRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Asp Asp Leu Ser Phe Leu Asp Asp Asn Leu Val Tyr
 1 5 10

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Glu Ala Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp
 1 5 10

<210> 18

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Asp Glu Val Ser Phe Leu Asp Ala His Ser Arg Tyr

1 5 10

<210> 19

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Asp Val Ala Phe Leu Asp Asp Arg His Arg Trp Gln

1 5 10

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Glu Pro Leu Pro Ile Val Tyr Tyr Val Gly Arg Lys

1 5 10

<210> 21

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Ile Gly Lys Thr

1 5 10

<210> 22

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Glu Pro Leu Thr Ile Leu Tyr Tyr Val Gly Arg Thr
 1 5 10

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Asp Leu Ser Phe Leu Asp Asp Asn Leu Val Tyr
 1 5 10

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

Val Ser Phe Met Asp Val Asn Ser Thr Trp Arg
 1 5 10

<210> 25

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Glu Val Ser Phe Leu Asp Ala His Ser Arg Tyr
 1 5 10

REIVINDICAÇÕES

1. Peptídeo **CARACTERIZADO** pelo fato de ter uma sequência de 6 a 22 resíduos aminoácidos contíguos compreendendo um motivo de fórmula:

5 Xa-(X)-Xb-Xc-Xd-Xf

em que

Xa é resíduo aminoácido D, E, A ou G,

(x) é uma sequência de 2-3 resíduos aminoácidos ou um resíduo aminoácido único selecionado do grupo consistindo de resíduos aminoácidos A, D, E, G, I, K, L, P, Q. S. T e V,

Xb é resíduo aminoácido Y ou H, ou um resíduo aminoácido hidrofóbico, e pelo menos um de Xc, Xd ou Xf é um resíduo aminoácido carregado ou hidrofóbico.

2. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que (x) é uma sequência de dois resíduos aminoácidos.

3. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a sequência é L-G, K-I, L-S, G-L, T-Q ou T-T.

20 4. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que (x) é uma sequência de três resíduos aminoácidos de fórmula L-x-G, em que x é qualquer resíduo aminoácido.

5. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a sequência L-Q-G.

6. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que (x) é um resíduo aminoácido

único selecionado de resíduos aminoácidos carregados ou hidrofóbicos.

7. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que (x) é um resíduo aminoácido carregado.

8. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que (x) é D ou E.

9. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 6, **CARACTERIZADO** pelo fato de que (x) é um resíduo aminoácido hidrofóbico.

10. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 9, **CARACTERIZADO** pelo fato de que (x) é A, P ou V.

11. Peptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes 1-10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que Xa é D ou E.

12. Peptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes 1-10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que Xa é G.

13. Peptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes 1-10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que Xa é A.

14. Peptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes 1-13, **CARACTERIZADO** pelo fato de que Xb é A, L, V ou W.

15. Sequência de peptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes 1-13, **CARACTERIZADO** pelo fato de que Xb é Y.

16. Peptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes 1-13, **CARACTERIZADO** pelo fato de que Xb é H.

17. Peptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes 1-16, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos um de Xc, Xd ou Xf é um resíduo aminoácido carregado.

18. Peptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes 1-16, **CARACTERIZADO** pelo fato de que pelo menos um de Xc, Xd ou Xf é um resíduo aminoácido hidrofóbico

19. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o referido peptídeo compreende uma sequência aminoácida de fórmula

15 $X^1-X^2-X^3-X^4-X^5-X^6-X^7-X^8-X^9-X^{10}$

em que

X¹ é um resíduo aminoácido selecionado de D, A, E ou H,

20 X² é um resíduo aminoácido selecionado de L, G, T, D, A, E, V ou P,

X³ é um resíduo aminoácido selecionado de G, Q, I, S, G, L, T, V ou A,

X⁴ é um resíduo aminoácido selecionado de L, W, G, A, Y, H, S, F, P ou T,

25 X⁵ um resíduo aminoácido selecionado de G, K, M, A, R, L, S, F ou I,

X⁶ um resíduo aminoácido selecionado de Y, H, W, K, N, S, R, A, M, L, D ou V,

X⁷ é um resíduo aminoácido selecionado de E, R, A, I, V, W, L, D ou Y,

X⁸ é um resíduo aminoácido selecionado de T, S, H, L, R, D, V, A ou Y,

5. X⁹ é um resíduo aminoácido selecionado de K, D, E, R, G, Q, A, S, N, H, V ou I,

X¹⁰ é um resíduo aminoácido selecionado de E, P, N, A, R, G, L ou S,

em que a referida seqüência aminoácida está compreendida no motivo conforme descrito na reivindicação 1.

20. Peptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-18 ou 19, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o referido peptídeo compreende uma seqüência aminoácida selecionada das seqüências expostas nas SEQ ID NOs: 1-22, ou um
15 fragmento, variante ou homólogo da referida seqüência.

21. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 20, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o peptídeo está compreendido em uma seqüência selecionada de

LNVTDLGLGYETKEE (SEQ ID NO:1)

20 VPVRALGLGHRDEL (SEQ ID NO:2)

VRVSELGLGYASDET (SEQ ID NO:3) ou

LSVAELGLGYASEEK (SEQ ID NO:4)

22. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 20, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o peptídeo está compreendido
25 em uma seqüência selecionado de

IDFRKDLGWKWIHEPKG (SEQ ID NO:5)

IDFKRDLGWKWIHEPKG (SEQ ID NO:6)

IDFRQDLGWKQVHEPKG (SEQ ID NO:7) ou

IDLQGMKWAKNWWLEPPG (SEQ ID NO:8).

23. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 20, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o peptídeo está compreendido em uma sequência selecionada de

5 ETTYDKILKNLSRNR (SEQ ID NO:9)
 RSPHDLASLLGAG (SEQ ID NO:10)
 ARVYDLGLRRLRQRR (SEQ ID NO:11) ou
 RTQHGLALARLQGQ (SEQ ID NO:12).

24. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 20, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o peptídeo está compreendido em uma sequência selecionada de

 WSLDTQYSKVLALYN (SEQ ID NO:13)
 WSSDTQHSRVLSLYN (SEQ IS NO:14) ou
 RSADTTHSTVLGLYN (SEQ ID NO:15).

25. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 20, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o peptídeo está compreendido em uma sequência selecionada de

 DDLFLDDNLVY (SEQ ID NO:16)
 EAVSFMDVNSTW (SEQ ID NO:17)
 20 DEVSFLDAHSRY (SEQ ID NO:18) ou
 DVAFLDDRHRWQ (SEQ ID NO:19).

26. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 20, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o peptídeo está compreendido em uma sequência selecionada de

25 EPLPIVYYVGRK (SEQ ID NO:20)
 EPLTILYYIGKT (SEQ ID NO:21) ou
 EPLTILYYVGRT (SEQ ID NO:22),

27. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 20, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o referido peptídeo é derivado do fator neurotrófico derivado da glia (GDNF).

28. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 27, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o peptídeo compreende uma sequência selecionada das sequências de SEQ ID NOs: 1, 9 ou 18.

29. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 20, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o referido peptídeo é derivado de artemina.

30. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 29, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o peptídeo compreende uma sequência selecionada das sequências de SEQ ID NOs: 2, 10 ou 17,

31. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 20, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o referido peptídeo é derivado de neurturina.

32. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 32, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o peptídeo compreende uma sequência selecionada das sequências de SEQ ID NOs: 3, 11 ou 18.

33. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 20, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o referido peptídeo é derivado de persefina.

34. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 32, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o peptídeo compreende uma sequência selecionada das sequências de SEQ ID NOs: 4, 12 ou 19.

35. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 20, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o referido peptídeo é derivado do fator transformador de crescimento beta-1 (TGF beta -1), fator transformador de crescimento beta-2 (TGF beta -2),
 5 fator transformador de crescimento beta-3 (TGF beta -3) ou fator transformador de crescimento beta-4 (TGF beta -4).

36. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 35, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o peptídeo compreende uma sequência selecionada das sequências de SEQ ID NOs: 5-8, 13-15
 10 ou 20-22.

37. Peptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o referido peptídeo é capaz de estimular a diferenciação de uma célula precursora neural, estimular o crescimento do
 15 neurito, estimular a sobrevivência celular neuronal, estimular a plasticidade neural associada com memória e aprendizagem, e/ou inibir uma resposta inflamatória.

38. Um peptídeo **CARACTERIZADO** pelo fato de consistir de qualquer das seguintes sequências

20 LNVTDLGLGYETKEE (SEQ ID NO:1)
 VPVRALGLGHRSDDEL (SEQ ID NO:2)
 VRVSELGLGYASDET (SEQ ID NO:3)
 LSVaelGLGYASEEK (SEQ ID NO:4)
 IDFRKDLGWKWIHEPKG (SEQ ID NO:5)
 25 IDFKRDLGWKWIHEPKG (SEQ ID NO:6)
 IDFRQDLGWKWVHEPKG (SEQ ID NO:7)
 IDLQGMKWAKNWWLEPPG (SEQ ID NO:8).
 ETTYDKILKNLSRNR (SEQ ID NO:9)

RSPHDLSLASLLGAG (SEQ ID NO:10)

ARVYDLGLRRLRQRR (SEQ ID NO:11)

RTQHGLALARLQGQG (SEQ ID NO:12).

WSLDTQYSKVLALYN (SEQ ID NO:13)

5 WSSDTQHRSRVLSLYN (SEQ IS NO:14)

RSADTTHSTVLGLYN (SEQ ID NO:15).

DDLSFLDDNLVY (SEQ ID NO:16)

EAVSFMDVNSTW (SEQ ID NO:17)

DEVSFLDAHSRY (SEQ ID NO:18)

10 DVAFLDDRHRWQ (SEQ ID NO:19).

EPLPIVYYVGRK (SEQ ID NO:20)

EPLTILYYIGKT (SEQ ID NO:21) ou

EPLTILYYVGRT (SEQ ID NO:22),

ou um fragmento, variante, ou homólogo do mesmo.

15 39. Peptídeo, de acordo com a reivindicação 38,

CARACTERIZADO pelo fato de que o fragmento é selecionado de

DLSFLDDNLVY (SEQ ID NO:23)

VSFMDVNSTWR (SEQ ID NO:24), ou

EVSFLDAHSRY (SEQ ID NO:25).

20 40. Composto **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender um peptídeo de qualquer uma das reivindicações precedentes1-39.

41. Composto, de acordo com a reivindicação 40,

25 **CARACTERIZADO** pelo fato de que o peptídeo é formulado como monômero consistindo de cópia única de uma sequência de peptídeo individual.

42. Composto, de acordo com a reivindicação 41,

CARACTERIZADO pelo fato de que o peptídeo é formulado como

um multímero consistindo de duas ou mais cópias de uma sequência peptídeo individual, tais como um dímero ou tetrâmero de uma sequência peptídeo individual.

43. Composto, de acordo com a reivindicação 42,
5 **CARACTERIZADO** pelo fato de que o multímero é um dendrímero.

44. Uso de um peptídeo, de acordo com qualquer das reivindicações 1-39 ou um composto de acordo com as reivindicações 40-43, **CARACTERIZADO** pelo fato de fabricar um medicamento.

10 45. Composição farmacêutica **CARACTERIZADA** pelo fato de compreender um peptídeo conforme descrito em qualquer das reivindicações 1-39 e/ou composto conforme descrito conforme as reivindicações 40-43.

15 46. Método de estimulação do crescimento do neurito, sobrevivência celular neural, diferenciação celular do precursor neural e/ou inibição da inflamação **CARACTERIZADO** pelo fato de utilizar um peptídeo conforme qualquer das reivindicações 1-39, composto conforme as reivindicações 40-43, ou composições farmacêutica conforme a reivindicação 45.

20 47. Uso de um peptídeo, de acordo com as reivindicações 1-39, composto de acordo com as reivindicações 40-43, ou composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 45 **CARACTERIZADO** pelo fato de ser para crescimento do neurito, sobrevivência celular neural, diferenciação celular de precursor neural e/ou inibição da inflamação.
25

48. Uso de um peptídeo, de acordo com as reivindicações 1-39, composto de acordo com as reivindicações 40-43, ou composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 45

CARACTERIZADO pelo fato de tratar uma condição ou doença, em que o crescimento do neurito, sobrevivência celular neural, diferenciação celular de precursor neural e/ou inibição da inflamação é útil para tratamento.

5 49. Uso, de acordo com a reivindicação 48, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a condição ou doença é uma condição ou doença do sistema nervoso central e periférico.

10 50. Uso, de acordo com a reivindicação 49, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a condição ou doença é selecionada de dano nervoso pós-operatório, dano do nervo traumático, defeito da mielinização das fibras nervosas, danos pós-isquêmicos, tais como após derrame, degeneração nervosa associada com diabetes mellitus, distúrbios afetando o relógio circadiano ou transmissão neuromuscular.

15 51. Uso, de acordo com a reivindicação 48, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a condição ou doença selecionada de condições ou doenças dos músculos incluindo condições com função defeituosa de conexões neuromusculares, tais como após transplante de órgão, ou tais como os distúrbios musculares genéticos ou atroficos traumáticos.

20 52. Uso, de acordo com a reivindicação 48, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a condição ou doença é câncer.

25 53. Uso, de acordo com a reivindicação 52, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o câncer é qualquer câncer envolvendo neoangiogênese.

54. Uso, de acordo com a reivindicação 52, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o câncer é um câncer do sistema neural.

55. Uso, de acordo com a reivindicação 49, **5 CARACTERIZADO** pelo fato de que a condição ou doença é uma habilidade defeituosa de aprendizado e/ou memória defeituosa.

56. Uso, de acordo com a reivindicação 55, **10 CARACTERIZADO** pelo fato de que a condição ou doença é doença de Parkinson, doença de Alzheimer, doença de Huntington ou demência tal como demência multi-infarto.

57. Uso, de acordo com a reivindicação 49, **15 CARACTERIZADO** pelo fato de que a condição ou doença é uma doença mental, tais como uma distúrbio do pensamento e/ou humor, distúrbios neuropsiquiátricos incluindo distúrbios bipolar (BPD), geneticamente relacionados a distúrbios afetivos unipolares, distúrbios ilusórios, parafrenia, psicose paranóica, esquizofrenia, distúrbio esquizotipo, distúrbio esquizoafetivo, distúrbios afetivos unipolares relacionados **20** geneticamente e esquizoafetivo bipolar, psicose psicogênica, catatonia, distúrbios afetivos unipolares relacionados geneticamente e bipolar periódico, psicose ciclóide, distúrbio de personalidade esquizóide, distúrbio de personalidade paranóide, distúrbios afetivos unipolares relacionados geneticamente e bipolar relacionados a distúrbios afetivos e sub- **25** tipos de distúrbio afetivo unipolar.

58. Uso, de acordo com a reivindicação 48, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a condição ou doença são os danos corporais devido ao consumo de álcool.

59. Uso, de acordo com a reivindicação 48, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a condição ou doença é uma doença prion.

60. Uso, de acordo com a reivindicação 47, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a condição ou doença é caracterizada pela presença de uma resposta inflamatória sustentada.

61. Uso, de acordo com a reivindicação 60, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a condição ou doença é inflamação do cérebro ou doença autoimune.

62. Uso, de acordo com a reivindicação 60, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a condição ou doença é síndrome de Guillain-Barré, sua forma variante, tal como síndrome de Miller Fisher, ou outro complemento dependente de distúrbio neuromuscular.

63. Uso, de acordo com a reivindicação 60, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a condição ou doença é autismo.

64. Uso, de acordo com a reivindicação 61, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a condição ou doença é uma infecção viral ou bacteriana.

65. Uso, de acordo com a reivindicação 60, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a condição ou doença é uma doença autoimune periférica ou condição inflamatória.

66. Condição ou doença **CARACTERIZADA** pelo fato de ser diabetes do tipo 1, artrite reumatóide, psoríase, distúrbios da pele, alergias variadas, glomerulonefrites, conforme descrito na reivindicação 65

5 67. Uso de um peptídeo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-39, ou um composto de acordo com as reivindicações 40-43, **CARACTERIZADO** por ser para a produção de um anticorpo.

10 68. Anticorpo capaz de reconhecer e ligar a um epítipo, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender o motivo aminoácido conforme descrito na reivindicação 1 e/ou peptídeo conforme descrito em qualquer das reivindicações 1-40.

15 69. Método de tratamento, **CARACTERIZADO** pelo fato de compreender a administração a um indivíduo em necessidade de uma quantidade efetiva de um peptídeo conforme descrito nas reivindicações 1-40, composto conforme descrito nas reivindicações 40-43, composição farmacêutica conforme descrita na reivindicação 45 e/ou um anticorpo conforme descrito na reivindicação 61.

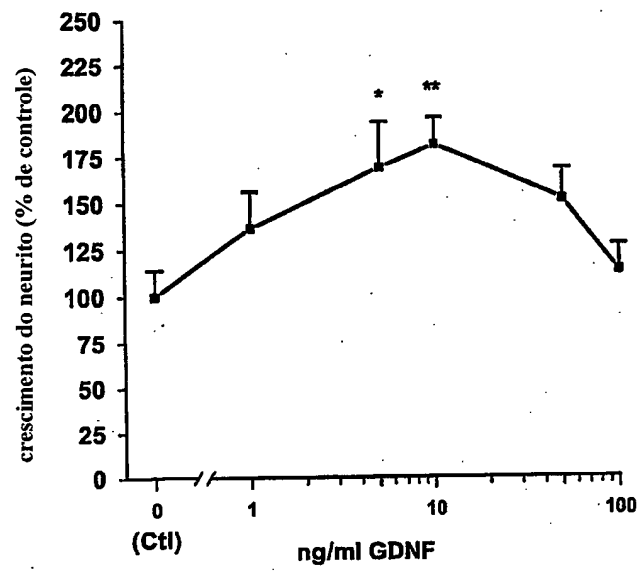


Figura 1

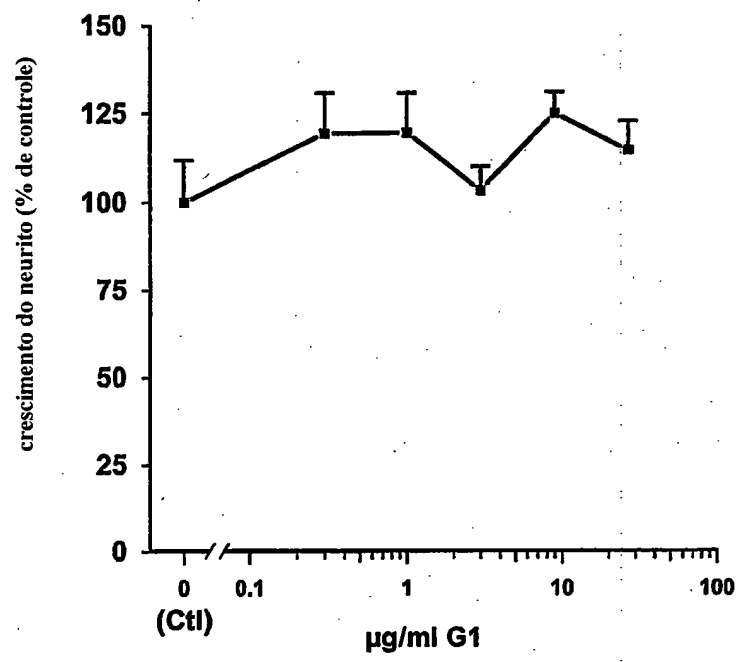
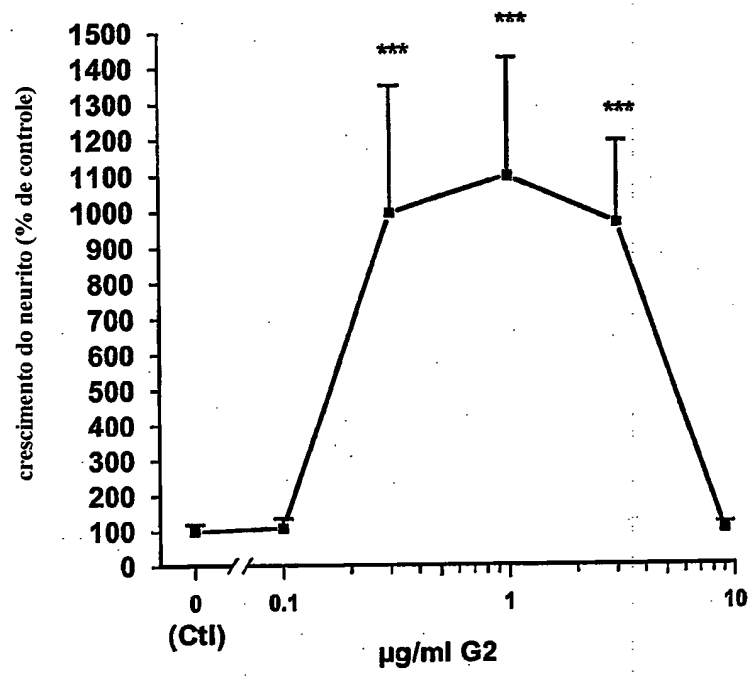


Figura 2

**Figura 3**

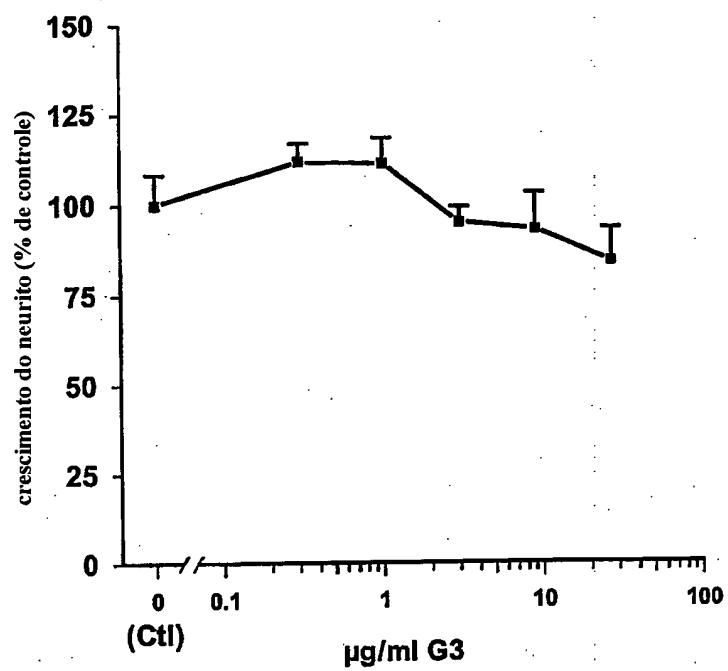


Figura 4

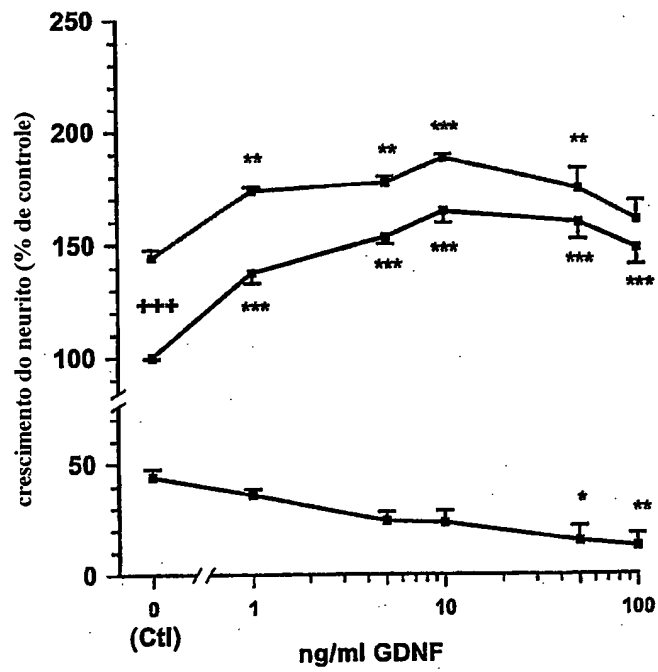
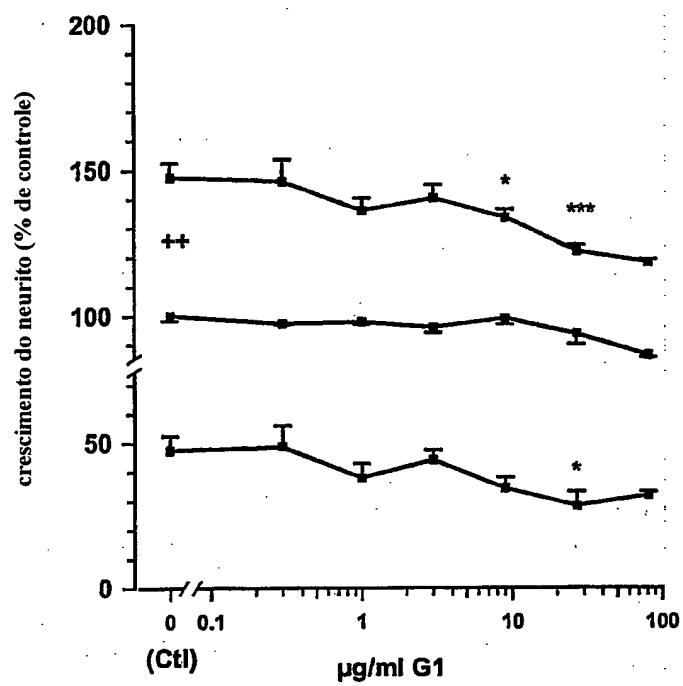
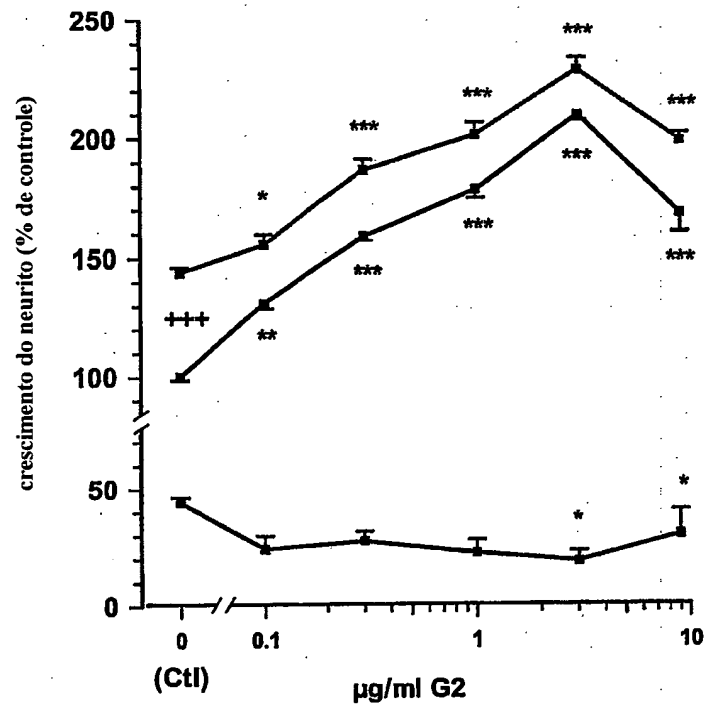
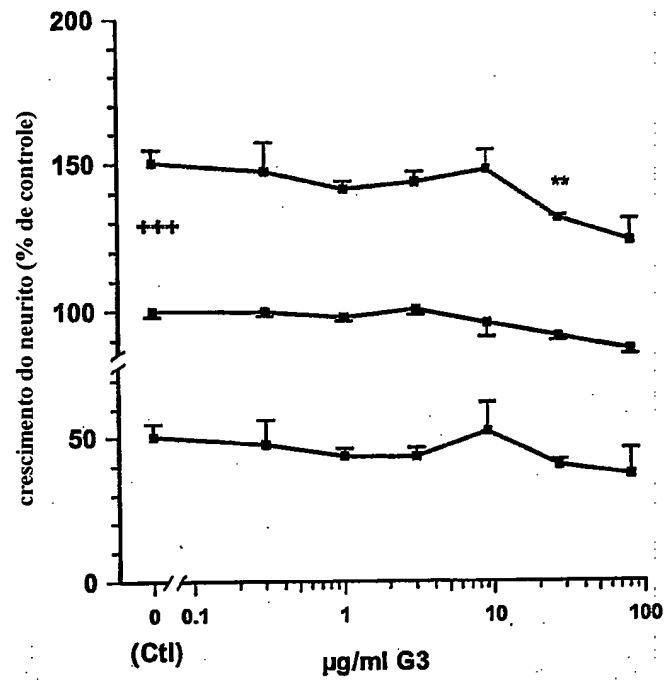
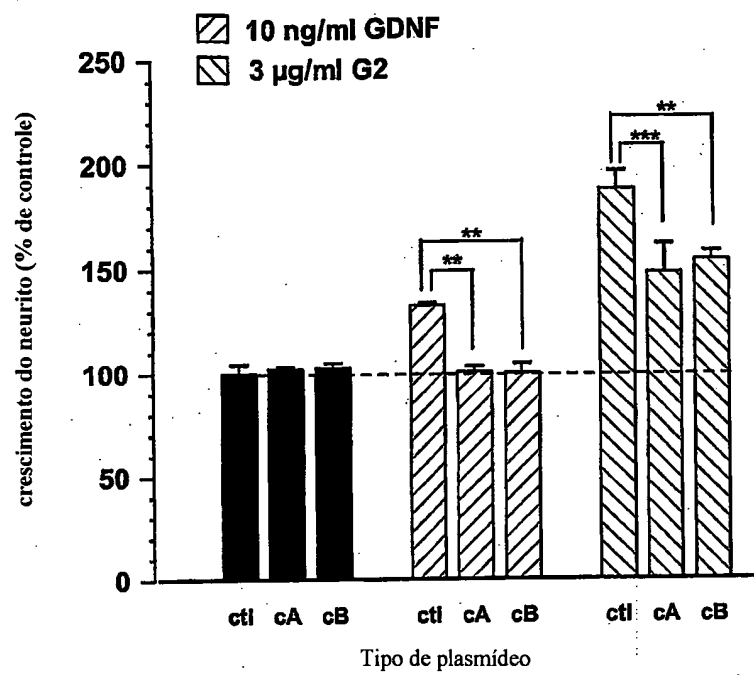


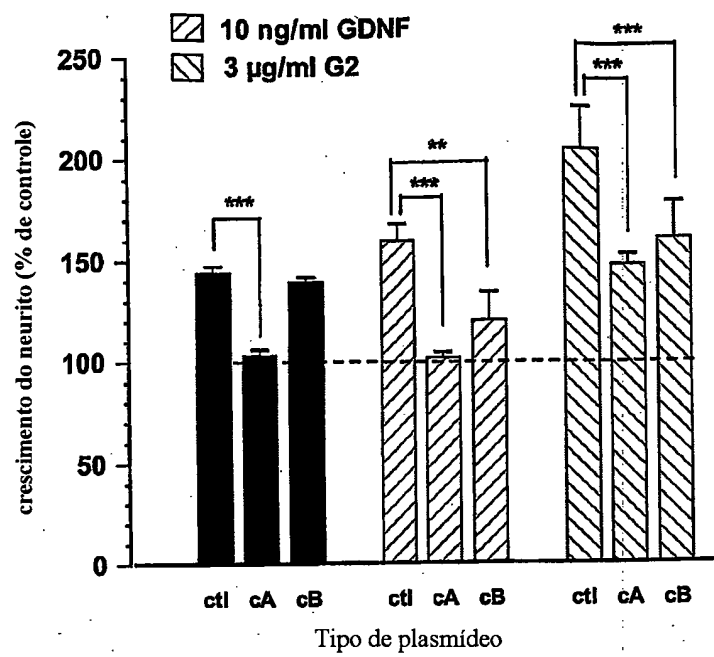
Figura 5

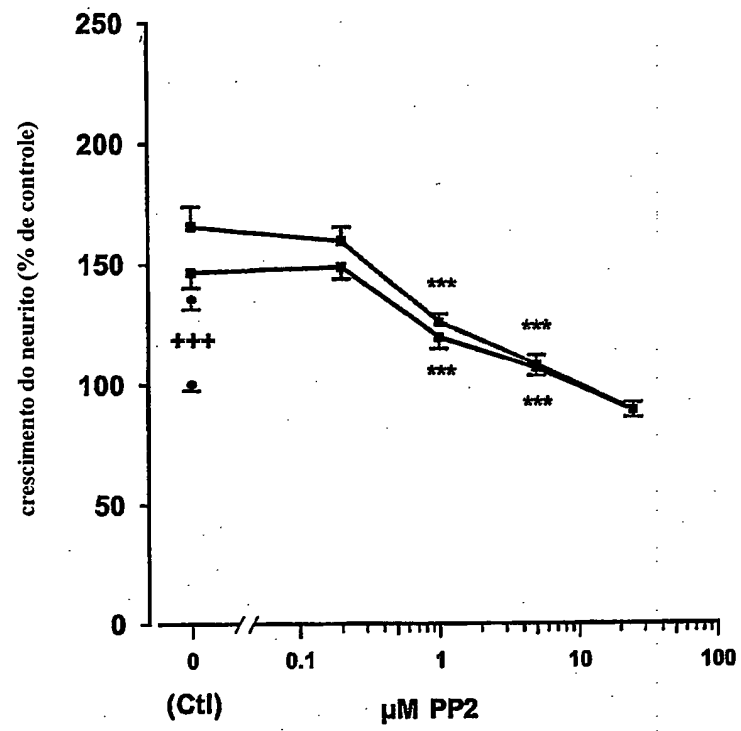
**Figura 6**

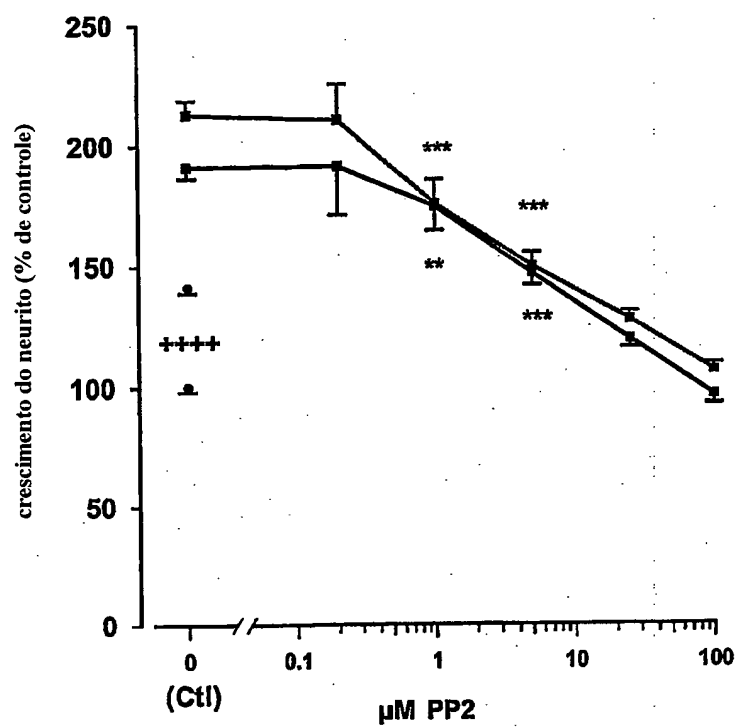
**Figura 7**

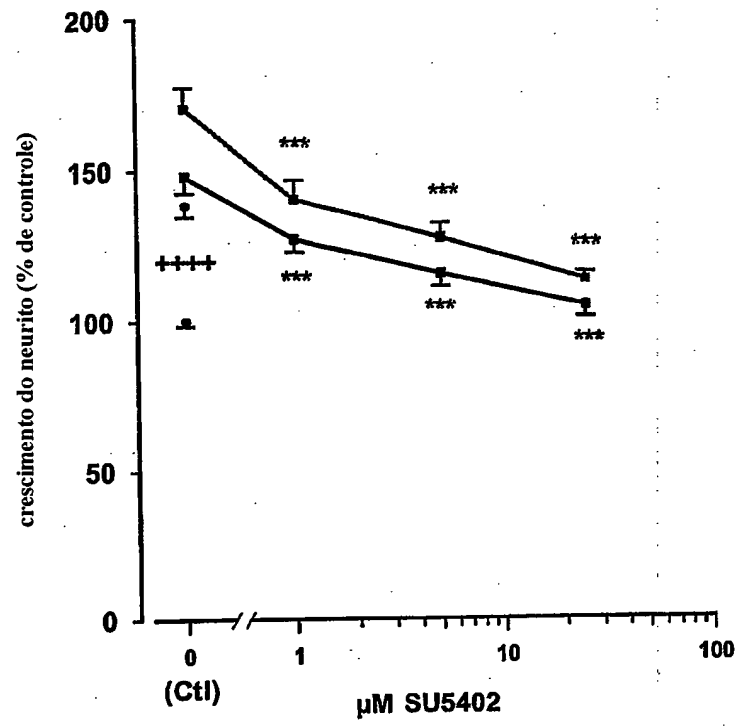
**Figure 8**

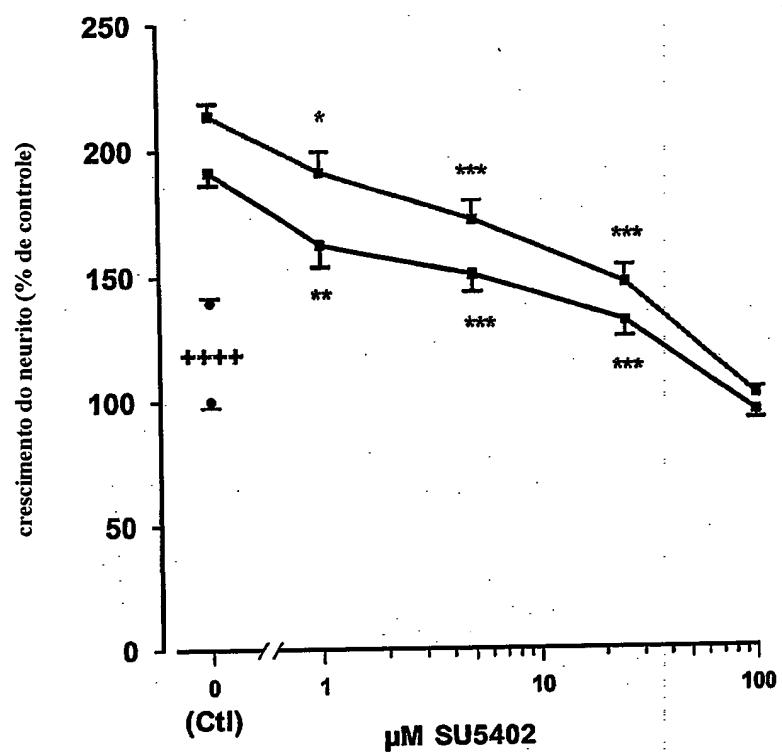
**Figura 9**

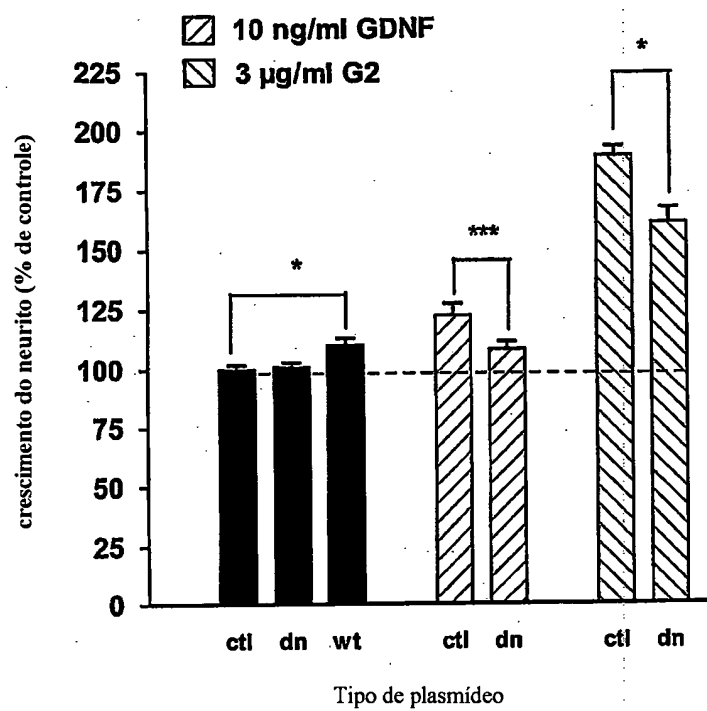
**Figura 10**

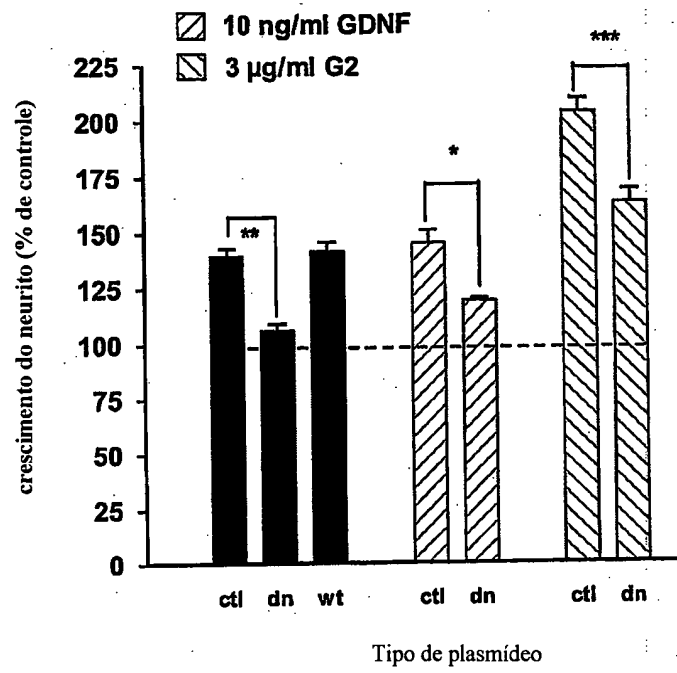
**Figura 11**

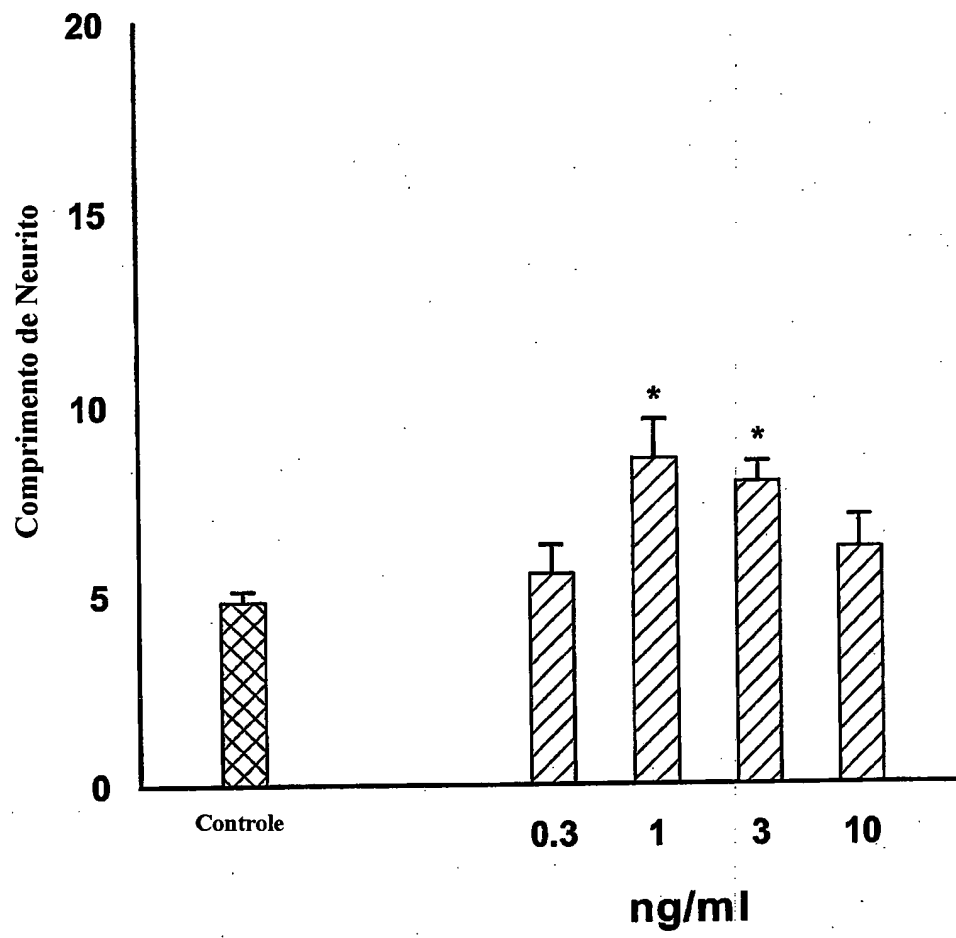
**Figura 12**

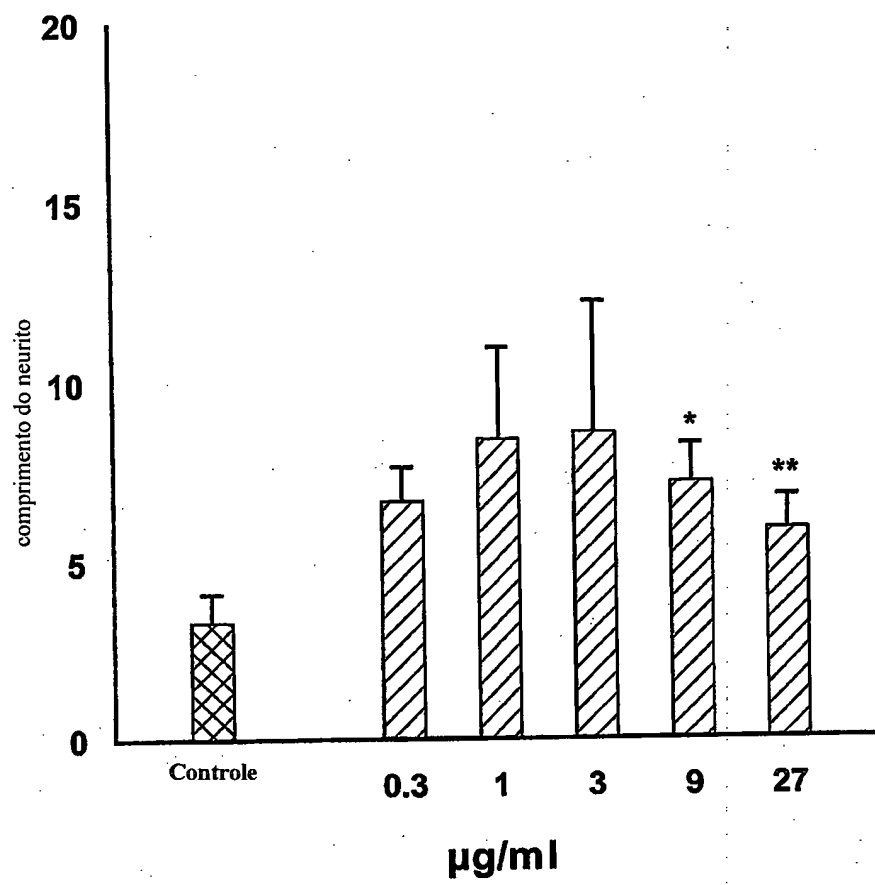
**Figura 13**

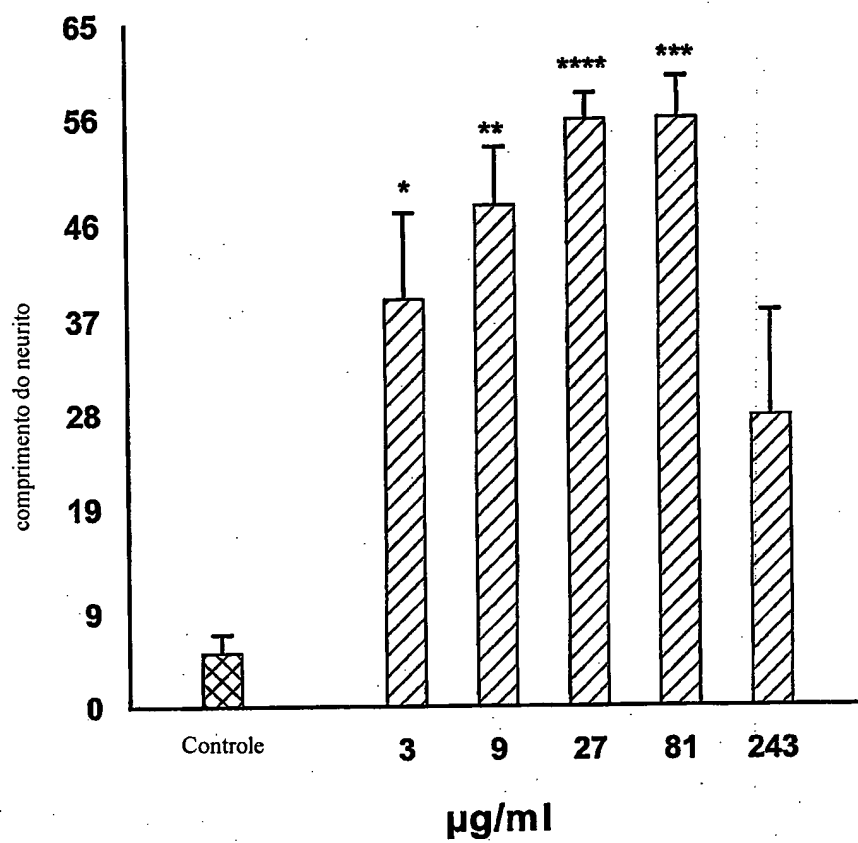
**Figura 14**

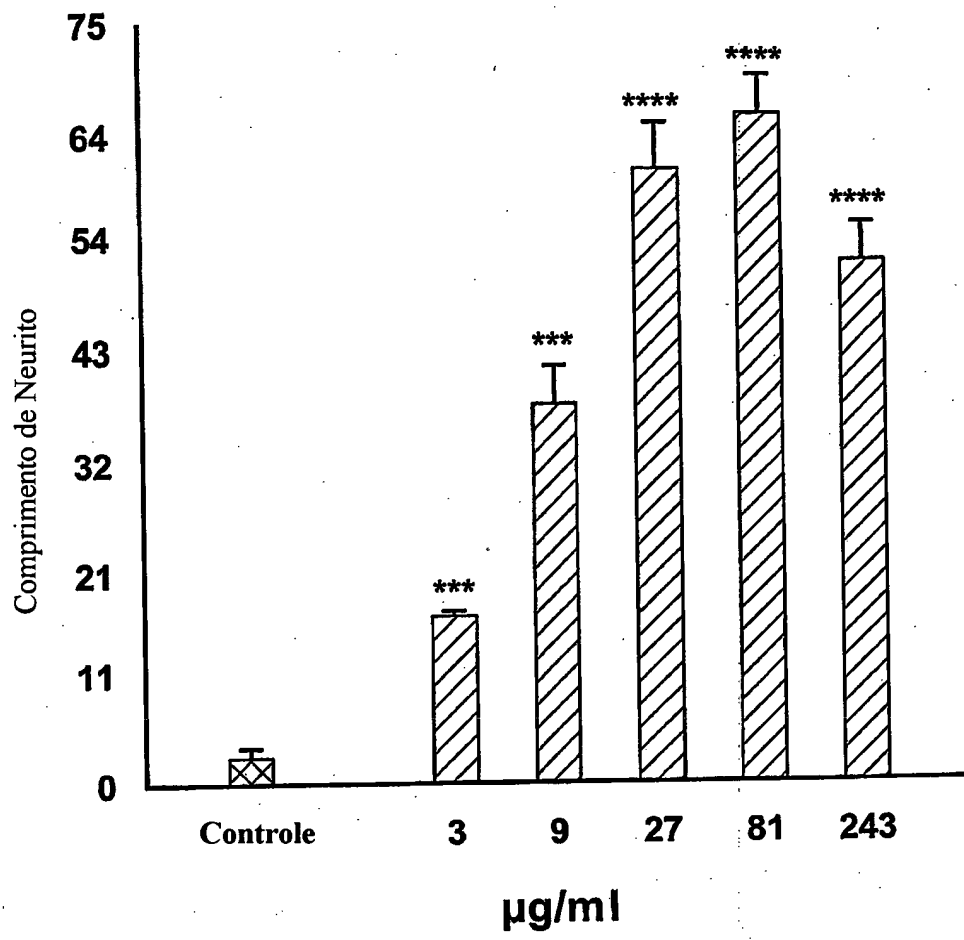
**Figura 15**

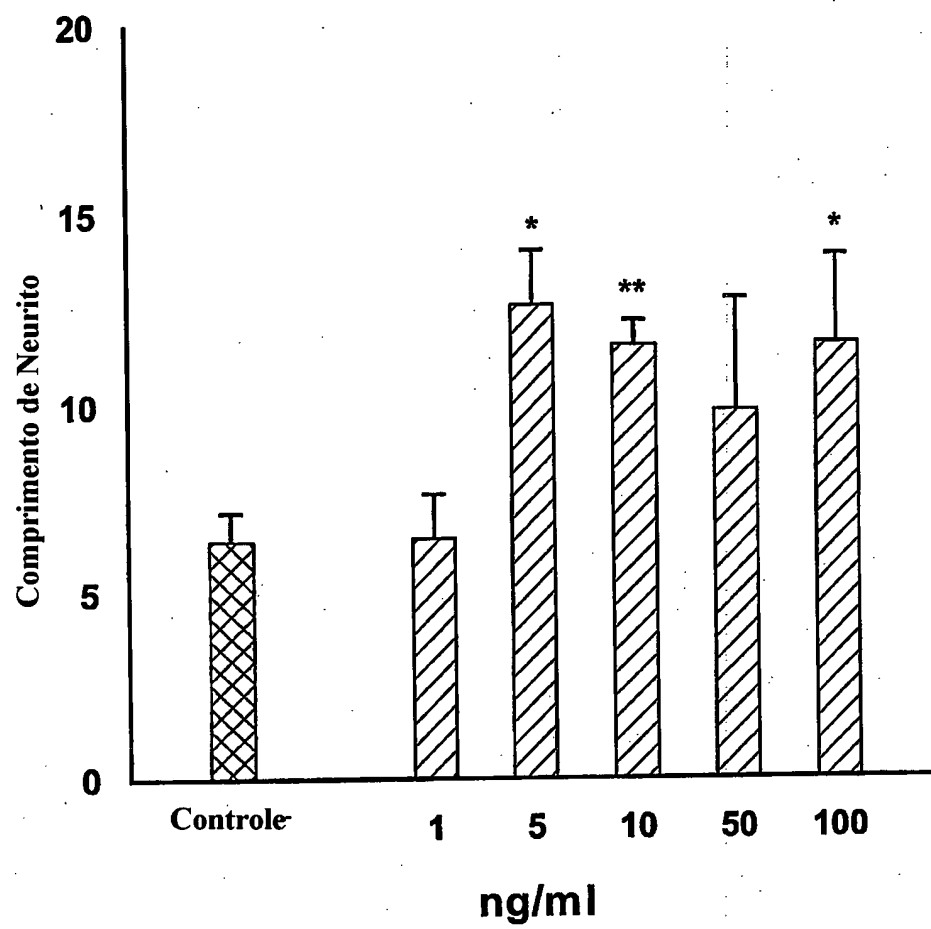
**Figura 16**

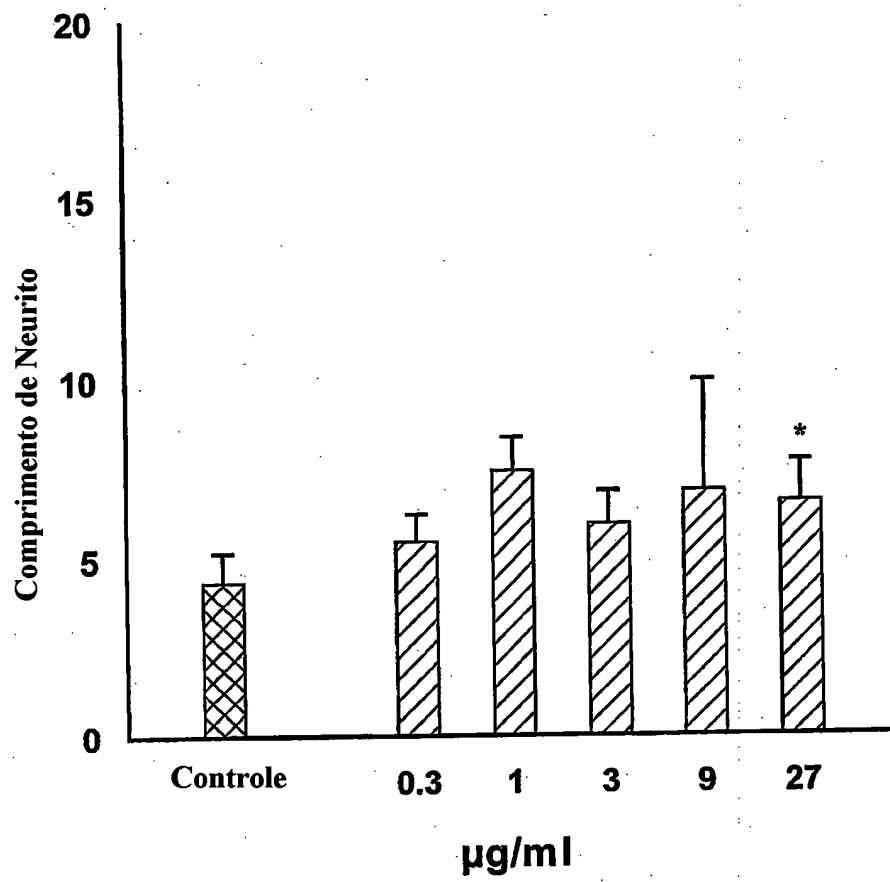
**Figura 17**

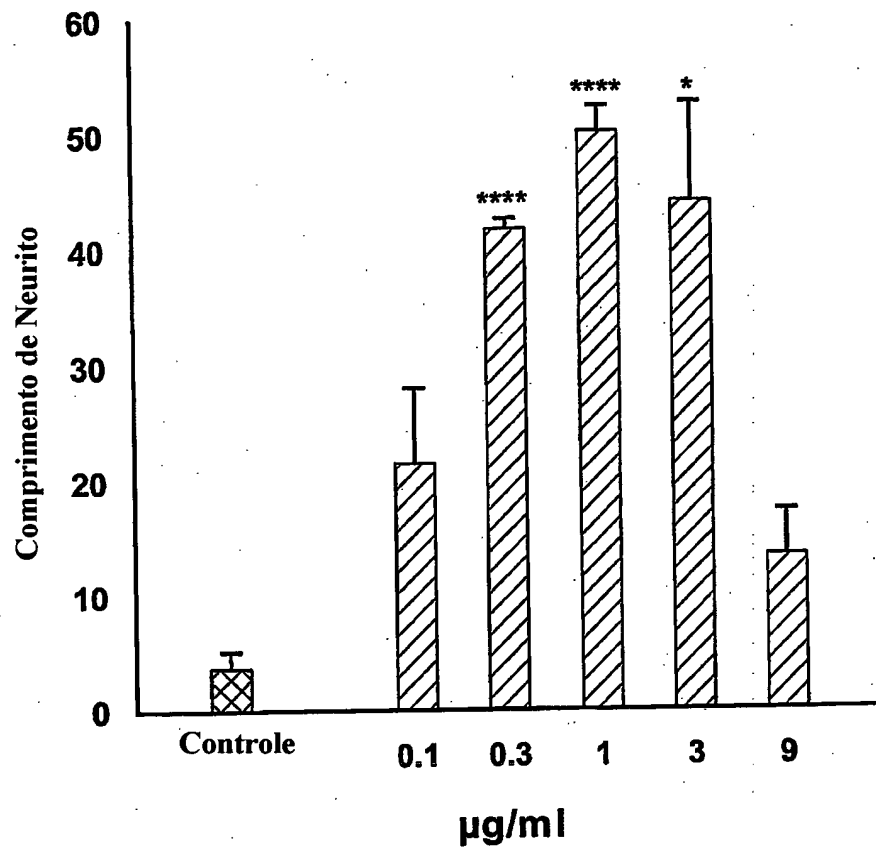
**Figura 18**

**Figura 19**

**Figura 20**

**Figura 21**

**Figura 22**

**Figura 23**

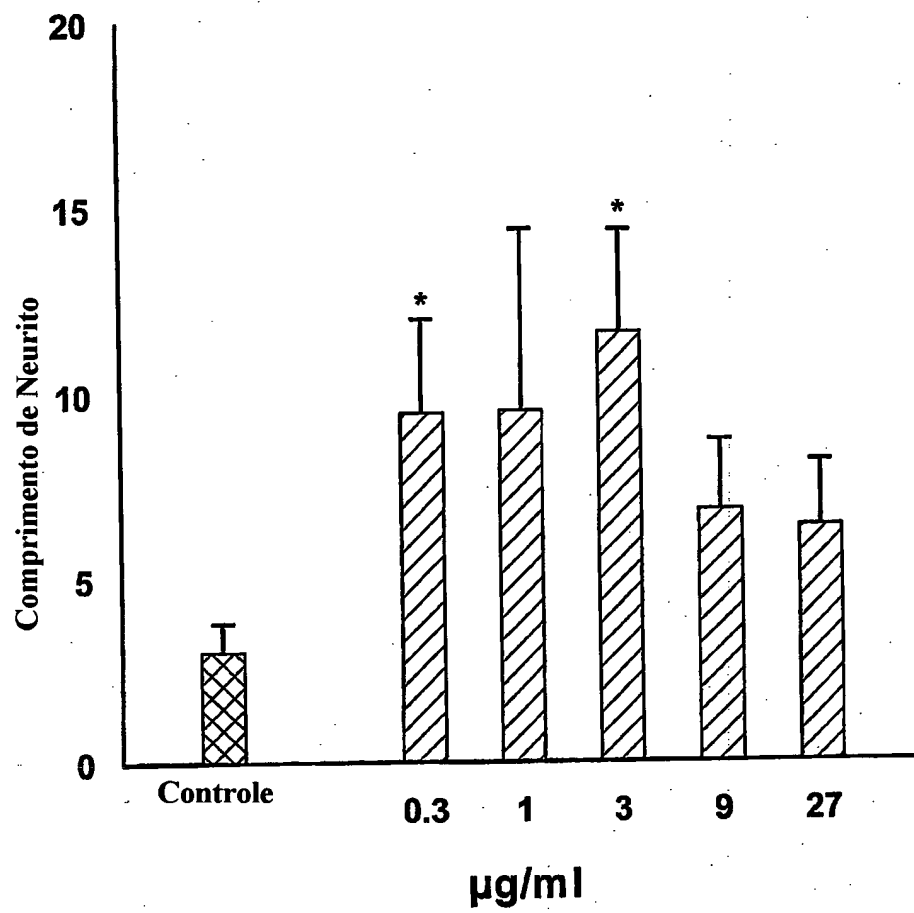
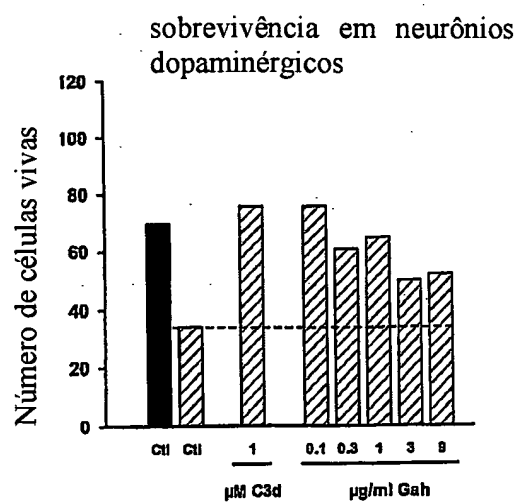
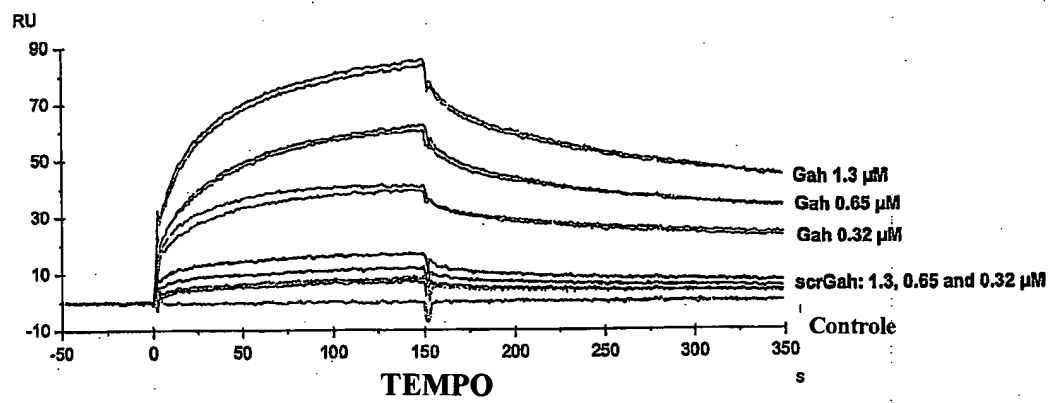
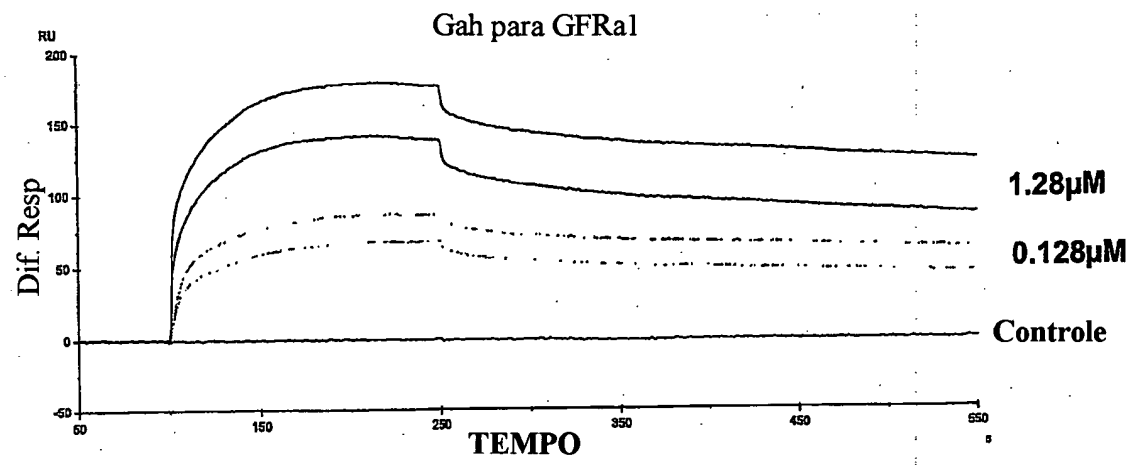


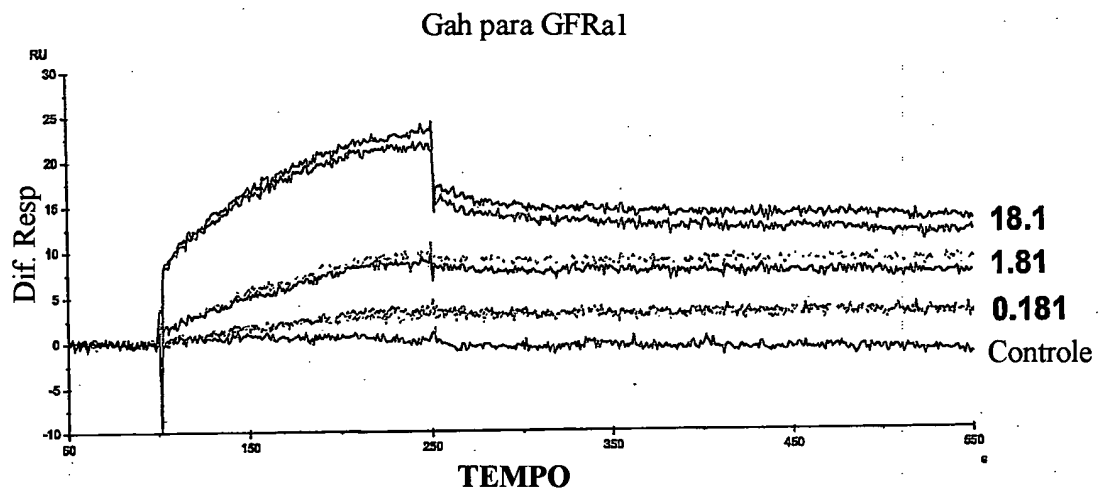
Figura 24

JANEX98

Hachurado = 100 μ M 6-OHDA**Figura 25**

**Figura 26**

**Figura 27**

**Figura 28**

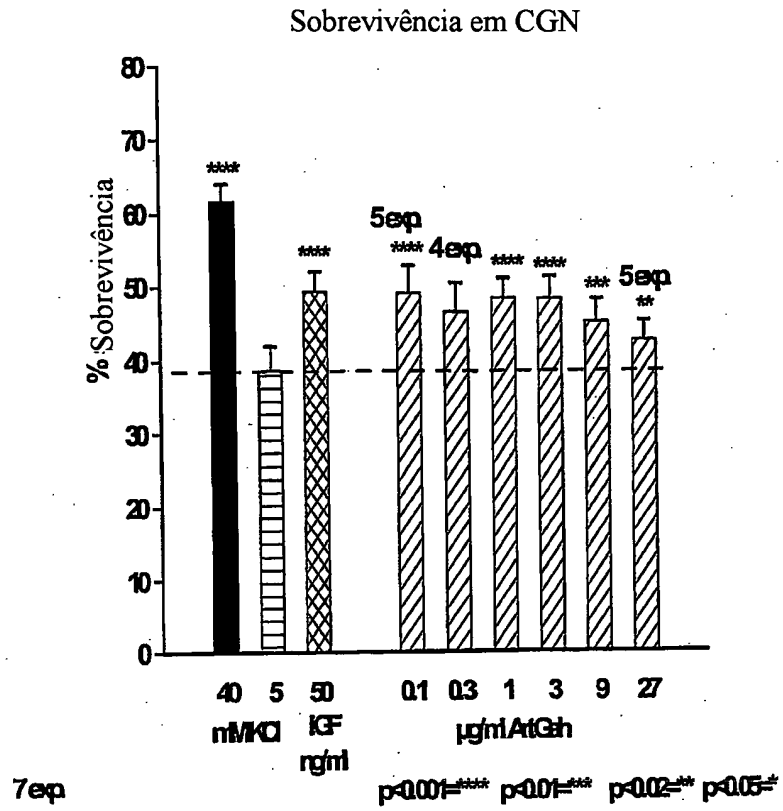


Figura 29

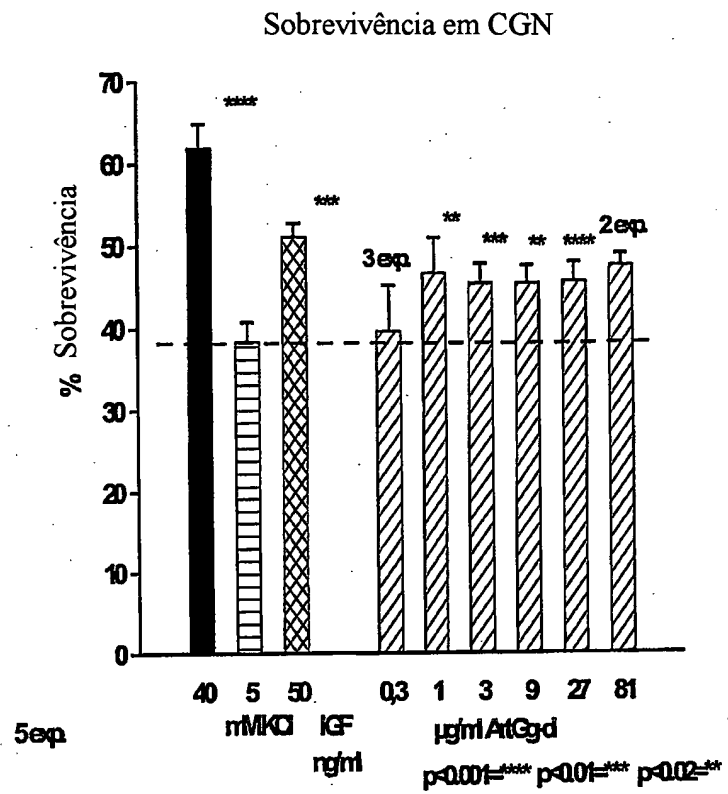


Figura 30

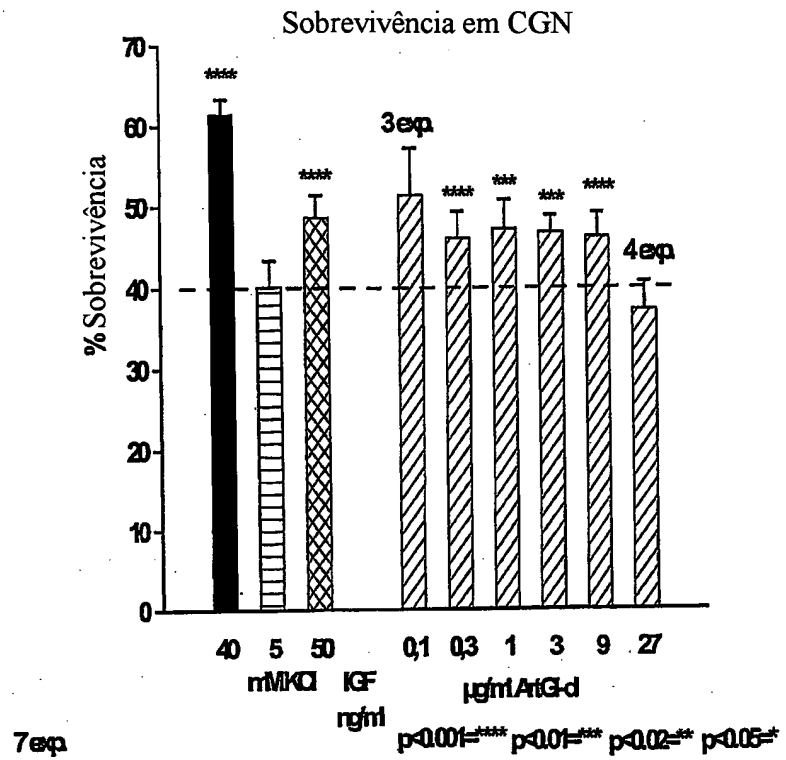


Figura 31

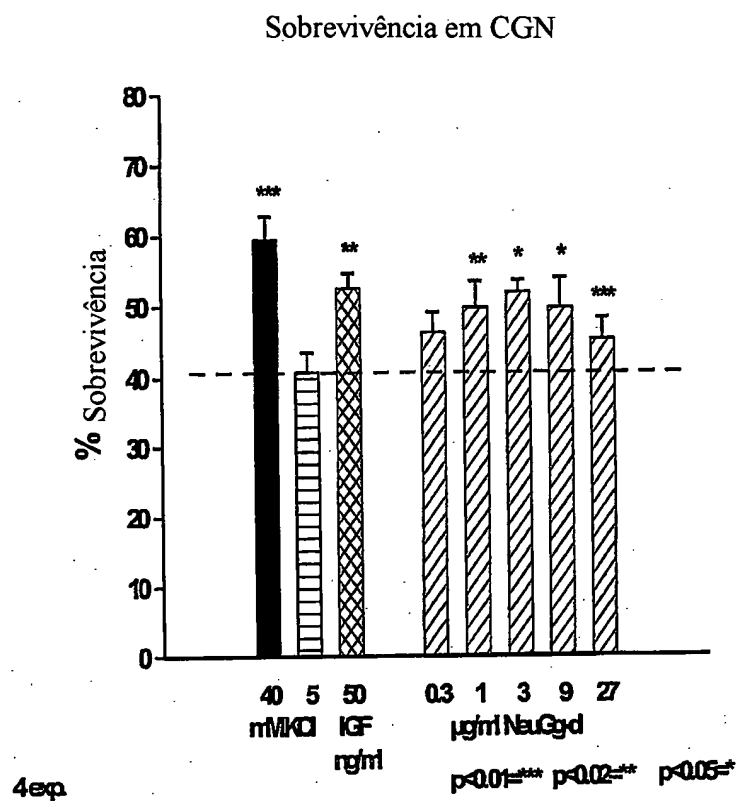


Figura 32

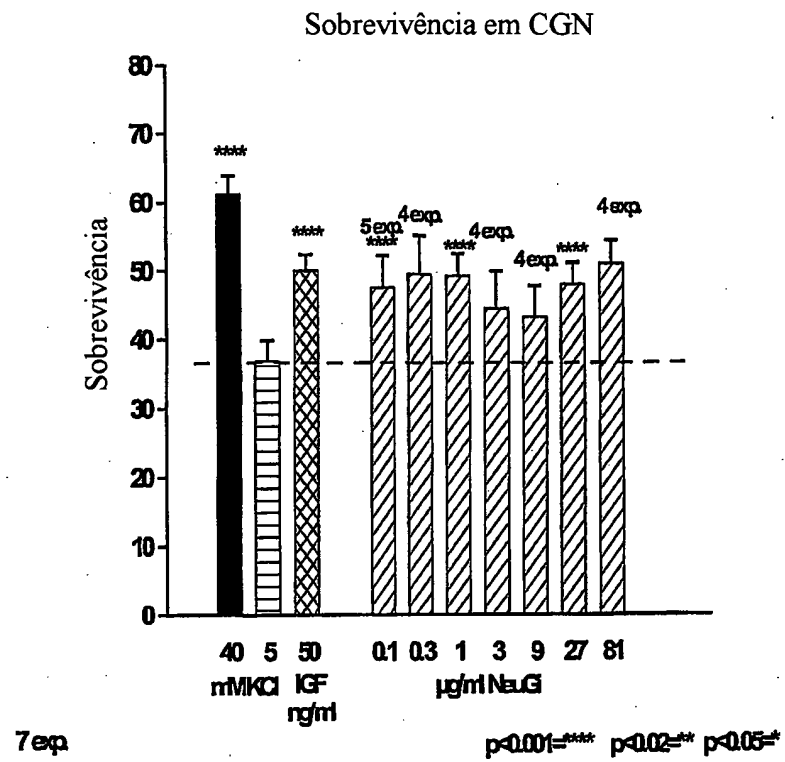
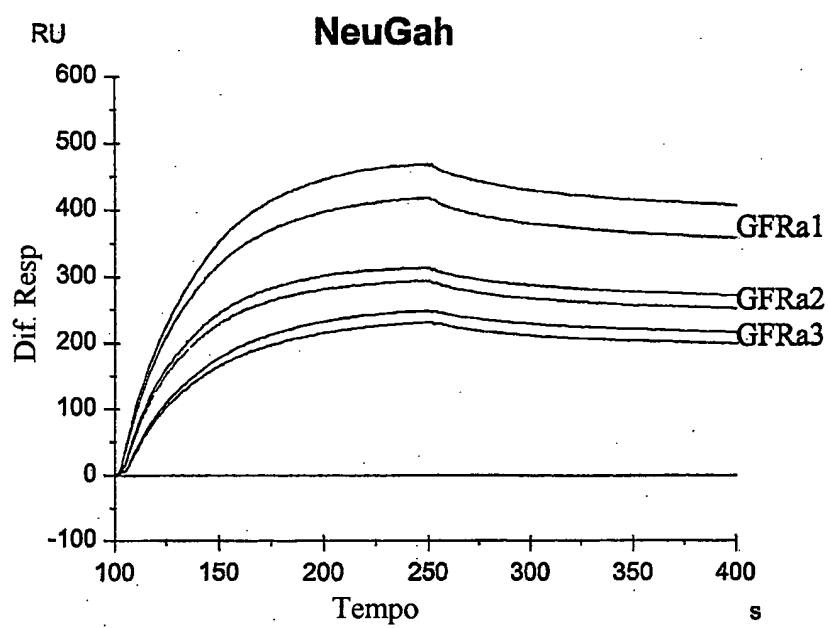
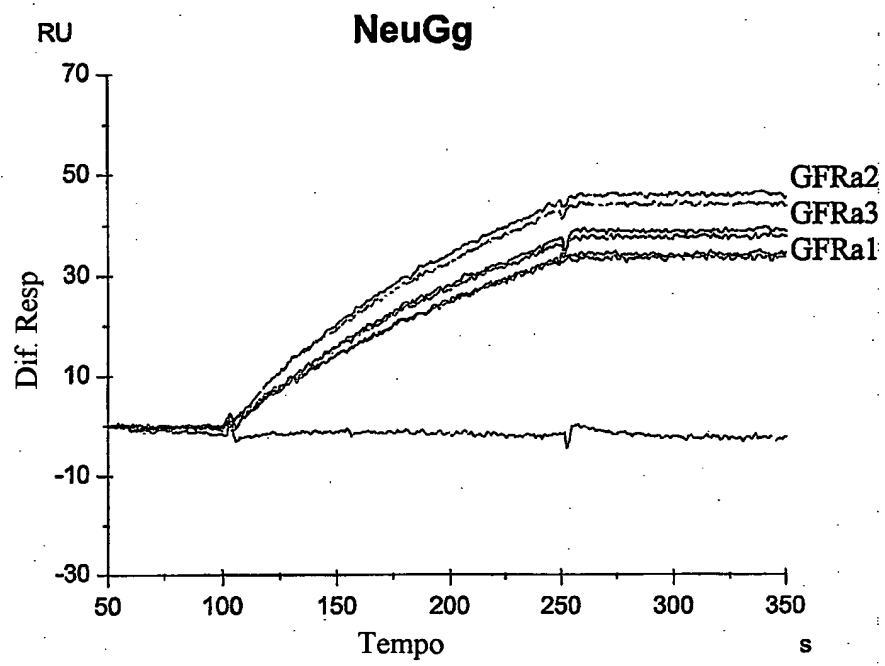
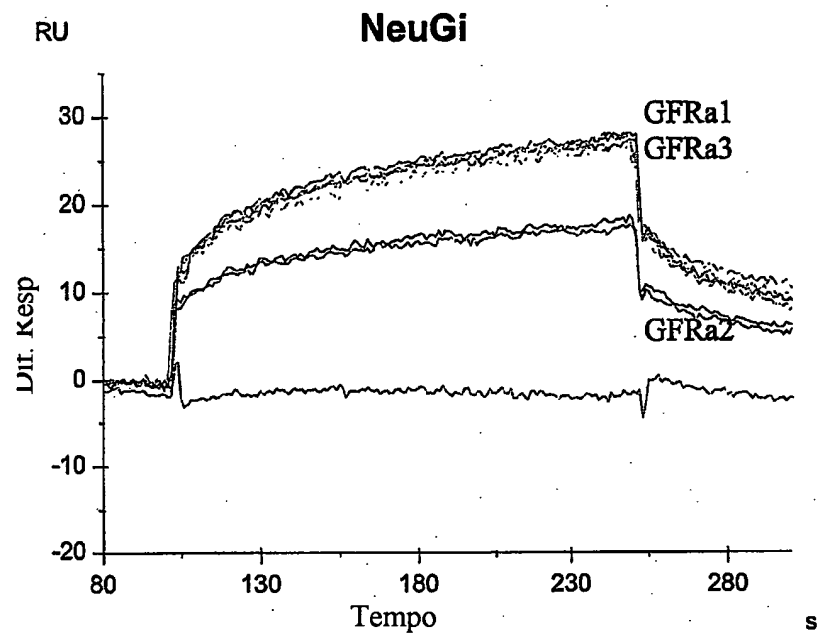
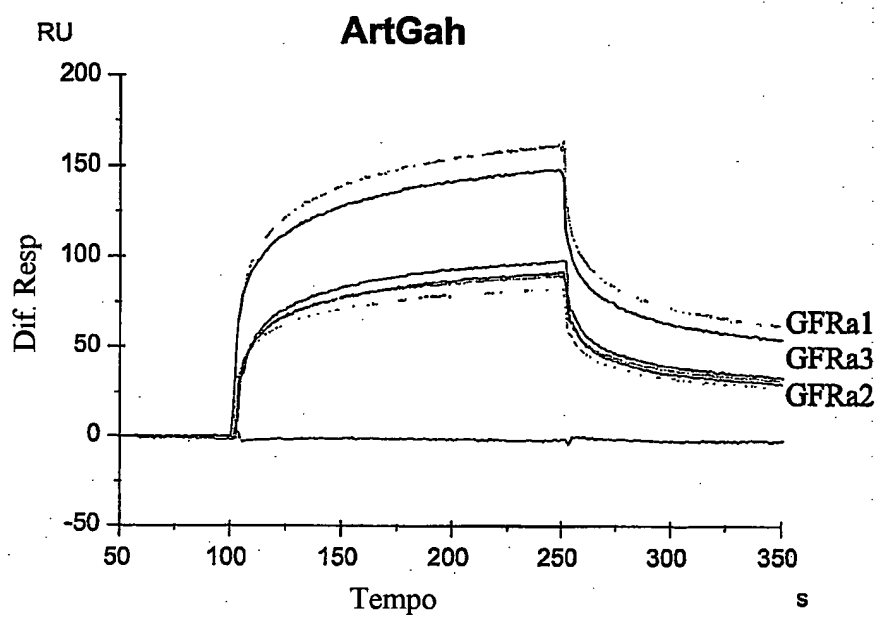


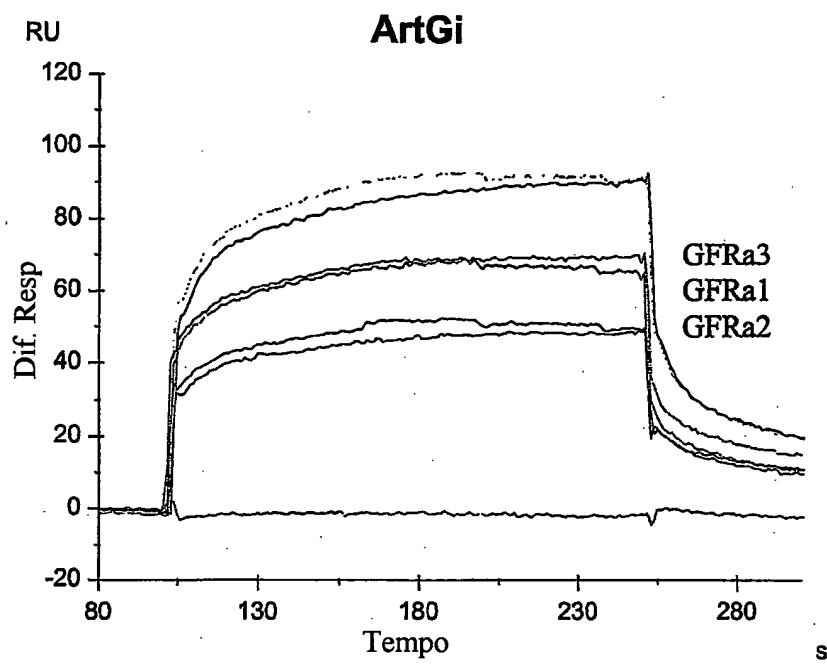
Figura 33

**Figura 34**

**Figura 35**

**Figura 36**

**Figura 37**

**Figura 38**

RESUMO

"PEPTÍDEOS DERIVADOS DE GDNF"

A presente invenção relaciona-se aos fragmentos de peptídeos derivados das proteínas pertencendo à superfamília do TGF-beta, composições farmacêuticas compreendendo os referidos fragmentos de peptídeos e usos dos mesmos para tratamento de uma doença ou condição em que os efeitos de estimulação da diferenciação celular neuronal, sobrevivência celular neuronal, estimulação da plasticidade neural associada com aprendizagem e memória e/ou inibindo a resposta inflamatória são benéficas para tratamento.