

(11) Número de Publicação: **PT 1290023 E**

(51) Classificação Internacional:  
**C07K 14/47** (2007.10) **A61K 38/00** (2007.10)  
**A61K 48/00** (2007.10)

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2001.04.02</b>	(73) Titular(es): <b>AVENTIS PHARMACEUTICALS INC.</b> <b>300 SOMERSET CORPORATE BOULEVARD</b> <b>BRIDGEWATER, NEW JERSEY 08807</b> US
(30) Prioridade(s): <b>2000.03.31 US 193905 P</b> <b>2000.07.26 GB 0018307</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2003.03.12</b>	(72) Inventor(es): <b>PATRICE DENEFLE</b> FR <b>JUNE KAPLOW</b> US <b>THOMAS HAWS</b> US <b>MARIE ROSIER</b> FR
(45) Data e BPI da concessão: <b>2010.10.27</b> <b>003/2011</b>	(74) Mandatário: <b>PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA</b> <b>RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1399-019 LISBOA</b> PT

(54) Epígrafe: **FACTOR INDUTOR DO FACTOR NUCLEAR KB**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO É DIRIGIDA A POLIPÉPTIDOS DO FACTOR DE INDUÇÃO DO FACTOR NUCLEAR &#922;B (NF&#922;B) (PÉPTIDOS NFIF) QUE SÃO CAPAZES DE INDUZIR NF&#922;B. A PRESENTE INVENÇÃO INCLUI NO SEU ÂMBITO POLIPÉPTIDOS NFIF, INCLUINDO NFIF-14B E NFIF-7A, ADN, INCLUINDO ADNC, QUE CODIFICAM ESTES POLIPÉPTIDOS E VECTORES DE EXPRESSÃO CAPAZES DE EXPRESSAR OS POLIPÉPTIDOS NFIF. ESTÃO TAMBÉM INCLUÍDOS MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA AUMENTAR A INDUÇÃO DE NF&#922;B NUM DOENTE, MÉTODOS E COMPOSIÇÕES PARA DIMINUIR A INDUÇÃO DE NF&#922;B NUM DOENTE, MÉTODOS PARA INIBIR A INFLAMAÇÃO E MÉTODOS PARA A PREPARAÇÃO DE UM MEDICAMENTO PRETENDIDO PARA O TRATAMENTO E/OU PREVENÇÃO DE UMA RESPOSTA INFLAMATÓRIA REGULADA POR NF&#922;B. ALÉM DISSO, SÃO PROPORCIONADOS MÉTODOS PARA DETERMINAR SE UM COMPOSTO DE TESTE INIBE OU ESTIMULA A ACTIVIDADE DE PÉPTIDOS NFIF.

## **DESCRIÇÃO**

### **"FACTOR INDUTOR DO FACTOR NUCLEAR KB"**

#### **Campo da Invenção**

O factor nuclear kB (NFkB) compreende uma família de factores de transcrição eucarióticos envolvidos na regulação de genes envolvidos em respostas imunes e outras funções celulares. Nalguns casos, activação de NFkB leva a uma resposta inflamatória que, em última análise, resulta num estado de doença. Consequentemente, deve ser desejável desenvolver meios para controlar indução de NFkB. A presente invenção proporciona polipeptídos que estão envolvidos na indução de NFkB e que podem ser utilizados para melhorar a expressão ou activação de NFkB ou para identificar e preparar inibidores da expressão ou activação de NFkB.

#### **Desenvolvimentos Reportados**

O factor nuclear kB (NFkB) compreende uma família de factores de transcrição encontrados na maioria das células eucarióticas. O NFkB desempenha um papel na regulação de genes envolvidos na inflamação de tecidos, proliferação celular e diferenciação celular.

Vários estudos examinaram a relação entre os estados de doença e a expressão das subunidades de proteínas, compreendendo NFkB ou activação de NFkB já presente numa célula. Li et al.

estudaram a regulação de NFκB pela proteína HTLV-1 Tax demonstrando que a capacidade de Tax para activar a via de NFκB desempenha um papel essencial na transformação celular induzida por HTLV-1 (Li et al., *Gene Expr.*, 7, 4-6, 233-245 (1999)). Lentsch e Ward estudaram a activação e regulação de NFκB durante inflamação aguda e descreveram a relação entre NFκB e as proteínas inibidoras da família IKappaB (Lentsch et al., *Clin. Chem. Lab. Med.*, 37, 3, 205-208 (1999)). Visconti et al. investigaram o papel de NFκB na carcinogénese da tiróide através da análise de linhas celulares de carcinoma da tiróide. Os seus estudos indicaram que a activação do complexo de NFκB por sobre-expressão da proteína p65 desempenhava um papel crítico no processo de transformação da célula da tiróide (Visconti et al., *Oncogene*, 15, 16, 1987-1994 (1997)). Mukhopadhyay et al. investigaram a expressão da subunidade p50 do complexo do factor de transcrição NFκB em tecidos de carcinoma de pulmão de célula não pequena demonstrando que 81% dos tecidos frescos de cancro de pulmão de célula não pequena expressam de duas a vinte vezes níveis superiores da subunidade p50 do que o tecido de pulmão normal (Mukhopadhyay et al., *Oncogene*, 11, 5, 999-1003 (1995)). Khaled et al. atingiram a expressão do gene de p50 com oligodesoxinucleótidos anti-sentido modificados 3' fosforotioato específicos e foram capazes de reduzir a expressão de NFκB. Os seus resultados demonstraram que as moléculas de p50 anti-sentido podiam reduzir a expressão de NFκB e podiam regular negativamente a resposta imunitária proporcionando um tratamento possível para distúrbios autoimunitários (Khaled et al., *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 83, 3, 254-263 (1997)).

Pahl (*Oncogene*, Vol. 18, Nº 49, 1999, pp 6853-6866) divulga activadores e genes alvo de factores de transcrição Rel/NF-kappa. Além disso, Mukhopadhyay (*J. Biol. Chem.*, Vol.

274, Nº 23, 1999, pp 15978-15981) divulga uma citocina denominada THANK que activa o factor nuclear κB.

### **Sumário da Invenção**

De acordo com a presente invenção, são proporcionadas sequências de ácido nucleico que codificam o factor indutor do factor B nuclear (NFIF) 14b e 7a. Estão também incluídos os ADNC que codificam NFIF-14b e NFIF-7a e os polipéptidos isolados e purificados NFIF-14b e NFIF-7a que induzem NFB. A presente invenção também inclui vectores de expressão que expressam os polipéptidos NFIF-14b e NFIF-7a. Exemplos de vectores de expressão preferidos são vectores retrovirais, vectores adenovirais, vectores virais adeno-associados, herpes, vectores de hespervírus e vectores de ADN nu. A presente invenção também proporciona composições compreendendo um polipéptido NFIF-14b ou NFIF-7a e um veículo farmaceuticamente aceitável.

Outro aspecto da presente invenção são composições para baixar a expressão do gene NFIF, compreendendo um ácido nucleico anti-sentido. Ainda outro aspecto da presente invenção é uma composição para baixar a actividade de um polipéptido NFIF, compreendendo um anticorpo neutralizante que se liga a um polipéptido NFIF e baixa a sua actividade.

Ainda outra forma de realização da presente invenção é uma composição para baixar a expressão de NFIF num doente, compreendendo uma ribozima que corta ARN que codifica um polipéptido NFIF.

A presente invenção proporciona métodos para avaliar se um composto de teste é eficaz na inibição da actividade de polipéptidos NFIF-14b, compreendendo (A) comparar o nível de expressão do gene regulado por NF $\kappa$ B numa primeira amostra que comprehende: (1) NFIF-14b; (2) o gene repórter regulado por NF $\kappa$ B; e (3) o composto de teste com o nível de expressão do gene numa segunda amostra que comprehende (4) NFIF-14b; e (5) o gene repórter regulado por NF $\kappa$ B; e (B) determinar se a expressão do gene repórter é inferior na primeira amostra em relação à segunda amostra.

Ainda outro aspecto da presente invenção proporciona métodos para avaliar se um composto de teste é eficaz na inibição da actividade de polipéptidos NFIF-7a, compreendendo (A) comparar o nível de expressão do gene regulado por NF $\kappa$ B numa primeira amostra que comprehende: (1) NFIF-7a; (2) o gene repórter regulado por NF $\kappa$ B; e (3) o composto de teste com o nível de expressão do gene numa segunda amostra que comprehende (4) NFIF-7a; e (5) o gene repórter regulado por NF $\kappa$ B; e (B) determinar se a expressão do gene repórter é inferior na primeira amostra em relação à segunda amostra.

Ainda outro aspecto da presente invenção proporciona um método para identificar se um composto de teste pode melhorar a actividade de NFIF-14b baseado na expressão de um gene repórter de regulador de NF $\kappa$ B, compreendendo (A) comparar o nível de expressão do gene regulado por NF $\kappa$ B numa primeira amostra comprehendendo (1) NFIF-14b; (2) o gene repórter regulado por NF $\kappa$ B; e (3) o composto de teste com o nível de expressão do gene numa segunda amostra comprehendendo: (4) NFIF-14b; e (5) o gene repórter regulado por NF $\kappa$ B; e (B) determinar se a expressão do

gene repórter é superior na primeira amostra em relação à segunda amostra.

Outro aspecto da presente invenção proporciona um método para identificar se um composto de teste pode melhorar a actividade de NFIF-7a baseada na expressão de um gene repórter de regulador de NFκB, compreendendo (A) comparar o nível de expressão do gene regulado por NFκB numa primeira amostra compreendendo (1) NFIF-7a; (2) o gene repórter regulado por NFκB; e (3) o composto de teste com o nível de expressão do gene numa segunda amostra compreendendo: (4) NFIF-7a; e (5) o gene repórter regulado por NFκB; e (B) determinar se a expressão do gene repórter é superior na referida primeira amostra em relação à segunda amostra.

Outro aspecto da presente invenção refere-se à utilização de um polipéptido NFIF para o fabrico de um medicamento destinado ao tratamento e/ou prevenção de uma resposta inflamatória regulada por NFκB. Ainda outro aspecto da presente invenção refere-se à utilização de um ácido nucleico que codifica um polipéptido NFIF, para o fabrico de um medicamento destinado ao tratamento e/ou prevenção de uma resposta inflamatória regulada por NFκB.

Outro aspecto da presente invenção refere-se à utilização de um vector recombinante compreendendo um ácido nucleico que codifica um polipéptido NFIF, para o fabrico de um medicamento destinado ao tratamento e/ou prevenção de uma resposta inflamatória regulada por NFκB. Ainda outro aspecto da presente invenção refere-se à utilização de um vector viral recombinante defeituoso para o fabrico de um medicamento destinado ao tratamento e/ou prevenção de uma resposta regulada por NFκB.

Duas sequências que demonstram semelhanças com os polipeptídos da presente invenção estão disponíveis na biblioteca de sequências de ácidos nucleicos GenBank. A primeira sequência, que possui o Número de Acesso Y08135 codifica um péptido identificado como fosfodiesterase 3a tipo esfingomielinase ácida de murganho de comprimento total. A segunda sequência, que possui o Número de Acesso Y08136 codificava um clone humano parcial (863 pb das quais 536 eram codificantes) para uma sequência proteica identificada como fosfodiesterase 3a tipo esfingomielinase ácida humana. Ambas as sequências foram submetidas em 17 de Setembro de 1996 por K. Hofmann. Embora ambas estas sequências tenham sido identificadas como codificando fosfodiesterases tipo esfingomielinase ácida, não houve confirmação deste tipo de actividade enzimática. Estas sequências podem ter sido identificadas como fosfodiesterases tipo esfingomielinase ácida devido a semelhanças entre as sequências 3' destas proteínas e as sequências 3' de membros da família da esfingomielinase.

### **Breve Descrição das Figuras**

A Figura 1 é a sequência de aminoácidos para NFIF-14b.

A Figura 2 é a sequência de aminoácidos para NFIF-7a.

A Figura 3 é a sequência de ADNC para NFIP-14b e NFIF-7a alinhada para comparação.

A Figura 4 é uma representação diagramática de NFIF-14b e NFIF-7a.

A Figura 5 é um gráfico de barras que representa as contagens de luminómetro por segundo observadas em células HeK 293 às 48 horas.

A Figura 6 é um gráfico de barras representando as contagens de luminómetro por segundo observadas em células Cos-7 às 48 horas.

A Figura 7 é a sequência de aminoácidos de uma sequência de 15 resíduos utilizada para preparar anticorpos dirigidos contra NFIF.

A Figura 8 é uma Transferência de Northern utilizando uma sonda NFIF.

#### **Descrição Detalhada da Invenção**

A presente invenção proporciona polipéptidos que são capazes de induzir NF $\kappa$ B assim como compostos e composições que são capazes de inibir a indução de NF $\kappa$ B.

A presente invenção baseia-se, em parte, na descoberta de proteínas do factor de induz NF $\kappa$ B (NFIF). Foram identificadas duas variantes funcionais da proteína NFIF. Uma variante, NFIF-14b, comprehende NFIF de comprimento total. A segunda variante, NFIF-7a, acredita-se que seja uma variante de excisão de NFIF-14b. Ambas NFIF-14b e NFIF-7a possuem a capacidade para induzir NF $\kappa$ B.

NF $\kappa$ B comprehende uma família de factores de transcrição eucarióticos que regulam genes envolvidos em respostas

eucarióticas e outras actividades celulares. Em certas situações, pode ser desejável induzir NF<sub>K</sub>B de modo a iniciar ou aumentar a extensão de uma resposta imunitária. Noutras situações, pode ser desejável reduzir ou prevenir a indução de NF<sub>K</sub>B de modo a reduzir ou prevenir uma resposta imunitária regulada por NF<sub>K</sub>B. Por exemplo, foi descoberto que NFIF está associado a uma variedade de patologias associadas a respostas imunitárias reguladas por NF<sub>K</sub>B, incluindo aterosclerose. Através da inibição da expressão do gene NFIF, ou pela interferência de outra forma com a actividade da proteína NFIF, é possível inibir a indução de NF<sub>K</sub>B, inibindo ou prevenindo desse modo a resposta inflamatória regulada por NF<sub>K</sub>B que resulta em aterosclerose e outras doenças.

A descoberta do gene que codifica NFIF e a capacidade de preparar proteínas NFIF facilita a identificação e preparação de compostos e composições que são capazes de inibir a actividade de proteínas NFIF e consequentemente inibir a indução de NF<sub>K</sub>B.

A descrição que se segue começa com uma secção de Definições, seguido por informação de fundo relacionada com NF<sub>K</sub>B. Isto é seguido por uma discussão dos polipéptidos NFIF da presente invenção, assim como informação no isolamento de ADN que codifica esses polipéptidos e métodos para preparar variantes dos polipéptidos. Vectores de expressão capazes de expressar os ADN que codificam o polipéptido NFIF são então discutidos, incluindo informação sobre promotores apropriados para os sistemas de expressão, métodos para introduzir os vectores de expressão em células hospedeiras e sistemas de vectores virais apropriados. Após esta discussão de polipéptidos NFIF e suas variantes, existe uma discussão sobre utilizações terapêuticas para polipéptidos NFIF. Esta discussão é seguida

por uma descrição de composições úteis na prática da presente invenção. Isto é seguido por uma discussão que delineia as várias composições e compostos terapêuticos, incluindo polipeptídos baseados em NFIF, ácidos nucleicos anti-sentido, ribozimas e anticorpos. Finalmente, são descritos os métodos da presente invenção que utilizam os compostos e composições descritos.

### **Definições**

O termo "NFIF" é utilizado para designar "factor que induz o factor κB nuclear".

Os termos "induzir" ou "indução" quando utilizados na descrição da actividade de NFIF incluem no seu âmbito a capacidade de provocar a expressão das proteínas de subunidade, compreendendo NFκB directa ou indirectamente, assim como a capacidade para activar NFκB que já está presente numa célula. Esta activação pode ser directa ou indirecta e resulta no funcionamento de NFκB como um factor de transcrição.

Para os objectivos da presente descrição, a expressão "sequência nucleótidica" pode ser utilizada para designar um polinucleótido ou um ácido nucleico. A expressão "sequência nucleótidica" cobre o próprio material genético e por isso não está restringido à informação relacionada com esta sequência.

Os termos "ácido nucleico", "polinucleótido", "oligonucleótido" ou "sequência nucleótidica" cobrem sequências de ARN, ADN, ADNg ou ADNC ou alternativamente sequências

híbridas de ARN/ADN de mais do que um nucleótido, na forma de cadeia simples ou de cadeia dupla, em dupleto.

Um "ácido nucleico" é um composto polimérico que comprehende subunidades ligadas covalentemente denominados nucleótidos. O ácido nucleico inclui ácido polirribonucleico (ARN) e ácido polidesoxirribonucleico (ADN), podendo ambos ser de cadeia simples ou de cadeia dupla. O ADN inclui ADNc, ADN genómico, ADN sintético e ADN semi-sintético. A sequência nucleotídica que codifica uma proteína é denominada a sequência de sentido ou sequência codificante.

O termo "nucleótido" designa os nucleótidos naturais (A, T, G, C) assim como os nucleótidos modificados, comprehendendo, pelo menos, uma modificação, tal como (1) um análogo de uma purina, (2) um análogo de uma pirimidina ou (3) um análogo de açúcar, sendo exemplos desses nucleótidos modificados descritos, por exemplo, no Pedido PCT Nº WO 95/04064.

Para os objectivos da presente invenção, um primeiro polinucleótido é considerado como sendo "complementar" a um segundo polinucleótido quando cada base do primeiro nucleótido é emparelhada com a base complementar do segundo polinucleótido cuja orientação é invertida. As bases complementares são A e T (ou A e U) ou C e G.

ADN "heterólogo" refere-se a ADN que não está naturalmente localizado na célula ou num sítio cromossómico da célula. De um modo preferido, o ADN heterólogo inclui um gene estranho à célula.

Como aqui utilizado, o termo "homólogo", em todas as suas formas gramaticais e variações ortográficas referem-se à relação entre proteínas que possuem uma "origem evolutiva comum", incluindo proteínas de superfamílias (e. g., a superfamília das imunoglobulinas) e proteínas homólogas de diferentes espécies (e. g., cadeia leve da miosina, etc.) (Reeck et al., *Cell*, 50:667 (1987)). Essas proteínas (e os seus genes codificantes) possuem homologia de sequências, como reflectido pelo seu elevado grau de semelhança de sequências.

Consequentemente, o termo "semelhança de sequências" em todas as suas formas gramaticais refere-se ao grau de identidade ou correspondência entre sequências de ácidos nucleicos ou de aminoácidos de proteínas que podem partilhar ou não uma origem evolutiva comum (ver Reeck et al., supra). Todavia, na utilização comum e no presente pedido, o termo "homólogo", quando modificado com um advérbio, tal como "altamente", pode referir-se à semelhança de sequências e não a uma origem evolutiva comum.

Numa forma de realização específica, duas sequências de ADN são "substancialmente homólogas" ou "substancialmente semelhantes" quando, pelo menos, cerca de 50% (de um modo preferido, pelo menos, cerca de 75% e, de um modo mais preferido,, pelo menos, cerca de 90 ou 95%) dos nucleótidos emparelham ao longo de um comprimento definido das sequências de ADN. As sequências que são substancialmente homólogas podem ser identificadas por comparação das sequências que utilizam programas informáticos convencionais disponíveis nas bases de dados de sequências ou numa experiência de hibridação de Southern, por exemplo, em condições restrinquentes como definido para esse sistema particular. A definição das condições de

hibridação apropriadas está dentro da especialidade na técnica. Ver, e. g., Maniatis et al., Molecular cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring, NY (1982); Glover et al., DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I e II Oligonucleotide Synthesis, MRL. Press, Ltd., Oxford, R.U. (1985); Hames e Higgins, Hames BD e Higgins SJ, 1985. Nucleic acid hybridization: a practical approach, Hames e Higgins Ed., IRL Press, Oxford (1985)).

De um modo semelhante, numa forma de realização particular, duas sequências de aminoácidos são "substancialmente homólogas" ou "substancialmente semelhantes" quando mais de 30% dos aminoácidos são idênticos ou mais do que cerca de 60% são semelhantes (funcionalmente idênticas). De um modo preferido, as sequências semelhantes ou homólogas são identificadas através do alinhamento utilizando, por exemplo, o programa pileup de GCG (Genetics Computer Group, Manual do Programa para o GCG Package, Versão 7, Madison, Wisconsin).

A "percentagem de identidade" entre duas sequências nucleótidas ou de aminoácidos, para os objectivos da presente invenção, pode ser determinada por comparação de duas sequências alinhadas optimamente, através de uma janela para comparação.

A porção da sequência nucleótidica ou polipéptidos na janela para comparação pode, assim compreender, adições ou deleções (por exemplo "interrupções") em relação à sequência de referência (que não compreende essas adições ou essas deleções) de modo a obter um alinhamento óptimo das duas sequências.

A percentagem é calculada determinando o número de posições nas quais se observa uma base nucleica idêntica ou um resíduo de

aminoácidos idêntico para as duas sequências (nucleica ou peptídica) comparadas e, depois, dividindo o número de posições nas quais existe identidade entre as duas bases ou resíduos de aminoácidos pelo número total de posições na janela para comparação e, depois, multiplicar o resultado por 100 de modo a obter a percentagem de identidade de sequências.

O alinhamento óptimo de sequências para a comparação pode ser alcançado utilizando um computador com o auxílio de algoritmos conhecidos contidos no conjunto de programas da empresa WISCONSIN GENETICS SOFTWARE PACKAGE, GENETICS COMPUTER GROUP (GCG), 575 Science Doctor, Madison, WISCONSIN.

A título ilustrativo, será possível produzir a percentagem de identidade de sequências com o auxílio do programa de computador BLAST (versões BLAST 1.4.9 de Março de 1996, BLAST 2.0.4 de Fevereiro de 1998 e BLAST 2.0.6 de Setembro de 1998), utilizando exclusivamente os parâmetros de defeito (Altschul et al, *J. Mol. Biol.*, 215:403-410 (1990); Altschul et al, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402 (1997)). As pesquisas de Blast para sequências semelhantes/homólogas a uma sequência de referência "solicitada", com o auxílio do algoritmo de Altschul et al. A sequência solicitada e as bases de dados utilizadas podem ser dos tipos péptido ou nucleico, sendo possível qualquer combinação.

O termo "correspondente a" é aqui utilizado para se referir a sequências semelhantes ou homólogas, quer a posição exacta seja idêntica ou diferente da molécula à qual a semelhança ou homologia é medida. Um alinhamento de sequências de ácidos nucleicos ou de aminoácidos pode incluir espaços. Assim, o termo

“correspondente a” refere-se à semelhança de sequências e não à numeração dos resíduos de aminoácidos ou bases de nucleótidos.

“Variante” de um ácido nucleico de acordo com a invenção será entendida como significando um ácido nucleico que difere numa ou mais bases em relação ao polinucleótido de referência. Uma variante de ácido nucleico pode ser de origem natural, tal como uma variante alélica que existe naturalmente ou pode ser também uma variante não natural obtida, por exemplo, através de técnicas mutagénicas.

Em geral, as diferenças entre o ácido nucleico de referência (geralmente, de tipo selvagem) e a variante de ácido nucleico são pequenas, de modo a que as sequências nucleotídicas do ácido nucleico de referência e da variante de ácido nucleico são muito semelhantes e, em muitas regiões, idênticas. As modificações de nucleótidos presentes numa variante de ácido nucleico podem ser silenciosas, o que significa que não alteram as sequências de aminoácidos codificadas pela referida variante de ácido nucleico.

Todavia, as alterações em nucleótidos numa variante de ácido nucleico podem também resultar em substituições, adições ou deleções no polipéptido codificado pela variante de ácido nucleico em relação aos polipéptidos codificados pelo ácido nucleico de referência. Além disso, as modificações de nucleótidos nas regiões codificantes podem produzir substituições conservadoras ou não conservadoras na sequência de aminoácidos do polipéptido.

De um modo preferido, as variantes de ácidos nucleicos de acordo com a invenção codificam polipéptidos que conservam

substancialmente a mesma função ou actividade biológica que o polipéptido do ácido nucleico de referência ou alternativamente a capacidade para serem reconhecidos por anticorpos dirigidos contra os polipéptidos codificados pelo ácido nucleico de referência inicial.

Algumas variantes de ácidos nucleicos codificarão assim formas mutadas dos polipéptidos cujo estudo sistemático tornará possível deduzir as relações estrutura-actividade das proteínas em questão. O conhecimento destas variantes em relação à doença estudada é essencial, uma vez que torna possível entender a causa molecular da patologia.

“Fragmento” será entendido como significando uma sequência nucleótidica de comprimento reduzido em relação ao ácido nucleico de referência e compreendendo, sobre a porção comum, uma sequência nucleótidica idêntica ao ácido nucleico de referência. Um tal “fragmento” de ácido nucleico de acordo com a invenção pode ser, quando apropriado, incluído num polinucleótido maior do que aquele de que é constituinte. Esses fragmentos compreendem, ou consistem alternativamente em, oligonucleótidos que variam em comprimento desde 8, 10, 12, 15, 18, 20 a 25, 30, 40, 50, 70, 80, 100, 200, 500, 1000 ou 1500 nucleótidos consecutivos de um ácido nucleico de acordo com a invenção.

Uma “molécula de ácido nucleico” refere-se à forma polimérica de éster de fosfato dos ribonucleósidos (adenosina, guanosina, uridina ou citidina; “moléculas de ARN”) ou desoxirribonucleósidos (desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxitimidina ou desoxicitidina; “moléculas de ADN”) ou qualquer dos seus análogos de fosfoéster, tais como

fosforotioatos e tioésteres, na forma de cadeia simples ou em hélice de cadeia dupla. São possíveis hélices de cadeia dupla de ADN-ADN, ADN-ARN e ARN-ARN. O termo molécula de ácido nucleico, e, em particular, molécula de ADN ou ARN, refere-se apenas à estrutura primária e secundária da molécula e não a limita a quaisquer formas terciárias particulares. Assim, este termo inclui ADN de cadeia dupla que se encontra, *inter alia*, em moléculas de ADN lineares ou circulares (e. g., fragmentos de restrição), plasmídeos e cromossomas. Na discussão da estrutura de moléculas de ADN de cadeia dupla particulares, as sequências podem ser aqui descritas de acordo com a convenção normal de fornecer apenas a sequência na direcção 5' para 3' juntamente com a cadeia de ADN não transcrito (*i. e.*, a cadeia que possui uma sequência homóloga ao ARNm). Uma "molécula de ADN recombinante" é uma molécula de ADN que sofreu uma manipulação biológica molecular.

Uma molécula de ácido nucleico é "hibridável" com outra molécula de ácido nucleico, tal como um ADNc, ADN genómico ou ARN, quando uma forma de cadeia simples da molécula de ácido nucleico pode emparelhar com a outra molécula de ácido nucleico em condições apropriadas de temperatura e força iônica da solução (ver Sambrook *et al.*, Molecular cloning: a laboratory manual. 2ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold spring Harbor, Nova Iorque. (1989)). As condições de temperatura e força iônica determinam a "restringência" da hibridação. Para o rastreio preliminar de ácidos nucleicos homólogos, condições de hibridação de baixa restringência, correspondendo à  $T_m$  de 55°, podem ser utilizadas, e. g., 5x SSC, SDS a 0,1%, leite a 0,25%, e sem formamida; ou formamida a 30%, SSC a 5x, SDS a 0,5%). Condições de hibridação de restringência moderada correspondem a uma  $T_m$  superior, e. g., formamida a 40%, com SCC a 5x ou 6x.

Condições de hibridação de restrinção elevada correspondem à  $T_m$  mais elevada, e. g., formamida a 50%, SCC a 5x ou 6x. A hibridação necessita que os dois ácidos nucleicos contenham sequências complementares, embora dependendo da restrinção da hibridação, sejam possíveis desemparelhamentos entre as bases. A restrinção apropriada para a hibridação de ácidos nucleicos depende do comprimento dos ácidos nucleicos e do grau de complementação, variáveis bem conhecidas na técnica. Quanto maior é o grau de semelhança ou homologia entre duas sequências nucleotídicas, maior será o valor da  $T_m$  para híbridos de ácidos nucleicos que possuem essas sequências. A estabilidade relativa (correspondente a  $T_m$  mais elevada) das hibridações de ácidos nucleicos diminui na seguinte ordem: ARN:ARN, ADN:ARN, ADN:ADN. Para híbridos superiores a 100 nucleótidos de comprimento, foram preparadas equações para calcular a  $T_m$  (ver Sambrook et al., *supra*, 9.50-0.51). Para hibridação ácidos nucleicos mais curtos, i. e., oligonucleótidos, uma posição de desemparelhamento torna-se mais importante e o comprimento do oligonucleótilo determina a sua especificidade (ver Sambrook et al., *supra*, 11.7-11.8). De um modo preferido, um comprimento mínimo para um ácido nucleico hibridável é de, pelo menos, cerca de 10 nucleótidos; de um modo preferido, pelo menos, cerca de 15 nucleótidos; e de um modo mais preferido o comprimento é de, pelo menos, cerca de 20 nucleótidos.

Numa forma de realização específica; o termo "condições de hibridação convencionais" refere-se a uma  $T_m$  de 55 °C e utiliza as condições apresentadas acima. Numa forma de realização preferida, a  $T_m$  é 60 °C; numa forma de realização mais preferida, a  $T_m$  é 65 °C.

“Condições de hibridação de elevada restringência” para os objectivos da presente invenção será entendido como significando as seguintes condições:

1 - Competição e PRÉ-HIBRIDAÇÃO de membrana:

- Mistura: 40 µL de ADN de esperma de salmão (10 mg/mL) + 40 µL de ADN de placenta humana (10 mg/mL)
- Desnaturar durante 5 minutos a 96 °C, depois imergir a mistura em gelo.
- Remover o SSC a 2X e verter 4 mL de mistura de formamida no tubo de hibridação que contém as membranas.
- Adicionar a mistura dos dois ADN desnaturados.
- Incubação a 42 °C durante 5 a 6 horas, com rotação.

2 - Competição de sonda marcada:

- Adicionar à sonda marcada e purificada 10 a 50 µL de ADN Cot I, dependendo da quantidade de repetições.
- Desnaturar durante 7 a 10 minutos a 95 °C.
- Incubar a 65 °C durante 2 a 5 horas.

3 - HIBRIDAÇÃO:

- Remover a mistura de pré-hibridação.
- Misturar 40 µL de ADN de esperma de salmão + 40 µL de ADN de placenta humana; desnaturar durante 5 min a 96 °C, depois imergir em gelo.

- Adicionar ao tubo de hibridação 4 mL de mistura de formamida, a mistura dos dois ADN e a sonda marcada desnaturada/ADN de Cot I.
- Incubar 15 a 20 horas a 42 °C, com rotação.

#### 4 - Lavagens e Exposição:

- Uma lavagem à temperatura ambiente em SSC a 2X, para enxaguar.
- Duas vezes 5 minutos à temperatura ambiente com SSC a 2X e SDS a 0,1% a 65 °C.
- Duas vezes 15 minutos a 65 °C com SSC a 1X e SDS a 0,1% a 65 °C.
- embrulhar as membranas em película aderente e expor.

As condições de hibridação descritas acima são adaptadas a hibridação, em condições de restringência elevada, de uma molécula de ácido nucleico de comprimento variável desde 20 nucleótidos até várias centenas de nucleótidos. É óbvio que as condições de hibridação descritas acima podem ser ajustadas como uma função do comprimento do ácido nucleico cuja hibridação se deseja ou do tipo de marcação escolhida, de acordo com técnicas conhecidas de um especialista na técnica. Condições de hibridação adequadas podem, por exemplo, ser ajustadas de acordo com os ensinamentos contidos no manual de Hames e Higgins (1985), supra ou no manual de F. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989).

### **Factor nuclear κB**

O factor nuclear κB (NFκB) comprehende uma família de factores de transcrição eucarióticos. Os factores de transcrição NFκB foram em primeiro lugar identificados como factores que ligam os elementos intensificadores no gene da cadeia leve κ em linfócitos de murino B. Estudos subsequentes demonstraram que o NFκB se liga em quase todas as células e regula os genes envolvidos na inflamação de tecido, proliferação celular e diferenciação celular.

NFκB comprehende, pelo menos, cinco subunidades: p50, p52, p65 (RelA), c-Rel e RelB que podem formar homo- e heterodímeros em várias combinações. As formas activas de NFκB são normalmente heterodímeros compreendidos por p65 (RelA) e p50.

Na maioria das células, NFκB existe como um heterodímero inactivo que é sequestrado no citossol devido à associação com uma proteína inibidora I-κB. Em resposta a estímulos, tais como estímulos inflamatórios, a proteína I-κB é fosforilada e degradada, resultando na dissociação do complexo I-κB-NFκB e translocação de NFκB no núcleo. Uma vez no núcleo, o NFκB reconhece sítios de intensificação específicos contendo o motivo de ligação do ADN de NFκB e interage com factores de transcrição basal para iniciar a transcrição mediada por ARN polimerase II em conjunção com a proteína de ligação à caixa TATA. Como mencionado acima, isto resulta na transcrição de uma vasta variedade de genes, particularmente genes envolvidos em resposta imunitárias e inflamatórias.

Como mencionado acima, a presente invenção baseia-se em parte na descoberta de proteínas do factor que induz o factor

nuclear κB (NFIF). Estas proteínas estão envolvidas na indução de NFκB. A descoberta destas proteínas NFIF proporciona diferentes abordagens para tratar estados que envolvem respostas inflamatórias reguladas por NFκB. As respostas inflamatórias reguladas por NFκB estão associadas a uma variedade do estado de doenças que incluem, mas não estão limitadas a, artrite reumatóide, aterosclerose, doenças autoimunes, doenças virais, gastropatia induzida por NSAID, doenças neurodegenerativas, scrapie, sepsia, apoptose, doença de Crohn, doença renal, restenose, lesão cerebral/inflamação, doença de Alzheimer, asma, e expressão de citocinas pleiotrópicas indevidamente regulada. Em situações nas quais é desejável aumentar a indução de NFκB para o objectivo de resultar numa resposta imunitária aumentada, as proteínas NFIF da presente invenção podem ser introduzidas em ou expressas num doente para induzir NFκB. Se, por outro lado, é desejável inibir a indução de NFκB de modo a inibir ou prevenir uma resposta imunitária, a condição de acordo com a presente invenção das sequências genéticas que codificam as proteínas NFIF e de como preparar estas proteínas pode ser utilizada para identificar compostos e composições que inibem ou previnem a expressão das proteínas NFTF ou que interagem com proteínas NFIF para inibir ou prevenir a sua actividade.

#### **Proteínas do Factor que induz o Factor Nuclear κB (NFIF)**

Os polipéptidos e proteínas aqui descritos incluem polipéptidos recombinantes, polipéptidos naturais ou polipéptidos sintéticos e podem ser de humano, coelho ou outras origens animais.

Os polipéptidos podem ser isolados a partir de fontes naturais, tais como extractos de placenta, plasma humano ou meios condicionados de células cultivadas utilizando processos de purificação conhecidos de um especialista na técnica.

Alternativamente, os polipéptidos da presente invenção podem ser preparados utilizando tecnologia de ADN recombinante que compreende combinar um ácido nucleico que codifica o seu polipéptido num vector adequado, inserindo o vector resultante numa célula hospedeira adequada, recuperando o polipéptido produzido pela célula hospedeira resultante e purificar o polipéptido recuperado.

Os polipéptidos são caracterizados por um peso molecular único reproduzível e/ou conjunto múltiplo de pesos moleculares, propriedades cromatográficas e perfis de eluição, composição e sequência de aminoácidos e actividade biológica.

**Isolamento de Sequências nucleótidicas que Codificam**  
**Polipéptidos NFIF**

As formas de realização NFIF-14b e NFIF-7a da presente invenção podem ser preparadas através de uma variedade de métodos adequados conhecidos dos especialistas na técnica. Os ensinamentos gerais em biologia molecular, microbiologia, e técnicas de ADN recombinante na especialidade da técnica são explicados na sua totalidade na literatura. Ver, e. g., Sambrook, Fritsch & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edição (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nova Iorque (aqui designado "Sambrook et al., 1989"); DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I e

II (D.N. Glover ed. 1985); F.M. Ausubel *et al.* (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. (1994).

As sequências de ADNc para NFIF-14b e NFIF-7a são apresentadas na Figura 3. NFIF-7a é uma variante de excisão de NFIF-14b. O termo "variante de excisão" refere-se a um polipéptido codificado por um ARNm produzido pelo processamento alternativo do ARNm de comprimento total codificado por um gene ou genes resultando num ARNm que contém uma ou mais deleções relativas ao ARNm de comprimento total para os genes. Como apresentado na Figura 4, em relação a NIFI-14b, NFIF-7a possui uma deleção interna de 473 a 739 pares de bases. Dada a informação na descrição aqui apresentada na sequência de ADN de NFIF-14b e NFIF-7a e os métodos conhecidos na técnica para obter ADNc, as sequências nucleótidas que codificam NFIF-14b e NFIF-7a podem ser prontamente clonadas e inseridas num vector apropriado para a expressão destas proteínas *in vitro* ou *in vivo*. Para uma descrição dos métodos relacionados com a clonagem de ADNc e vectores de expressão, ver Sambrook *et al.*, 1989, *supra*. Um "vector de clonagem" é um replicão, por exemplo, um plasmídeo, fago ou cosmídeo, ao qual outro segmento de ADN pode ser ligado de modo a realizar a replicação do segmento ligado. Um "replicão" é qualquer elemento genético (e. g., plasmídeo, cromossoma, vírus) que funciona como uma unidade autónoma de replicação de ADN *in vivo*, *i. e.*, capaz de replicação sob o seu próprio controlo. Um vector de clonagem pode ser capaz de replicação num tipo de célula e expressão noutra ("vector vaivém"). Em formas de realização preferida da presente invenção, o vector de clonagem é capaz de expressão numa célula hospedeira e o "vector de expressão" é capaz de expressar NFIF em níveis suficientes para realizar uma via regulada por NFκB na célula.

Um gene que codifica NFIF-14b e NFIF-7a, seja ADN genómico ou ADNc, pode ser isolado de uma biblioteca genómica humana ou biblioteca de ADNc. Uma "sequência codificante" de ADN é uma sequência de ADN de cadeia dupla que é transcrita e traduzida num polipéptido numa célula *in vitro* ou *in vivo* quando colocada sob o controlo de sequências reguladoras apropriadas. As sequências codificantes de ADN e as sequências reguladoras apropriadas são, de um modo preferido, proporcionadas num vector de expressão. As fronteiras da sequência codificante são determinadas por um codão de iniciação no terminal 5' (amino) e um codão de terminação de tradução no terminal 3' (carboxilo). Uma sequência codificante pode incluir, mas não está limitada a, sequências procarióticas, ADNc de ARNm eucariótico, sequências de ADN genómico de ADN eucariótico (e. g., mamífero) e, ainda, sequências de ADN sintético. Se a sequência codificante se destina à expressão numa célula eucariótica, um sinal de poliadenilação e sequência de terminação de transcrição estarão normalmente localizado a 3' da sequência codificante. Métodos para obter um gene dada a informação da sequência de ADN aqui apresentada são bem conhecidos na técnica. O ADN pode ser obtido por processos convencionais conhecidos na técnica a partir de ADN clonado (e. g., uma "biblioteca" de ADN). É obtido, de um modo preferido, de uma biblioteca de ADNc preparada a partir de tecidos com nível elevado de expressão da proteína. O ADN pode também ser obtido pela clonagem de ADN genómico ou seus fragmentos, purificados a partir da célula desejada (Ver, por exemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*; Glover, D.M. (ed.), 1985, ADN Cloning: A Practical Approach, MRL Press, Ltd., Oxford, R.U. Vol. I, II) ou por síntese química. Os clones derivados do ADN genómico podem conter regiões de ADN reguladoras e de intrão Além disso às regiões codificantes.

Métodos para obter ADNc são bem conhecidos na técnica. Resumidamente, estes métodos incluem isolar uma mistura de ARN mensageiro (ARNm) de células eucarióticas e empregando uma série de reacções enzimáticas para sintetizar cópias de ADN de cadeia dupla (ADNc) complementares aos ARNm isolados. A "Reacção em Cadeia pela Polimerase" (PCR) refere-se a métodos *in vitro* para amplificar sequências de ADN específico que utilizam técnicas bem conhecidas na técnica.

Independentemente do método utilizado para obter o ADNc desejado, a mistura de ADNc de cadeia dupla é inserida em veículos de clonagem através de qualquer uma de muitas técnicas conhecidas, dependendo, pelo menos em parte, do veículo particular utilizado. São discutidos vários métodos de inserção em Sambrook *et al.*, 1989, *supra* e são bem conhecidos na técnica. Uma "cassete" refere-se a um segmento de ADN que pode ser inserido num vector em um ou mais sítios de restrição específicos. O segmento de ADN codifica um polipeptídeo de interesse e a cassette e os sítios de restrição são designados para assegurar a inserção da cassette na grelha de leitura apropriada para transcrição e tradução.

Assim que os segmentos de ADN são inseridos num veículo de clonagem, o veículo de clonagem é utilizado para transformar um hospedeiro adequado. Uma célula foi "transflectada" por ADN exógeno ou heterólogo quando esse ADN foi introduzido para dentro da célula. Uma célula foi "transformada" por ADN exógeno ou heterólogo quando o ADN transflectado produz uma alteração fenotípica. O ADN transformante pode ser integrado (ligado covalentemente) no ADN cromossómico que constitui o genoma da célula. Estes veículos de clonagem normalmente transmitem uma característica de resistência a antibióticos no hospedeiro.

Esses hospedeiros são normalmente células procarióticas e apenas algumas das células hospedeiras contêm o ADNc desejado. As células hospedeiras transfectadas constituem uma "biblioteca" de genes, proporcionando uma amostra representativa dos ARNm presentes na célula a partir da qual os ARNm foram isolados.

Dada a informação de sequência nas NFEF-14b e NFIF-7a aqui proporcionadas, um oligonucleotídeo apropriado pode ser preparado, de um modo preferido, sintetizado como discutido acima, e utilizado para identificar clones contendo sequências de NFIF. O oligonucleotídeo inclui, de um modo preferido, pelo menos, cerca de 18 nucleotídos e é hibridável com uma molécula de ADN genómico, uma molécula de ADNc ou uma molécula de ARNm que codifica NFIF. Os oligonucleotídeos podem ser marcados, e. g., com  $^{32}\text{P}$ -nucleotídeos ou nucleotídeos aos quais foi conjugado covalentemente um marcador, tal como biotina.

Numa forma de realização, pode ser utilizado um oligonucleotídeo marcado como uma sonda para detectar a presença de um ácido nucleico que codifica NFIF. Noutra forma de realização, podem ser utilizados oligonucleotídeos (em que pode estar marcado um deles ou ambos) como iniciadores de PCR para clonar o comprimento total ou um fragmento de NFIF, ou para detectar a presença de ácidos nucleicos que codificam NFIF. Numa outra forma de realização, um oligonucleotídeo pode formar uma hélice tripla com uma molécula de ADN de NFIF.

De um modo geral, os oligonucleotídeos são preparados sinteticamente, de um modo preferido num sintetizador de ácidos nucleicos. Consequentemente, os oligonucleotídeos podem ser preparados com ligações análogas de fosfoéster que não ocorrem naturalmente, tais como ligações tioéster, etc. Para identificar

clones que contêm as sequências NFIF, são cultivadas células individuais transformadas ou transfectadas como colónias num papel de filtro de nitrocelulose. As colónias são lisadas e o ADN é fortemente ligado ao papel de filtro por aquecimento. O papel de filtro é então incubado com uma sonda de oligonucleótido marcado que é complementar a NFIF. Os fragmentos de ADN com homologia substancial a NFIF irão hibridar com a sonda.

Como discutido acima, as condições de temperatura e força iônica determinam a "restringência" da hibridação. A hibridação requer que os dois ácidos nucleicos contenham sequências complementares, embora dependendo da restringência da hibridação, são possíveis desemparelhamentos entre as bases. A restringência apropriada para hibridar ácidos nucleicos depende do comprimento dos ácidos nucleicos e do grau de complementação, variáveis bem conhecidas na técnica.

A sonda hibrida com o ADNc para o qual é complementar. Pode ser identificada por autorradiografia ou através de reacções químicas que identifiquem a presença da sonda. Os clones correspondentes são caracterizados de modo a identificar um ou uma combinação de clones que contêm toda a informação estrutural para a proteína desejada. A sequência de ácido nucleico que codifica para a proteína de interesse é isolada e reinserida num vector de expressão. O vector de expressão coloca o gene clonado sob o controlo regulador de elementos de controlo procariótico ou eucariótico específicos que permitem a expressão eficiente (transcrição e tradução) do ADNc de cadeia dupla. As sequências de controlo de transcrição e tradução são sequências reguladoras de ADN, tais como, por exemplo, promotores, intensificadores e terminadores que proporcionam a expressão de uma sequência

codificante numa célula hospedeira. Em células eucarióticas, os sinais de poliadenilação são sequências de controlo. Uma sequência codificante está “sob o controlo” de sequências de controlo de transcrição e tradução numa célula quando a polimerase de ARN transcreve a sequência codificante em ARNm, que é então excisada (se a sequência codificante contiver intrões) e traduzida na proteína codificada pela sequência codificante.

Pode ser realizada outra selecção, com base nas propriedades do gene. Por exemplo, a presença do gene desejado num clone pode ser detectada por ensaios baseados nas propriedades físicas, químicas ou imunológicas do seu produto proteico expresso. Por exemplo, podem ser seleccionados clones de ADNc ou clones de ADN que produznuma proteína que possui propriedades semelhantes ou idênticas às da NFIF em relação à migração electroforética, focagem isoeléctrica, electroforese em gel em condições de não equilíbrio de pH, digestão proteolítica, ou antigenicidade.

### **Preparação de Variantes de Polipéptidos NFIF**

A presente invenção descreve variantes alélicas, variantes mutantes por substituição, adição e deleção, análogos e derivados de NFIF e homólogos de outras espécies que possuem a mesma actividade funcional ou homóloga, de NFIF. Em formas de realização preferidas, são utilizados os genes que possuem deleções ou substituições que aumentem a capacidade para induzir NFkB. São descritas a preparação ou isolamento de variantes de NFIF. Consequentemente, a presente invenção descreve variantes de NFIF que são funcionalmente activas, *i. e.*, capazes de exibir uma ou mais actividades funcionais associadas com NFIF.

Podem ser preparadas variantes NFIF alterando que as sequências de ácido nucleico codificantes por substituições, adições ou deleções que proporcionam moléculas funcionalmente equivalentes. De um modo preferido, são realizadas formas de realização de NFIF que intensificaram ou aumentaram a actividade funcional relativa de NFIF-14b ou NFIF-7a.

Devido à degeneração de sequências nucleótidas codificantes, podem ser utilizadas outras sequências de ADN que codificam substancialmente a mesma sequência de aminoácidos que NFIF, incluindo uma sequência de aminoácidos que contém uma variante de um único aminoácido, na prática da presente invenção. Estas incluem, mas não estão limitadas a, genes alélicos, genes homólogos de outras espécies e sequências nucleótidas, compreendendo a totalidade ou porções de NFIF que são alteradas através da substituição de diferentes codões que codificam o mesmo resíduo de aminoácido na sequência, produzindo desse modo uma alteração silenciosa. De igual modo, as variantes de NFIF da invenção incluem, mas não estão limitadas a, àquelas que contêm, como uma sequência de aminoácidos primária, a totalidade ou parte da sequência de aminoácidos de uma proteína NFIF que inclui sequências alteradas nas quais os resíduos de aminoácidos funcionalmente equivalentes são substituídos por resíduos na sequência que resulta numa substituição de aminoácidos conservadora. Por exemplo, um ou mais resíduos de aminoácidos na sequência podem ser substituídos por outro aminoácido de uma polaridade semelhante que actua como um equivalente funcional, que resulta numa alteração silenciosa. Os substitutos para um aminoácido na sequência podem ser seleccionados de outros membros da classe à qual o aminoácido pertence. Por exemplo, os aminoácidos não polares (hidrofóbicos) incluem alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina,

fenilalanina, triptofano e metionina. Aminoácidos que contêm estruturas aromáticas em anel são fenilalanina, triptofano e tirosina. Os aminoácidos polares neutros incluem glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, e glutamina. Os aminoácidos carregados positivamente (básicos) incluem arginina, lisina e histidina. Os aminoácidos carregados negativamente (acídicos) incluem ácido aspártico e ácido glutâmico. Não é esperado que essas alterações afectem um peso molecular aparente como determinado por electroforese em gel de poliacrilamida ou ponto isoeléctrico.

Substituições particularmente preferidas são:

- Lys por Arg e vice-versa, de modo a que seja mantida uma carga positiva;
- Glu por Asp e vice-versa, de modo a que seja mantida uma carga negativa;
- Ser por Thr, de modo a que seja mantido um -OH livre; e
- Gln por Asn, de modo a que possa ser mantido um CONH<sub>2</sub> livre.

As substituições de aminoácidos também podem ser introduzidas para substituir um aminoácido com uma propriedade particularmente preferida. Por exemplo, podem ser introduzido um Cys como um sítio potencial para ligações persulfureto com outro Cys. Pode ser introduzido um His como um sítio particularmente "catalítico" (*i. e.*, His pode actuar como um ácido ou base e é o aminoácido mais comum na catálise bioquímica). Pro pode ser introduzida devido à sua estrutura particularmente plana, que induz voltas β na estrutura da proteína.

Os genes que codificam as variantes NFIF podem ser produzidos por vários métodos conhecidos na técnica. As manipulações que resultam na sua produção podem ocorrer ao nível do gene ou da proteína. Por exemplo, a sequência do gene NFIF clonado pode ser modificada por qualquer uma de numerosas estratégias conhecidas na técnica (Sambrook et al., 1989, *supra*). A sequência pode ser clivada em sítios apropriados com endonuclease(s) de restrição, seguido por outra modificação enzimática, se desejado, isolada e ligada *in vitro*. Na produção do gene que codifica uma forma de realização de NFIF, deve ser tomado cuidado para assegurar que o gene modificado permanece na mesma grelha de leitura de tradução como o gene NFIF, não interrompida por sinais de terminação de tradução na região do gene onde a actividade desejada é codificada.

Além disso, a sequência de ácido nucleico que codifica NFIF pode ser mutada *in vitro* ou *in vivo* para criar e/ou destruir sequências de tradução, iniciação e/ou terminação, ou para criar variações em regiões codificantes e/ou a partir de novos sítios de endonuclease de restrição ou destruir sítios pré-existentes, para facilitar outra modificação *in vitro*. De um modo preferido, essas mutações intensificam a actividade funcional do produto do gene NFIF mutado. Qualquer técnica para mutagénese conhecida na técnica pode ser utilizada, por exemplo, mutagénese dirigida *in vitro* (Hutchinson, C., et al., 1978, *J. Biol. Chem.* 253:6551; Zoller e Smith, 1984, *DNA* 3:479-488; Oliphant et al., 1986, *Gene* 44:177; Hutchinson et al., 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:710), e utilização de ligantes "TAB" (Pharmacia), etc. As técnicas de PCR são preferidas para mutagénese dirigida (ver Higuchi, 1989, "Using PCR to Engineer DNA", em *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*. H. Erlich, ed., Stockton Press, Capítulo 6, pp. 61-70).

## **Polipéptidos Baseados em NFIF**

Uma variante terapeuticamente útil de NFIF pode ser identificada por uma variedade de métodos, incluindo ensaios *in vitro* que podem ser utilizados para identificar o nível de expressão de um gene regulado por NF $\kappa$ B ou um gene cuja expressão é regulada por elementos reguladores de NF $\kappa$ B na presença da variante de NFIF. Um método para identificar polipeptídos que são capazes de intensificar (ou inibir) a indução de NF $\kappa$ B é utilizar um sistema de gene repórter. Estes sistemas utilizam vectores de expressão de gene repórter que incluem um sítio de clonagem em que um dado promotor pode ser克lonado a montante de um "gene repórter" que pode ser facilmente detectado e quantificado. Um especialista na técnica pode identificar rapidamente e subclonar o promotor para NF $\kappa$ B, assim como outras sequências de controlo num vector de expressão de gene repórter comercialmente disponível. O vector de expressão é transferido para células hospedeiras e as células são expostas a uma variante de NFIF (ou um inibidor putativo ou molécula intensificadora) para determinar o efeito na expressão do produto do gene repórter. Em particular, as células são ensaiadas quanto à presença do produto do gene repórter directamente pela medição da quantidade de ARNm repórter, a própria proteína repórter ou a actividade enzimática da proteína repórter. Idealmente, o gene repórter não é expresso endogenamente no tipo de célula de interesse e torna-se ele próprio adequado a ensaios sensíveis, quantitativos e rápidos. Está disponível comercialmente uma variedade de construções de ensaio de repórter e foram desenvolvidos vários genes repórter e ensaios e podem ser rapidamente preparados pelo especialista na técnica. Os sistemas mais populares para monitorizar a actividade genética em células eucarióticas incluem

cloranfenicol acetiltransferase (CAT),  $\beta$ -galactosidase, luciferase de pirilampo, hormona de crescimento (GH),  $\beta$ -glucurorudase (GUS), fosfatase alcalina (AP), proteína fluorescente verde (GFP) e luciferase de *Renilla*. Construções de ensaio de repórter podem ser adquiridas a partir de uma variedade de fontes incluindo Promega e Invitrogen.

Como mencionado acima, a actividade do gene repórter pode ser detectada ensaiando o ARNm repórter ou a proteína repórter. O ARNm repórter pode ser detectado através de análise de transferência de northern, ensaios de protecção de ribonuclease ou RT-PCR. Embora estes ensaios sejam mais directos do que medir a expressão da proteína, foram desenvolvidos muitos ensaios para medir a presença da proteína repórter em vez do ARNm presente numa célula. As proteínas repórter podem ser ensaiadas por espectrofotometria ou pela detecção da actividade enzimática. Os níveis da proteína repórter podem também ser medidos com ensaios à base de anticorpo. Em geral, os ensaios enzimáticos são muito sensíveis e são um método preferido de monitorizar a expressão do gene repórter. Uma construção de gene repórter NF $\kappa$ B preferida comercialmente disponível é o vector do gene repórter pNF $\kappa$ B-Luc (luciferase) disponível na Stratagene. Um exemplo de como utilizar este sistema repórter para quantificar a actividade da proteína NFIF é proporcionado no Exemplo 4.

Experiências do tipo aqui discutido acima podem ser utilizada para determinar o quão bem um determinado estado de doença pode ser tratado utilizando as composições da presente invenção.

A discussão que se segue refere-se à manipulação e expressão de ADN que codifica os polipéptidos da presente invenção.

### **Vectores de Expressão Que Codificam Polipeptídos NFIF**

A sequência de ADN identificada e isolada pode ser inserida num vector de clonagem/expressão apropriado (de aqui em diante denominado "vector") para facilitar as modificações da sequência ou expressão da proteína. Estes vectores incluem tipicamente sítios de clonagem múltiplos, promotores, sequências que facilitam a replicação numa célula hospedeira e marcadores de selecção.

Pode ser utilizado qualquer vector adequado. São conhecidos na técnica muitos exemplos de vectores que podem ser utilizados incluem, por exemplo, plasmídeos ou vírus modificados. O vector é tipicamente compatível com uma determinada célula hospedeira na qual o vector é introduzido para facilitar a replicação do vector e a expressão das proteínas codificadas. A inserção de uma sequência ADN num determinado vector pode, por exemplo, ser realizada ligando o fragmento de ADN num vector de clonagem que possui terminais coesivos complementares. Todavia, se os sítios de restrição complementares utilizados para cortar o ADN não estão presentes no vector de clonagem, as extremidades das moléculas de ADN podem ser modificadas enzimaticamente. Alternativamente, pode ser produzido qualquer sítio desejado através da ligação de sequências nucleótidas (ligantes) nos terminais do ADN; os ligantes ligados podem compreender oligonucleótidos específicos sintetizados quimicamente que codificam sequências de reconhecimento de endonucleases de restrição. Vectores úteis podem consistir em segmentos de sequências de ADN cromossómico, não cromossómico e sintético. Exemplos de vectores específicos úteis na prática da presente invenção são bacteriófagos de *E. coli*, por exemplo, derivados de lambda ou plasmídeos, por exemplo, derivados de pBR322 ou

derivados de plasmídeos de pUC, e. g., pmal-c, pFLAG, derivados de SV40 e plasmídeos bacterianos conhecidos, e. g., plasmídeos de *E. coli* col El, pCR1, pMal-C2, pET, pGEX (Smith et al., 1988, *Gene* 67:31-40), pMB9 e seus derivados, plasmídeos, tais como RP4; ADN de fagos, e. g., os numerosos derivados de fago 1, e. g., NM989 e ADN de outros fagos, e. g., M13 e ADN de fago filamentoso de cadeia simples; vectores de levedura, tais como o plasmídeo 2 µm ou seus derivados; vectores úteis em células eucarióticas, por exemplo, vectores úteis em células de insectos, tais como vectores baculovírus, vectores úteis em células de mamíferos; vectores derivados de combinações de ADN de plasmídeos e fagos, plasmídeos que foram modificados para empregar o ADN de fago ou outras sequências de controlo de expressão; e semelhantes.

Exemplos de vectores de leveduras que podem ser utilizados de acordo com a invenção são o vector de não fusão pYES2 (Invitrogen) ou os pYESHisA, B, C de fusão (Invitrogen).

Vectores de baculovírus que podem ser utilizados na prática da invenção incluem uma variedade de vectores, incluindo ambos os vectores de transferência de não fusão, por exemplo, pVL941 (Summers), pVL1393 (Invitrogen), pVL1392 (Summers e Invitrogen), e pBlueBacIII (Invitrogen) e vectores de transferência de fusão, por exemplo, pAc700 (Summers), pAc701 e pAc702, pAc360 (Invitrogen) e pBlueBacHisA, B, C (Invitrogen) podem ser utilizados.

Vectores de mamíferos contemplados para utilização na invenção incluem, por exemplo, vectores com promotores inducíveis, por exemplo, o promotor da di-hidrofolato redutase (DHFR), e. g., qualquer vector de expressão com um vector de

expressão de DHFR ou um vector de co-amplificação de DHFR/metotrexato, por exemplo, pED (ver Kaufman, Current Protocols in Molecular Biology, 16.12 (1991)). Alternativamente, um vector de co-amplificação de glutamina sintetase/metionina sulfoximina, por exemplo, pEE14 (Celltech). Noutra forma de realização, pode ser utilizado um vector que dirige a expressão epissómica sob controlo do vírus Epstein Barr (EBV), por exemplo, pREP4 (Invitrogen), pCEP4 (Invitrogen), pMEP4 (Invitrogen), pREP8 (Invitrogen), pREP9 (Invitrogen) e pEBVHis (Invitrogen). Vectores de expressão de mamíferos seleccionáveis para utilização na invenção incluem pRc/CMV (Invitrogen), pRc/RSV (Invitrogen), pADNc3 (Invitrogen) e outros. Vectores de expressão do vírus de mamíferos Vaccinia (ver, Kaufman, 1991, *supra*) para utilização de acordo com a invenção incluem, mas não estão limitadas a pSC11, pMJ601 e pTKgptF1S.

Podem ser utilizados uma variedade de métodos para confirmar que a sequência de ADN desejada que codificam NFIF-14b, NFIF-7a, ou outra variante de NFIF, foi clonada num vector. Em geral, é utilizada uma ou mais das seguintes abordagens: (a) amplificação por PCR do ADN do plasmídeo desejado ou ARNm específico, (b) hibridação de ácido nucleico, (c) presença ou ausência de funções do gene marcador de seleção, (d) análises com endonucleases de restrição apropriadas, e (e) expressão das sequências inseridas. Na primeira abordagem, os ácidos nucleicos podem ser amplificados por PCR para proporcionar a detecção do produto amplificado. Na segunda abordagem, a presença de um gene estranho inserido num vector de expressão pode ser detectado por hibridação de ácido nucleico utilizando sondas compreendendo sequências que são homólogas a um gene marcador inserido. Na terceira abordagem, o sistema vector/hospedeiro recombinante pode ser identificado e seleccionado com base na presença ou

ausência de certas funções do gene "marcador de selecção" (e. g., actividade de  $\beta$ -galactosidase, actividade de cinase de timidina, resistência a antibióticos, transformação do fenótipo, formação de corpo de oclusão em baculovírus, etc.) provocada pela inserção de genes estranhos no vector. Noutro exemplo, se o ácido nucleico que codifica NFIF é inserido na sequência do gene do "marcador de selecção" do vector, os recombinantes que contêm a inserção de NFIF podem ser identificado pela ausência da função do gene marcador de selecção. Na quarta abordagem, os vectores de expressão recombinantes são identificados por digestão com enzimas de restrição apropriadas. Na quinta abordagem, os vectores de expressão recombinante podem ser identificados por ensaio da actividade, características bioquímicas ou imunológicas do produto do gene expresso pelo recombinante, desde que a proteína expressa assuma uma conformação funcionalmente activa.

### **Promotores**

A sequência nucleótídica que codifica para NFIF-14b ou NFIF-7a ou uma sua variante de NFIF pode ser inserida num vector de expressão que contém os elementos necessários para a transcrição e tradução da sequência que codifica a proteína inserida. Esses elementos são aqui denominados um "promotor".

Um promotor é uma região reguladora de ADN capaz de ligar a ARN polimerase numa célula e iniciando a transcrição de uma sequência codificante a jusante (direcção 3'). Para os objectivos de definir a presente invenção, a sequência do promotor está ligada no seu terminal 3' pelo sítio de iniciação de transcrição e se estende a montante (direcção 5') para

incluir o número mínimo de bases ou elementos necessários para iniciar a transcrição em níveis detectáveis acima do fundo. Na sequência do promotor será encontrado um sítio de iniciação de transcrição (definido convenientemente, por exemplo, por mapeamento com nuclease S1), assim como domínios de ligação de proteína (sequências de consenso) responsáveis pela ligação da ligação da ARN polimerase.

O ácido nucleico que codifica os polipéptidos da invenção está associado operacionalmente com um promotor num vector de expressão da invenção. Ambas as sequências de ADNc e genómicas podem ser clonadas e expressas sob controlo dessas sequências reguladoras. Um vector de expressão, inclui, também de um modo preferido, uma origem de replicação. Os sinais de transcrição e tradução necessários podem ser proporcionados num vector de expressão recombinante ou eles podem ser fornecidos pelo gene nativo que codifica NFIF e/ou as suas regiões flanqueadoras. Qualquer um dos métodos previamente descritos pela inserção de fragmentos de ADN num vector de clonagem podem ser utilizados para construir vectores de expressão contendo um gene que consiste em sinais de controlo de transcrição/tradução apropriados e as sequências que codificam a proteína. Estes métodos podem incluir técnicas *in vitro* de ADN recombinante e sintéticos e recombinação *in vivo* (recombinação genética).

A expressão pode ser controlada através de qualquer elemento promotor/intensificador conhecido na técnica, mas estes elementos reguladores devem ser funcionais no hospedeiro seleccionado para expressão. Exemplos de promotores que podem ser utilizados para controlar a expressão do gene NFIF incluem a região do promotor precoce de SV40 (Benoist e Chambon, 1981, *Nature* 290:304-310), o promotor contido na repetição terminal

longa de 3' do vírus do sarcoma de Rous (Yamamoto, et al., 1980, *Cell* 22:787-797), o promotor da cinase da timidina de herpes (Wagner et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1441-1445), as sequências reguladoras do gene da metalotioneína (Brinster et al., 1982, *Nature* 296:39-42); vectores de expressão procarióticos por exemplo, o promotor da  $\beta$ -lactamase (Villa-Kamaroff, et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75:3727-3731), ou o promotor tac (DeBoer, et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80:21-25); elementos de promotor de leveduras ou outros fungos, por exemplo, o promotor Gal 4, o promotor de ADC (álcool desidrogenase), promotor de PGK (fosfoglicerol cinase), promotor da fosfatase alcalina; e as regiões de controlo de transcrição animal, que apresentam especificidade para o tecido e têm sido utilizadas em animais transgénicos: região de controlo do gene da elastase I que está activo em células acinares pancreáticas (Swift et al., 1984, *Cell* 38:639-646; Ornitz et al., 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 50:399-409; MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515); região de controlo do gene da insulina que está activo em células pancreáticas beta (Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-122), região de controlo do gene da imunoglobulina que está activa em células linfóides (Grosschedl et al., 1984, *Cell* 38:647-658; Adames et al., 1985, *Nature* 318:533-538; Alexander et al., 1987, *Mol. Cell. Biol.*, 7:1436-1444), região de controlo do vírus do tumor mamário de murganho que está activa em células testiculares, da mama, linfóides e mastócitos (Leder et al., 1986, *Cell* 45:485-495), região de controlo do gene da albumina que está activa no fígado (Pinkert et al., 1987, *Genes and Devel.* 1:268-276), região de controlo do gene da alfa-fetoproteína que está activa no fígado (Krumlauf et al., 1985, *Mol. Cell. Biol.*, 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, *Science* 235:53-58), região de controlo do gene da alfa 1-

antitripsina que está activa no fígado (Kelsey et al., 1987, *Genes and Devel.*, 1:161-171), região de controlo do gene da beta-globina que está activa em células mielóides (Mogram et al., 1985, *Nature* 315:338-340; Kollias et al., 1986, *Cell* 46:89-94), região de controlo do gene da proteína básica da mielina que está activa em células de oligodendrócitos no cérebro (Readhead et al., 1987, *Cell* 48:703-712), região de controlo do gene da cadeia-2 leve da miosina que está activa no músculo esquelético (Sani, 1985, *Nature* 314:283-286) e região de controlo do gene da hormona de libertação gonadotrópica que está activa no hipotálamo (Mason et al., 1986, *Science* 234:1372-1378).

Um promotor preferido utilizado nas construções do vector de expressão aqui discutido abaixo é o promotor do citomegalovírus (CMV) que é capaz de proporcionar nível elevado de expressão numa variedade de linhas celulares de mamíferos.

### **Introdução de Vectores em Células Hospedeiras**

Os vectores podem ser introduzidos em células hospedeiras através de qualquer método adequado, incluindo, e. g., transfecção, electroporação, microinjecção, transdução, fusão celular, DEAE dextrano, precipitação com fosfato de cálcio, lipofecção (fusão de lisossomas), utilização de uma pistola de genes ou um transportador de vector de ADN (ver, e. g., Wu et al., 1992, *J. Biol. Chem.* 267:963-967; Wu e Wu, 1988, *J. Biol. Chem.* 263:14621-14624; Hartmut et al., Pedido de Patente Canadiana Nº 2012311, apresentada em 15 de Março de 1990) de modo que são criadas muitas cópias da sequência do gene. Num método preferido, as células são transfectadas *in vitro*

utilizando Lipfectamine® disponível em Gibco-BRL. De um modo preferido, o gene clonado está contido num vector plasmídico de vaivém, que proporciona a expansão numa célula de clonagem, e. g., *E. coli*, e facilita a purificação para a subsequente inserção numa linha celular de expressão apropriada. Por exemplo, um vector de vaivém, que é um vector que pode replicar em mais do que um tipo de organismo, pode ser preparado para replicação em *E. coli* e *Saccharomyces cerevisiae* através de sequências de ligação de um plasmídeo de *E. coli* com sequências do plasmídeo de levedura 2  $\mu\text{m}$ .

### **Sistemas de Células Hospedeira**

Sistemas de células hospedeiras incluem sistemas de células hospedeiras de mamíferos, sistemas de células hospedeiras de insectos e microrganismos, tais como leveduras ou bactérias. Dependendo do sistema de células hospedeiras utilizado, pode ser utilizado qualquer um de vários elementos de transcrição e tradução adequados.

Além disso, pode ser seleccionada uma estirpe de células hospedeiras que modula a expressão das sequências inseridas ou modifica e processa o produto do gene de um modo desejado específico. Diferentes células hospedeiras possuem mecanismos característicos e específicos para o processamento de tradução e pós-tradução e modificação de proteínas. Linhas celulares apropriadas ou sistemas de hospedeiros podem ser seleccionados para assegurar a modificação e processamento desejados da proteína estranha expressa. A expressão em leveduras pode produzir um produto biologicamente activo. A expressão nas células eucarióticas pode aumentar a probabilidade de dobragem

"nativa". Além disso, a expressão em células de mamíferos pode proporcionar uma ferramenta para a reconstituição, ou constituição, de actividade de inibição de NFIF. Além disso, diferentes sistemas de expressão vector/hospedeiro pode afectar reacções de processamento, tais como clivagens proteolíticas, numa extensão diferente. Podem ser utilizados vectores de expressão da invenção, como referido acima, tanto para transfectar células para o rastreio ou testes biológicos de moduladores da actividade de NFIF.

Exemplos de células hospedeiras de mamíferos aceitáveis são células HEK 293 e células COS-7.

Uma NFIF-14b recombinante, ou NFIF-7a da invenção ou variante de NFIF pode ser expressa a nível de cromossoma, após integração da sequência codificante por recombinação. A este respeito, pode ser utilizado qualquer um dos sistemas de amplificação para atingir níveis elevados de expressão génica estável (Ver Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

A célula na qual o vector recombinante que comprehende o ácido nucleico que codifica NFIF é introduzido é cultivada num meio de cultura de células apropriada em condições que proporcionam a expressão de um polipeptído NFIF pela célula.

Uma vez estabelecido um sistema hospedeiro adequado e condições de crescimento, os vectores de expressão recombinante podem ser propagados e preparados em quantidade. Formas solúveis da proteína podem ser obtidas através de recolha de fluido de cultura ou corpos de inclusão de solubilização, e. g., por tratamento com detergente e, se desejado, sonicação ou outros processos mecânicos, como descrito acima. A proteína

solubilizada ou solúvel pode ser isolada utilizando várias técnicas, incluindo electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), focagem isoeléctrica, electroforese em gel a 2 dimensões, cromatografia (e.g., permuta iónica, afinidade, imunoafinidade e cromatografia em coluna em função do tamanho), centrifugação, solubilidade diferencial, imunoprecipitação ou através de qualquer outra técnica convencional para a purificação de proteínas.

Como discutido acima, um "vector" é qualquer meio para a transferência de um ácido nucleico de acordo com a invenção numa célula hospedeira. Os vectores preferidos são vectores virais, por exemplo, retrovírus, herpes vírus, adenovírus e vírus adenoassociados. Assim, um gene que codifica uma proteína ou fragmento do domínio de polipeptído é introduzido *in vivo*, *ex vivo* ou *in vitro* utilizando um vector viral ou através da introdução directa de ADN. A expressão em tecidos direcionados pode ser realizada direcionando o vector transgénico para células específicas, tal como com um vector viral ou um ligando receptor, ou utilizando um promotor específico para o tecido, ou ambos.

A discussão que se segue delineia vários sistemas virais e não virais que podem ser utilizados para introduzir ADN para uma célula hospedeira *in vivo* ou *in vitro*.

### **Sistemas de Vector Viral**

Os polipeptídos NFIF, assim como os ácidos nucleicos anti-sentido, ribozimas e anticorpos aqui discutidos abaixo podem ser preparados *in vitro* ou *ex vivo* ou podem ser concebidos

para serem expressos *in vivo* num doente utilizando um sistema de expressão apropriado introduzido através de um sistema de vector viral.

Os vectores virais normalmente utilizados para direcccionamento *in vivo* ou *ex vivo* e processos de terapia são vectores à base de ADN e vectores retrovirais. São conhecidos na técnica métodos para construir e utilizar vectores virais [ver, e. g., Miller e Rosman; *BioTechniques* 7:980-990 (1992)]. De um modo preferido, os vectores virais são deficientes na replicação, isto é, são incapazes de replicar autonomamente na célula alvo. Em geral, o genoma dos vectores virais deficientes para a replicação que são utilizados dentro do âmbito da presente invenção não tem, pelo menos, uma região que é necessária para a replicação do vírus na célula infectada. Estas regiões podem ser eliminadas (na totalidade ou em parte) ou ser tornadas não funcionais através de qualquer técnica conhecida de um especialista na técnica. Estas técnicas incluem a remoção total, substituição (por outras sequências, em particular pelo ácido nucleico inserido), deleção parcial ou adição de uma ou mais bases para uma região essencial (para replicação). Essas técnicas podem ser realizadas *in vitro* (no ADN isolado) ou *in situ*, utilizando as técnicas de manipulação genética ou por tratamento com agentes mutagénicos. De um modo preferido, o vírus de replicação deficiente retém as sequências do seu genoma que são necessárias para encapsular as partículas virais.

Vectores virais de ADN incluem um vírus de ADN atenuado ou deficiente, tal como, mas não limitado a vírus herpes simplex (HSV), papilomavírus, vírus Epstein Barr (EBV), adenovírus, vírus adeno-associados (AAV), vírus vaccinia e semelhantes. São preferidos os vírus deficientes, aos quais falta inteiramente ou

quase inteiramente genes virais. O vírus deficiente não é competente para replicação após introdução numa célula e, por isso, não conduz a uma infecção viral produtiva. A utilização de vectores virais deficientes permite a administração às células numa área específica, localizada, sem a preocupação de que o vector pode infectar outras células. Assim, pode ser especificamente direcionado um tecido específico. Exemplos de vectores particulares incluem, mas não estão limitadas a, um vector de vírus herpes 1 (HSV1) deficiente (Kaplitt et al., *Molec. Cell. Neurosci.* 2:320-330 (1991)), vector de vírus herpes deficiente sem um gene de glicoproteína L (Publicação de Patente RD 371005 A) ou outros vectores de vírus herpes deficientes (Publicação de Patente Internacional Nº WO 94/21807, publicada em 29 de Setembro de 1994; Publicação de Patente Internacional Nº. WO 92/05263, publicada em 2 de Abril de 1994); um vector de adenovírus atenuado, tal como o vector descrito por Stratford-Perricaudet et al. (*J. Clin. Invest.* 90:626-630 (1992); ver também La Salle et al., *Science* 259:988-990 (1993)); e um vector de vírus adeno-associado deficiente (Samulski et al., *J. Virol.* 61:3096-3101 (1987); Samulski et al., *J. Virol.* 63:3822-3828 (1989); Lebkowski et al., *Mol. Cell. Biol.* 8:3988-3996 (1988)])

De um modo preferido, para administração *in vivo*, é empregue um tratamento imunossupressor apropriado em conjugação com o vector viral, e. g., vector de adenovírus, para evitar a imuno-desactivação do vector viral e células transfectadas. Por exemplo, podem ser administradas citocinas imunossupressoras, tais como interleucina-12 (IL-12), interferão-γ (IFN-γ) ou anticorpo anti-CD4, para bloquear as respostas eucarióticas humorais ou celulares dos vectores virais. Além disso, é vantajoso empregar um vector viral que é modificado para expressar um número mínimo de抗énios.

Naturalmente, está contemplada a distribuição de um vector que irá expressar uma quantidade terapeuticamente eficaz de NFIF para aplicações de terapia génica. A frase "quantidade terapeuticamente eficaz" é aqui utilizada para significar uma quantidade suficiente para provocar um melhoramento num estado clinicamente significativo no hospedeiro.

### **Sistemas de Vector de Adenovírus**

Numa forma de realização preferida, o vector é um vector de adenovírus. Os adenovírus são vírus de ADN de eucariotas que podem ser modificados para distribuir eficientemente um ácido nucleico da invenção a uma variedade de tipos de células. Existem vários serotipos de adenovírus. Destes serotipos, é dada preferência, dentro do âmbito da presente invenção, à utilização de adenovírus humanos de tipo 2 ou tipo 5 (Ad 2 ou Ad 5) ou adenovírus de origem animal (ver documento WO94/26914). Estes adenovírus de origem animal que podem ser utilizados dentro do âmbito da presente invenção incluem adenovírus de origem canina, bovina, murina (exemplo: MavI, Beard et al., *Virology* 75 (1990) 81), bovina, porcina, aviária e símia (exemplo: SAV).

De um modo preferido, os vectores adenovirais de replicação deficiente da invenção compreendem as ITR, uma sequência de encapsidação e o ácido nucleico de interesse. De um modo ainda mais preferido,, pelo menos, a região E1 do vector adenoviral não é funcional. A deleção na região E1 estende-se, de um modo preferido, do nucleótido 455 ao 3329 na sequência do adenovírus Ad5 (fragmento *Pvu*II-*Bgl*III) ou do 382 ao 3446 (fragmento *Hinf*II-*Sau*3A). Também podem ser modificadas outras regiões, em particular a região E3 (documento WO95/02697), a região E2

(documento WO94/28938), a região E4 (documentos WO94/28152, WO94/12649 e WO95/02697) ou em qualquer um dos genes tardios L1-L5.

Numa forma de realização preferida, o vector adenoviral possui uma deleção na região E1 (Ad 1.0). Exemplos de adenovírus com E1 eliminado são revelados no documento EP 185573. Noutra forma de realização preferida, o vector adenoviral possui uma deleção nas regiões E1 e E4 (Ad 3.0). Exemplos de adenovírus com E1/E4 eliminados são divulgados nos documentos WO95/02697 e WO96/22378. Ainda noutra forma de realização preferida, o vector adenoviral possui uma deleção na região E1 na qual a região E4 e a sequência de ácido nucleico são inseridas (ver documento FR94 13355).

O adenovírus recombinante de replicação deficiente de acordo com a invenção pode ser preparado por qualquer técnica conhecida de um especialista na técnica (Levrero et al., *Gene* 101 (1991) 195, documento EP 185573; Graham, *EMBO J.* 3 (1984) 2917). Em particular, eles podem ser preparados por recombinação homóloga entre um adenovírus e um plasmídeo que comporta, *inter alia*, a sequência de ADN de interesse. A recombinação homóloga é realizada após co-transfecção do adenovírus e do plasmídeo numa linha celular apropriada. A linha celular que é empregue deve, de um modo preferido, (i) ser transformável pelos referidos elementos e (ii) conter as sequências que são capazes de complementar a parte do genoma da replicação do adenovírus deficiente, de um modo preferido, de forma integrada de modo a evitar os riscos de recombinação. Exemplos de linhas celulares que podem ser utilizados são a linha celular de rim embrionário humano 293 (Graham et al., *J. Gen. Virol.* 36 (1977) 59) que contém a porção da esquerda do genoma de um adenovírus Ad5 (12%)

integrada no seu genoma e linhas celulares que são capazes de complementar as funções E1 e E4, como descrito nos pedidos WO94/26914 e WO95/02697. Os adenovírus recombinantes são recuperados e purificados utilizando técnicas de biologia molecular convencionais, que são bem conhecidas de um especialista na técnica.

### **Sistemas de Vector de Vírus Adeno-Associados**

Os vírus adeno-associados (AAV) são vírus de ADN de tamanho relativamente pequeno que podem integrar, de uma forma estável e específica para o sítio, no genoma de células que estes infectam. Estes são capazes de infectar um vasto espectro de células sem induzir quaisquer efeitos no crescimento celular, morfologia ou diferenciação, e estes não parecem estar envolvidos em patologias humanas. O genoma de AAV foi clonado, sequenciado e caracterizado. Inclui aproximadamente 4700 bases e contém uma região de repetição terminal invertida (ITR) de aproximadamente 145 bases em cada extremidade, que serve como uma origem de replicação para o vírus. O restante do genoma é está dividido em duas regiões essenciais que comportam as funções de encapsulação: a parte esquerda do genoma, que contém o gene rep envolvido na replicação viral e expressão dos genes virais; e a parte direita do genoma, que contém o gene cap que codifica as proteínas da cápside do vírus.

A utilização de vectores derivados dos AAV para transferir genes *in vitro* e *in vivo* foi descrita (ver documentos WO 91/18088; WO 93/09239; US 4797368, US 5139941, EP 488528). Estas publicações descrevem várias construções derivadas de AAV em que os genes rep e/ou cap são removidos e substituídos por um

gene de interesse, e a utilização destas construções para transferir o gene de interesse *in vitro* (em células em cultura) ou *in vivo*, (directamente num organismo). Os AAV recombinantes deficientes na replicação de acordo com a invenção podem ser preparados por cotransfecção de um plasmídeo contendo a sequência de ácido nucleico de interesse flanqueada por duas regiões de repetição terminal invertida (ITR) de AAV e um plasmídeo que comporta os genes de encapsulação de AAV (genes rep e cap), numa linha celular que é infectada com um vírus auxiliar humano (por exemplo um adenovírus). Os AAV recombinantes que são produzidos são depois purificados por técnicas convencionais.

É deste modo também descrito um vírus recombinante derivado de AAV cujo genoma inclui uma sequência que codifica um ácido nucleico que codifica NFIF ou seus variantes flanqueados pelas ITR de AAV. A invenção também se refere a um plasmídeo que inclui uma sequência que codifica um ácido nucleico que codifica NFIF ou suas variantes, flanqueada por duas ITR de um AAV. Tal plasmídeo pode ser utilizado como está, porque é para transferir as sequências de ácido nucleico, com o plasmídeo, sempre que apropriado, a ser incorporado num vector lipossómico (pseudovírus).

### **Sistemas de Vector de Retrovírus**

Em outra forma de realização o gene pode ser introduzido num vector retroviral, e. g., como descrito em Anderson *et al.*, Patente U.S. Nº 5399346; Mann *et al.*, 1983, *Cell* 33:153; Temin *et al.*, Patente U.S. Nº 4650764; Temin *et al.*, Patente U.S. Nº 4980289; Markowitz *et al.*, 1988, *J. Virol.* 62:1120; Temin

et al., Patente U.S. Nº 5 124 263; EP 453242, EP178220; Bernstein et al. Genet. Eng. 7 (1985) 235; McCormick, BioTechnology 3 (1985) 689; Pedido de Patente Internacional Nº WO 95/07358, publicado em 16 de Março de 1995, por Dougherty et al.; e Kuo et al., 1993, Blood 82:845. Os retrovírus são vírus integrativos que infectam células em divisão. O genoma de retrovírus inclui duas LTR, uma sequência de encapsulação e três regiões codificantes (*gag*, *pol* e *env*). Em vectores retrovirais recombinantes, os genes *gag*, *pol* e *env* são geralmente removidos; no seu todo ou em parte, e substituídos com uma sequência de ácido nucleico heterólogo de interesse. Estes vectores podem ser construídos a partir de diferentes tipos de retrovírus, tais como, HIV, MoMuLV ("vírus da leucemia de Moloney de murino", MSV ("vírus do sarcoma de Moloney de murino"), HaSV ("vírus do sarcoma de Harvey"); SNV ("vírus da necrose do baço"); RSV ("vírus do sarcoma de Rous") e vírus Friend. Os vectores retrovirais deficientes são divulgados no documento WO95/02697.

Em geral, de modo a construir retrovírus recombinantes contendo uma sequência de ácido nucleico, é construído um plasmídeo que contém as LTR, a sequência de encapsulação e a sequência de codificação. Esta construção é utilizada para transfectar uma linha celular de empacotamento, linha celular que é capaz de suprir em trans as funções retrovirais que são deficientes no plasmídeo. Em geral, as linhas celulares de empacotamento são, neste modo, capazes de expressar os genes *gag*, *pol* e *env*. Estas linhas celulares de empacotamento foram descritas na técnica anterior, em particular a linha celular PA317 (documento US 4861719); a linha celular PsiCRIP (documento WO90/02806) e a linha celular GP+envAm-12 (documento WO89/07150). Além disso, os vectores retrovirais recombinantes podem conter modificações nas LTR para suprimir a actividade de

transcrição assim como as sequências de encapsulação extensivas que podem incluir uma parte do gene gag (Bender et al., *J. Virol.* 61 (1987) 1639). Os vectores retrovirais recombinantes são purificados por técnicas convencionais conhecidas dos especialistas na técnica.

Os vectores retrovirais podem ser construídos para funcionar como partículas infecciosas ou para sofrer uma única ronda de transfecção. No último caso, o vírus é modificado para reter todos os seus genes excepto os responsáveis pelas propriedades de transformação oncogénica e para expressar o gene heterólogo. Os vectores virais não infecciosos são preparados para destruir o sinal de empacotamento viral, mas retêm os genes estruturais necessários para empacotar o vírus co-introduzido manipulado para conter o gene heterólogo e os sinais de empacotamento. Deste modo, as partículas virais que são produzidas não são capazes de produzir mais vírus.

### **Sistemas Não Virais**

Certos sistemas não virais foram utilizados na técnica e podem facilitar a introdução de ADN que codifica os polipeptídos de NFIF, ácidos nucleicos anti-sentido, ribozimas e anticorpos.

### **Sistemas de Distribuição por Lipofecção**

Um vector pode ser introduzido *in vivo* por lipofecção. Na última década, existiu uma utilização crescente de lipossomas para encapsulação e transfecção de ácido nucleicos *in vitro*. Os lípidos catiónicos sintéticos concebidos para limitar as

dificuldades e perigos encontrados com a transfecção mediada por lipossomas podem ser utilizados para preparar lipossomas para transfecção *in vivo* de um gene que codifica um marcador (Felgner, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:7413-7417 (1987); ver Mackey, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:8027-8031 (1988); Ulmer et al., *Science* 259:1745-1748 (1993)). A utilização de lípidos catiónicos pode promover a encapsulação de ácidos nucleicos carregados negativamente e também promover a fusão com membranas de células carregadas negativamente (Felgner e Ringold, *Science* 337:387-388 (1989)). Compostos lipídicos particularmente úteis e composições para a transferência de ácidos nucleicos são descritos nas Publicações de Patente Internacional WO95/18863 e WO96/17823 e na Patente U.S. Nº 5459127. A utilização de lipofecção para introduzir genes exógenos em órgãos específicos *in vivo* tem determinadas vantagens práticas. O direccionamento molecular de lipossomas para células específicas representa uma área de benefício. É óbvio que direccionar a transfecção para tipos de células particulares será particularmente vantajoso num tecido com heterogeneidade celular, por exemplo, pâncreas, fígado, rim e o cérebro. Os lípidos podem ser quimicamente acoplados a outras moléculas com o propósito de direccionamento (ver Mackey, et al., *supra*). Os péptidos direcionados, e. g., hormonas ou neurotransmissores, e proteínas, por exemplo, anticorpos, ou moléculas não péptidicas podem ser acopladas quimicamente a lipossomas.

Outras moléculas são também úteis para facilitar a transfecção de um ácido nucleico *in vivo*, por exemplo, um oligopéptido catiónico (e. g., Pedido de Patente Internacional WO95/21931), os péptidos derivados de proteínas que ligam ADN (e. g., Pedido de Patente Internacional WO96/25508) ou um

polímero catiónico (e. g., Pedido de Patente Internacional WO95/21931).

### **Sistemas de Distribuição de ADN Nu.**

É também possível introduzir o vector *in vivo* como um ADN plasmídico nu (ver Patentes U.S. 5693622, 5589466 e 5580859). Os vectores de ADN nu para terapia génica podem ser introduzidos nas células hospedeiras desejadas por métodos conhecidos na técnica, e. g., transfecção, electroporação, microinjecção, transdução, fusão celular, DEAE dextrano, precipitação com fosfato de cálcio, utilização de uma pistola de genes, ou utilização de um vector de ADN transportador (ver, e. g., Wu et al., *J. Biol. Chem.* 267:963-967 (1992); Wu e Wu, *J. Biol. Chem.* 263:14621-14624 (1988); Hartmut et al., Pedido de Patente Canadiana N° 2012311, de 15 de Março de 1990; Williams et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2726-2730 (1991)). As abordagens de distribuição de ADN mediadas por receptor podem também ser utilizadas (Curiel et al., *Hum. Gene Ther.* 3:147-154 (1992); Wu e Wu, *J. Biol. Chem.* 262: 4429-4432 (1987)).

### **Utilizações para Polipéptidos NFIF**

Como mencionado acima, em certas situações é desejável induzir NF<sub>κ</sub>B de modo a iniciar ou aumentar a extensão de uma resposta imunitária. De modo a induzir NF<sub>κ</sub>B, os polipéptidos de NFIF da presente invenção podem ser introduzidos no corpo de um doente através de vários métodos.

Os métodos utilizados para introduzir NFIF no corpo de um doente incluem a administração directa de polipéptidos de NFIF purificados ou introdução de ácido nucleico que codifica os polipéptidos de NFIF em vectores de expressão que expressam os polipéptidos no corpo do doente.

Nas formas de realização envolvendo a administração directa de polipéptidos de NFIF, os polipéptidos de NFIF são preparados utilizando os sistemas de expressão em célula hospedeira tais como os descritos acima. Os polipéptidos são purificados utilizando métodos convencionais de purificação e, depois, combinados com uma solução apropriada biologicamente compatível como descrito em detalhe a seguir. A solução contendo o polipéptido é introduzida no doente por via tópica, oral, parentérica, intranasal, subcutânea ou intra-ocular. Uma vez no corpo, o polipéptido é capaz de exercer o seu efeito, induzindo NF $\kappa$ B e deste modo resultando num aumento na actividade das vias reguladas por NF $\kappa$ B, incluindo as respostas imunitárias.

Nas formas de realização envolvendo a administração de ácidos nucleicos que codificam polipéptidos de NFIF, sistemas virais ou não virais utilizando vectores de expressão capazes de expressar polipéptidos de NFIF podem ser introduzidos no corpo do doente. Qualquer dos sistemas de transfecção viral ou não viral descritos acima pode ser utilizado. Os sistemas de vector viral e não viral são também combinados com uma solução apropriada biologicamente compatível para facilitar a sua introdução no corpo. Uma vez introduzido um vector viral ou não viral no corpo, o ácido nucleico que codifica o polipéptido NFIF pode integrar-se no genoma do hospedeiro, proporcionando expressão estável, de longo prazo, de polipéptidos de NFIF que exercem o seu efeito como descrito acima. A expressão transiente

pode ser proporcionada por sistemas que introduzem o ácido nucleico em células, mas não se integra no genoma.

Os polipéptidos NFIF-14b e NFIF-7a contêm sequências sinal, indicando que estes polipéptidos são capazes de ser expressos numa célula embora exercendo o seu efeito em outra célula. Consequentemente, os polipéptidos NFIF podem ser expressos por células que libertam, depois, o polipéptido NFIF na corrente sanguínea ou outros sistemas de transporte (linfa, etc.) em que são transportados para tecidos onde exercem o seu efeito na indução de NF $\kappa$ B.

A discussão que se segue descreve como identificar composições e métodos para regular a indução de NF $\kappa$ B com base na presente revelação dos polipéptidos NFIF.

### **Composição**

A presente invenção proporciona composições numa solução biologicamente compatível (biocompatível) compreendendo os polipéptidos, ácidos nucleicos e vectores da invenção. Uma solução biologicamente compatível é uma solução em que o polipéptido, ácido nucleico ou vector da invenção é mantido na forma activa, e. g., numa forma capaz de realizar uma actividade biológica. Por exemplo, um polipéptido da invenção pode ter uma actividade de activação ou desactivação de NF $\kappa$ B; um anticorpo (que ele mesmo é um polipéptido) ligar-se-à a um polipéptido da invenção; um ácido nucleico pode ser capaz de replicar, traduzir uma mensagem ou hibridar com um ácido nucleico complementar; e um vector deve ser capaz de transfectar uma célula alvo. Geralmente, esta solução biologicamente compatível será um

tampão aquoso, e. g., tampão Tris, fosfato ou HEPES, contendo iões de sal. Normalmente, a concentração de iões de sal será semelhante aos níveis fisiológicos. Numa forma de realização específica, a solução biocompatível é uma composição farmaceuticamente aceitável. As soluções biologicamente compatíveis podem incluir agentes de estabilização e conservantes.

Estas composições podem ser formuladas para administração por via tópica, oral, parentérica, intranasal, subcutânea e intra-ocular. A administração parentérica pretende incluir a injecção intravenosa, injecção intramuscular, injecção intra-arterial ou técnicas de infusão. A composição pode ser administrada parentericamente em formulações de dosagem unitária contendo veículos, adjuvantes e veículos convencionais, bem conhecidos não tóxicos, fisiologicamente aceitáveis como desejado.

As preparações estéreis injectáveis preferidas podem ser uma solução ou suspensão num solvente ou diluente parentericamente aceitável não tóxico. Exemplos de veículos farmaceuticamente aceitáveis são solução fisiológica salina, solução fisiológica salina tamponada, solução fisiológica salina isotónica (e. g. fosfato monossódico ou dissódico, cloreto de sódio, potássio, cálcio ou magnésio, ou misturas destes sais), solução de Ringer, dextrose, água, água estéril, glicerol, etanol e suas combinações. São convenientemente empregues como solventes ou meios de suspensão 1,3-butanodiol e óleos estéreis fixados. Qualquer óleo fixado suave pode ser empregue incluindo mono- ou di-glicéridos sintéticos. Os ácidos gordos, tal como ácido oleico também encontram utilização na preparação de injectáveis.

O meio da composição pode também ser um hidrogel que é preparado de qualquer polímero biocompatível ou não citotóxico (homo ou hetero), tal como um polímero hidrofílico de ácido poliacrílico que pode actuar como uma esponja absorvente do fármaco. Estes polímeros foram descritos, por exemplo, no pedido WO93/08845. Alguns destes, tais como, em particular, os obtidos de etileno e/ou propileno estão comercialmente disponíveis. Um hidrogel pode ser depositado directamente na superfície do tecido a ser tratado, por exemplo, durante intervenção cirúrgica.

Outra forma de realização preferida da presente invenção refere-se a uma composição farmacêutica compreendendo um vírus recombinante deficiente em replicação e poloxâmero. Mais especificamente, a invenção refere-se a uma composição compreendendo um vírus recombinante deficiente em replicação compreendendo um ácido nucleico que codifica um polipéptido de NFIF e poloxâmero. Um poloxâmero preferido é Poloxamer 407, que está comercialmente disponível (BASF, Parsippany, NJ) e é um poliol não tóxico, biocompatível, e é o mais preferido. Um poloxâmero impregnado com vírus recombinantes pode ser depositado directamente na superfície do tecido a ser tratado, por exemplo, durante uma intervenção cirúrgica. O poloxâmero possui essencialmente as mesmas vantagens que um hidrogel embora apresentando uma baixa viscosidade.

A presente invenção também se refere a composições úteis na preparação de medicamentos pretendidos para o tratamento de indivíduos afectados com uma resposta inflamatória regulada por NFκH, e composições úteis na preparação de medicamentos pretendidos para evitar que os indivíduos sejam afectados com uma resposta inflamatória regulada por NFκB. Consequentemente, a

presente invenção inclui a utilização de um polipéptido de NFIF de acordo com a invenção para a preparação de um medicamento pretendido para o tratamento e/ou prevenção de uma resposta inflamatória regulada por NF $\kappa$ B. A presente invenção também inclui a utilização de um ácido nucleico de acordo com a invenção, que codifica um polipéptido de NFIF, para a preparação de um medicamento pretendido para o tratamento e/ou prevenção de uma resposta inflamatória regulada por NF $\kappa$ B. A presente invenção inclui ainda a utilização de um vector recombinante de acordo com a invenção, compreendendo um ácido nucleico que codifica um polipéptido de NFIF, para a preparação de um medicamento pretendido para o tratamento e/ou prevenção de uma resposta inflamatória regulada por NF $\kappa$ B. A presente invenção também inclui a utilização de um vector viral recombinante deficiente de acordo com a invenção para a preparação de um medicamento pretendido para o tratamento e/ou prevenção de uma resposta inflamatória regulada por NF $\kappa$ B.

O aqui descrito também se refere com a utilização de composições compreendendo células geneticamente modificadas *ex vivo* com um vírus recombinante e composições compreendendo células contendo estes vírus recombinantes que são implantados no corpo, facilitando a expressão prolongada e eficaz *in vivo* de um polipéptido NFIF de acordo com a invenção.

**Compostos Terapêuticos com base em  
NFIF que Inibem a Activação de NF $\kappa$ B**

Como explicado acima, em determinadas situações, é desejável reduzir ou inibir as respostas imunitárias reguladas por NF $\kappa$ B. Através da inibição da expressão do gene de NFIF ou da

interferência com a actividade de polipéptidos de NFIF, é possível inibir a indução de NF $\kappa$ B e consequentemente inibir ou prevenir as respostas imunitárias reguladas por NF $\kappa$ B que resultam em aterosclerose e outras doenças.

Existe uma variedade de compostos terapêuticos que podem ser utilizados para inibir a expressão ou actividade de NFIF. Estes compostos terapêuticos podem ser ácidos nucleicos, polipéptidos, péptidos ou moléculas pequenas não péptido. Em uma forma de realização, os ácidos nucleicos anti-sentido são utilizados para diminuir a expressão do gene NFIF inibindo o processamento (excisão/união) do transcrito de NFIF primário. Em outra forma de realização, as ribozimas que clivam o ARNm de NFIF são utilizados, prevenindo a síntese de NFIF. Os polipéptidos incluem anticorpos ou outras proteínas de ligação que se ligam aos polipéptidos de NFIF e interferem com a sua capacidade para activar a indução de NF $\kappa$ B. Além disso, os compostos, tais como pequenas moléculas inibidoras que inibem a expressão do gene NFIF ou a actividade dos polipéptidos de NFIF podem ser identificados em ensaios de gene repórter como descritos acima e administrados a doentes para inibir a expressão/actividade de NFIF. Os mesmos métodos descritos acima para introduzir os polipéptidos NFIF e os ácidos nucleicos que codificam os polipéptidos de NFIF no corpo de um doente são utilizados para administrar as várias composições anti-NFIF.

### **Ácidos Nucleicos Anti-sentido**

A regulação negativa da expressão do gene utilizando ácidos nucleicos anti-sentido pode ser conseguida ao nível da tradução ou transcrição. Os ácidos nucleicos anti-sentido são, de um modo

preferido, fragmentos de ácido nucleico capaz de especificamente hibridar com toda ou parte de um ácido nucleico que codifica NFIF ou o ARN mensageiro correspondente. Além disso, podem ser concebidos ou identificados os ácidos nucleicos anti-sentido que diminuem a expressão do gene NFIF por inibição da excisão/união do seu transcrito primário. Com o conhecimento da sequência estrutural e parcial do gene NFIF, estes ácidos nucleicos anti-sentido podem ser concebidos e testados quanto a eficácia.

Os ácidos nucleicos anti-sentido são, de um modo preferido, oligonucleótidos e podem consistir inteiramente de desoxirribonucleótidos, desoxirribonucleótidos modificados ou algumas combinações de ambos. Os ácidos nucleicos anti-sentido podem ser oligonucleótidos sintéticos. Os oligonucleótidos podem ser quimicamente modificados, se desejado, para melhorar a estabilidade e/ou selectividade. Uma vez que os oligonucleótidos são susceptíveis de degradação por nucleases intracelulares, as modificações podem incluir, por exemplo, a utilização de um grupo sulfuroso para substituir o oxigénio livre da ligação fosfodiéster. Esta modificação é denominada uma ligação fosforotioato. Os oligonucleótidos anti-sentido fosforotioato são solúveis em água, polianiónicos e resistentes a nucleases endógenas. Além disso, quando um oligonucleótido anti-sentido fosforotioato híbrida com o seu sítio alvo, o duplexo ARN-ADN activa a enzima ribonuclease (Rnase) H endógena, que cliva o componente de ARNm da molécula híbrida.

Além disso, os oligonucleótidos anti-sentido com fosforamidite e ligações poliamida (péptido) podem ser sintetizados. Estas moléculas devem ser muito resistentes a degradação com nuclease. Além disso, os grupos químicos podem ser adicionados ao carbono 2' da unidade de açúcar e o carbono 5

(C-5) de pirimidinas para estimular a estabilidade e facilitar a ligação do oligonucleótido anti-sentido ao seu sítio alvo. As modificações podem incluir 2' desoxilo, O-pentoxilo, O-propoxilo, O-metoxilo, fluoro, metoxietoxifosforotioatos, bases modificadas, assim como as outras modificações conhecidas dos especialistas na técnica.

Os ácidos nucleicos anti-sentido podem ser também sequências de ADN cuja expressão na célula produz ARN complementar a toda ou parte do ARNm de NFIF. Os ácidos nucleicos anti-sentido podem ser preparados por expressão de toda ou parte de uma sequência seleccionada do grupo consistindo na sequência na Figura 3, na orientação oposta, como descrito no documento EP 140308. Qualquer comprimento da sequência anti-sentido é adequado para a prática da invenção desde que seja capaz de regular negativamente ou bloquear a expressão de NFIF. De um modo preferido, a sequência anti-sentido tem, pelo menos, 20 nucleótidos de comprimento. A preparação e utilização dos ácidos nucleicos anti-sentido, o ADN que codifica os ARN anti-sentido e a utilização de oligo e de anti-sentido genético é divulgada em WO92/15680.

Uma abordagem para determinar o fragmento óptimo de NFIF para utilização num método de tratamento com ácido nucleico anti-sentido envolve a preparação de fragmentos aleatórios de ADNc de NFIF por fragmentação mecânica, tratamento enzimático, e clonagem do fragmento em qualquer dos sistemas de vector aqui descritos. Os clones individuais ou misturas de clones são utilizados para infectar células que expressam NFIF, e os fragmentos de ADNc de NFIF anti-sentido eficazes são identificados por monitorização da expressão de NFIF no nível de ARN ou proteína.

Os sistemas de vector retroviral, viral adeno-associado, e adenoviral aqui discutidos acima podem ser todos utilizados para introduzir e expressar ácidos nucleicos anti-sentido nas células. Os oligonucleótidos sintéticos anti-sentido podem ser introduzidos de vários modos, incluindo os métodos aqui discutidos a seguir.

### **Ribozimas**

As reduções nos níveis de polipéptido NFIF podem ser conseguidas utilizando ribozimas. As ribozimas são moléculas de ARN catalítico (enzimas de ARN) que têm domínios de ligação separados catalíticos e para o substrato. A sequência de ligação ao substrato combina por complementaridade de nucleótidos, possivelmente, sem interacções de ligação de hidrogénio com a sua sequência alvo. A porção catalítica cliva o ARN alvo num sítio específico. O domínio do substrato de uma ribozima pode ser manipulado para se dirigir a uma sequência de ARNm específica. A ribozima reconhece e depois liga-se ao ARNm alvo através de emparelhamento de bases por complementaridade. Uma vez ligado ao sítio alvo específico, a ribozima actua enzimaticamente para cortar o ARNm alvo. A clivagem do ARNm de NFIF por uma ribozima destrói a sua capacidade para dirigir a síntese do polipéptido NFIF. Uma vez que a ribozima tenha clivado a sua sequência alvo, é libertada e pode repetidamente ligar-se e clivar outros ARNm de NFIF.

Os exemplos de ribozimas para utilização na prática da presente invenção incluem uma variedade de motivos, por exemplo, o motivo cabeça de martelo, motivo gancho de cabelo, um motivo do vírus de hepatite delta, do intrão do grupo I ou RnaseP ARN (em

associação com uma sequência guia de ARN) ou motivo de ARN de *Neurospora* VS. Os motivos de cabeça de martelo são descritos por Rossi et al., 1992, *Aids Research and Human Retroviruses*, 8, 183. os motivos de gancho de cabelo são descritos em Hampel e Tritz, 1989, *Biochemistry*, 28, 4929, e Hampel et al., 1990, *Nucleic Acids Res.*, 18, 299. O motivo do vírus de hepatite delta é descrito por Perrotta e Been, 1992, *Biochemistry*, 31, 16, o motivo de RnaseP é descrito por Guerrier-Takada et al., 1983, *Cell*, 35, 849, o motivo de ARN da ribozima de *Neurospora* VS é descrito por Collins (Saville e Collins, 1990, *Cell*, 61, 685-696; Saville e Collins, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 8826-8830; Collins e Olive, 1993, *Biochemistry*, 32, 2795-2799) o motivo do intrão do Grupo I é descrito por Cech et al., Patente U.S. N° 4987071.

Uma abordagem na preparação de uma ribozima é sintetizar quimicamente um oligodesoxirribonucleótido com um domínio catalítico de ribozima (~20 nucleótidos) flanqueado por sequências que hibridam com o ARNm de NF1F alvo após a transcrição. O oligodesoxirribonucleótido é amplificado utilizando as sequências de ligação ao substrato como iniciadores. O produto de amplificação é clonado num vector de expressão eucariótico.

As ribozimas possuindo uma estrutura de cabeça de martelo ou de gancho de cabelo são preparadas rapidamente uma vez que estas moléculas catalíticas de ARN podem ser expressas nas células a partir de promotores eucarióticos (e. g., Scanlon et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 10591-5; Kashani-Sabet et al., 1992, *Antisense Res. Dev.*, 2, 3-15; Dropulic et al., 1992, *J. Virol.*, 66, 1432-41; Weerasinghe et al., 1991, *J. Virol.*, 65, 5531-4; Ojwang et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89,

10802-6; Chen et al., 1992, *Nucleic Acids Res.*, 20, 4581-9; Sarver et al., 1990, *Science*, 247, 1222-1225)). Uma ribozima pode ser expressa em células eucarióticas a partir do vector de ADN apropriado. Se desejado, a actividade da ribozima pode ser aumentada pela sua libertação a partir do transcrito primário por uma segunda ribozima (Ohkawa et al., 1992, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 27, 15-6; Taira et al., 1991, *Nucleic Acids Res.*, 19, 5125-30; Ventura et al., 1993, *Nucleic Acids Res.*, 21, 3249-55).

Numa abordagem para preparar ribozimas, as ribozimas são expressas a partir de uma unidade de transcrição inserida nos vectores de ADN, ARN ou virais. A transcrição das sequências da ribozima é conduzida a partir de um promotor para a polimerase de ARN I (pol (I) eucariótica, polimerase de ARN II (pol II) ou polimerase de ARN III (pol III). Os transcritos dos promotores de pol II ou pol III serão expressos em níveis elevados em todas as células; os níveis de um determinado promotor de pol II num determinado tipo de célula dependerá das sequências reguladoras próximas do gene. Os promotores da polimerase de ARN procariótica são também utilizados, desde que a enzima polimerase de ARN procariótica seja expressa nas células apropriadas (Elroy-Stein e Moss, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 6743-7; Gao e Huang 1993, *Nucleic Acids Res.*, 21, 2867-72; Lieber et al., 1993, *Methods Enzymol.*, 217, 47-66; Zhou et al., 1990, *Mol. Cell. Biol.*, 10, 4529-37). Foi demonstrado que as ribozimas expressas a partir destes promotores pode funcionar em células de mamífero (Kashani-Sabet et al., 1992, *Antisense Res. Dev.*, 2, 3-15; Ojwang et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 10802-6; Chen et al., 1992 *Nucleic Acids Res.*, 20, 4581-9; Yu et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 6340-4; L'Huillier et al., 1992, *EMBO J.*, 11, 4411-8;

Lisziewicz et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 8000-4).

Em uma forma de realização, a unidade de transcrição que expressa uma ribozima que cliva ARN de NFIF é inserida num vector de ADN plasmídico, um vector retrovírus, um vector de ADN viral de adenovírus ou um vector de vírus adeno-associado. Os vectores recombinantes são, de um modo preferido, plasmídeos de ADN ou vectores de adenovírus. Contudo, outros vectores de célula de mamífero que dirigem a expressão de ARN podem ser utilizados para este propósito. Os vectores são distribuídos como partículas virais recombinantes. O ADN pode ser distribuído isolado ou complexado com vários veículos. O ADN, complexos ADN/veículo ou as partículas de vírus recombinantes são localmente administrados ao sítio de tratamento, como discutido a seguir. De um modo preferido, os vectores recombinantes capazes de expressar as ribozimas são localmente distribuídos como a seguir descrito e persistem nas células alvo. Uma vez expressas, as ribozimas clivam o ARNm de NFIF alvo.

As ribozimas podem ser administradas a um doente por uma variedade de métodos. Estes podem ser adicionados directamente aos tecidos alvo, complexados com lípidos catiónicos, empacotados em lipossomas ou distribuídos às células alvo por outros métodos conhecidos na técnica. A administração localizada nos tecidos desejados pode ser efectuada por cateter, bomba de infusão ou "stent", com ou sem incorporação da ribozima em biopolímeros como aqui discutido a seguir. As vias alternativas de distribuição incluem, mas não estão limitados a, injeção intravenosa, injeção intramuscular, injeção subcutânea, inalação de aerossol, distribuição oral (forma de comprimido ou pílula), tópico, sistémica, ocular, intraperitoneal e/ou

intratecal. São proporcionadas descrições mais detalhadas da distribuição da ribozima e administração em Sullivan *et al.*, PCT WO94/02595 e Draper *et al.*, PCT WO93/23569.

### **Anticorpos**

São aqui descritos são anticorpos contra o polipéptido NFIF. Estes anticorpos podem ser anticorpos monoclonais ou anticorpos policlonais. Estão incluídos os anticorpos quiméricos, de cadeia única e humanizados, assim como fragmentos Fab e os produtos de expressão de uma biblioteca de Fab e fragmentos Fv e os produtos de uma biblioteca de expressão de Fv.

Os anticorpos policlonais podem ser preparados contra um fragmento antigénico de um polipéptido NFIF. Os anticorpos podem também ser produzidos contra a proteína NFIF intacta ou polipéptido, ou contra um fragmento, derivado ou epitopo da proteína ou polipéptido. Os anticorpos podem ser obtidos após a administração da proteína, polipéptido, fragmento, derivado ou epitopo a um animal, utilizando as técnicas e processos conhecidos na técnica.

Os anticorpos monoclonais podem ser preparados utilizando o método de Mishell, B. B., *et al.*, Selected Methods In Cellular Immunology, (W.H. Freeman, ed.) São Francisco (1980). Resumidamente, um polipéptido da presente invenção é utilizado para imunizar células de baço de murganhos Balb/C. As células de baço imunizadas são fundidas com células de mieloma. As células fundidas contendo características de célula de baço e mieloma são isoladas por crescimento em meio HAT, um meio que mata ambas

as células parentais, mas que permite que os produtos da fusão sobrevivam e cresçam.

Os anticorpos monoclonais podem ser "humanizados" para prevenir que o hospedeiro monte uma resposta imunitária contra os anticorpos. Um "anticorpo humanizado" é um em que as regiões que determinam a complementaridade (CDR) e/ou outras porções da estrutura do domínio variável leve e/ou pesado são derivadas de uma imunoglobulina não humana, mas as restantes porções da molécula são derivadas de uma ou mais imunoglobulinas. Os anticorpos humanizados também incluem anticorpos caracterizados por uma cadeia pesada humanizada, associada com uma cadeia leve não modificada dadora ou receptora ou uma cadeia leve quimérica, ou vice-versa. A humanização de anticorpos pode ser conseguida por métodos conhecidos na técnica (ver, e. g. G.E. Mark e E.A. Padlan, "Capítulo 4. Humanization of Monoclonal Antibodies", The Handbook of Experimental Pharmacology Vol. 113, Springer-Verlag, Nova Iorque, 1994). Os animais transgénicos podem ser utilizados para expressar anticorpos humanizados.

As técnicas conhecidas na técnica para a produção de anticorpos de cadeia única podem ser adaptados para produzir anticorpos de cadeia única para os polipeptídos e proteínas imunogénicas da presente invenção.

Numa forma de realização preferida, um anticorpo anti-NFIF é utilizado para se ligar a e inibir a actividade de NFIF num doente.

Os anticorpos anti-NFIF são também úteis nos ensaios para detectar ou quantificar níveis de NFIF. Numa forma de realização, estes ensaios proporcionam um diagnóstico clínico e

avaliação de NFIF em vários estados de doença e um método para monitorizar a eficácia do tratamento. Um exemplo de um anticorpo anti-NFIF utilizado para ligar NFIF e identificar a sua presença em tecidos é proporcionado no Exemplo 5. estes anticorpos anti-NFIF podem, Além disso, ser utilizados para quantificar NFIF numa amostra de tecido.

### **Métodos de Tratamento**

A presente invenção é útil em métodos de tratamento, compreendendo a administração a um humano ou outro animal de uma quantidade eficaz de uma composição da invenção.

As quantidades eficazes podem variar, dependendo da idade, tipo e gravidade do estado a ser tratado, peso corporal, duração desejada do tratamento, método de administração e outros parâmetros. As quantidades eficazes são determinadas por um médico ou outro profissional médico qualificado. Na maioria dos casos, os níveis de dosagem podem ser ajustados de modo a que os níveis de NFIF ou outros compostos terapêuticos podem ser conseguidos e mantidos.

Os polipeptídos de acordo com a invenção são geralmente administrados em doses de cerca de 0,01 mg/kg a cerca de 100 mg/kg, de um modo mais preferido, cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 50 mg/kg e, ainda, de um modo mais preferido, cerca de 1 mg/kg a cerca de 10 mg/kg do peso corporal por dia.

Os anticorpos neutralizantes podem ser distribuídos como apenas um bólus, infundido ao longo do tempo ou administrado como um bólus e infundido ao longo do tempo. Embora a quantidade

de dosagem varie com base nos parâmetros acima e na capacidade de ligação do anticorpo, uma dose de 0,2 a 0,6 mg/kg pode ser administrada como um bólus seguido por 2 a 12 horas de período de infusão. Alternativamente, as injecções de bólus múltiplos são administradas dia sim, dia não ou em cada terceiro ou quarto dia, conforme necessário. Os níveis de dosagem podem ser ajustados como determinado pelos níveis de NFIF e/ou indução dos níveis de NFκB.

Como aqui discutido acima, os vírus recombinantes podem ser utilizados para introduzir ADN que codifica NFIF e subfragmentos de NFIF assim como ácidos nucleicos anti-sentido. Os vírus recombinantes são geralmente formulados e administrados na forma de doses entre cerca de  $10^4$  e cerca de  $10^{14}$  pfu. No caso de AAV e adenovírus, as doses desde cerca de  $10^6$  a cerca de  $10^{11}$  pfu são, de um modo preferido, utilizadas. O termo pfu ("unidade formadora de placa") corresponde ao poder infeccioso de uma suspensão de viriões e é determinado por infecção de uma cultura de células apropriada e medição do número de placas formadas. As técnicas para determinação do título de pfu de uma solução viral são bem documentadas na técnica anterior.

As ribozimas podem ser administradas em quantidades variando de cerca de 5 a cerca de 50 mg/kg/dia num veículo farmaceuticamente aceitável. Os níveis de dosagem podem ser ajustados com base na medição da eficácia terapêutica.

Os níveis apropriados do inibidor ou moléculas intensificadoras podem ser determinados por pessoal médico qualificado utilizando os parâmetros discutidos acima.

### **Métodos para Aumentar o Nível de Actividade do Péptido NFIF**

Os métodos para aumentar a expressão ou actividade de polipéptido NFIF incluem, mas não estão limitados a, administração de uma composição compreendendo o polipéptido NFIF, administração de uma composição compreendendo um vector de expressão que codifica o polipéptido NFIF a administração de uma composição compreendendo uma molécula intensificadora que intensifica a actividade do polipéptido NFIF e a administração de uma molécula intensificadora que aumenta a expressão do gene de NFIF.

### **Métodos que Utilizam Polipéptidos de NFIF**

Em uma forma de realização, o nível de actividade de NFIF é aumentado através da administração de uma composição compreendendo o polipéptido NFIF. Esta composição pode ser administrada de uma forma conveniente, tal como pelas vias oral, tópica, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutânea, intranasal ou intradérmica. A composição pode ser administrada directamente ou pode ser encapsulada (e. g., num sistema de lípido, em microesferas de aminoácidos ou em dendrímeros globulares). O polipéptido pode, em alguns casos, ser ligado a outro polímero, tal como albumina do soro ou polivinilpirrolidona.

### **Métodos que Utilizam Vectores que Expressam NFIF**

Em outra forma de realização, o nível de NFIF é aumentado através da utilização de terapia génica, isto é, através da

administração da composição compreendendo um ácido nucleico que codifica e dirige a expressão do polipéptido NFIF. Nesta forma de realização, o polipéptido de NFIF é clonado num vector de expressão apropriado. Os sistemas de vectores e promotores possíveis são extensivamente discutidos acima. O vector de expressão é transferido para o tecido alvo utilizando um dos sistemas de distribuição de vector discutidos acima. Esta transferência é efectuada *ex vivo* num processo em que o ácido nucleico é transferido para células no laboratório e as células modificadas são então administradas ao humano ou a outro animal, ou *in vivo* num processo em que o ácido nucleico é transferido directamente para células no humano ou outro animal. Nas formas de realização preferidas, é utilizado um sistema de vector adenoviral para distribuir o vector de expressão. Se desejado, um promotor específico para o tecido é utilizado no vector de expressão como descrito acima.

Os vectores não virais podem ser transferidos para células utilizando qualquer dos métodos conhecidos na técnica, incluindo coprecipitação com fosfato de cálcio, lipofecção (lipossomas sintéticos aniónicos e catiónicos), distribuição de genes mediada por receptor, injecção de ADN nu, electroporação e biobalística ou aceleração de partículas.

#### Métodos que Utilizam uma Molécula Intensificadora que Intensifica a Actividade de NFIF

Em outra forma de realização, a actividade de NFIF é intensificada por moléculas intensificadoras que aumentam a actividade de NFIF ou aumentam o seu reconhecimento apropriado pelos sítios de ligação na célula. Estas moléculas

intensificadoras podem ser introduzidas pelos mesmos métodos discutidos acima para a administração de polipeptídos.

**Métodos que Utilizam uma Molécula Intensificadora que aumenta a Expressão do Gene de NFIF**

Em outra forma de realização, o nível de NFIF é aumentado através da utilização de compostos de baixo peso molecular, que pode regular positivamente a expressão de NFIF ao nível da transcrição, tradução ou pós-tradução. Estes compostos podem ser administrados pelos mesmos métodos discutidos acima para a administração de polipeptídos.

**Métodos para Tratar ou Prevenir uma Resposta Inflamatória Regulada por NFkB**

Os métodos de tratamento em que a presente invenção é útil incluem o tratamento ou prevenção de respostas inflamatórias reguladas por NFkB incluindo, mas não se limitando a, artrite reumatóide, aterosclerose, doenças autoimunitárias, doenças virais, gastropatia induzida por NSAID, doenças neurodegenerativas, scrapie, sepsia, apoptose, doença de Crohn, doença renal, restenose, lesão cerebral/inflamação, doença de Alzheimer, asma e expressão de citocinas pleiotrópicas reguladas de forma inapropriada.

Estes métodos incluem, mas não estão limitados a, administração de uma composição compreendendo um ácido nucleico anti-sentido, administração de uma composição compreendendo uma proteína de ligação intracelular, tal como um anticorpo, a

administração de uma molécula inibidora que inibe a actividade de NFIF, por exemplo, uma composição compreendendo um vector de expressão que codifica um subfragmento de NFIF ou uma molécula de baixo peso molecular, incluindo a administração de uma composta de baixo peso molecular que regula negativamente a expressão de NFIF ao nível da transcrição, tradução ou pós-tradução, administração de uma ribozima que cliva ARNm que codifica NFIF, administração de um medicamento preparado utilizando um polipéptido NFIF, administração de um medicamento preparado utilizando um ácido nucleico que codifica um polipéptido NFIF, administração de um medicamento preparado utilizando um vector recombinante que inclui o ácido nucleico que codifica um polipéptido NFIF e administração de um medicamento preparado utilizando um vector viral recombinante deficiente que inclui o ácido nucleico que codifica um polipéptido NFIF.

### **Métodos para Diminuir os Níveis de Actividade do Polipéptido NFIF**

Os métodos para diminuir a expressão do polipéptido NFIF de modo a diminuir a indução de NF $\kappa$ B inclui, mas não estão limitados a, administração de uma composição compreendendo um ácido nucleico anti-sentido, administração de uma composição compreendendo uma proteína de ligação intracelular, tal como um anticorpo, administração de uma molécula que inibe a actividade de NFIF, por exemplo, uma composição compreendendo um vector de expressão que codifica um subfragmento de NFIF ou uma molécula de baixo peso molecular, incluindo a administração de um composto de baixo peso molecular que regula negativamente a expressão de NFIF ao nível da transcrição, tradução ou

pós-tradução e administração de uma ribozima que cliva o ARNm que codifica NFIF.

### **Métodos que Utilizam Ácidos Nucleicos Anti-sentido**

Numa forma de realização, uma composição compreendendo um ácido nucleico anti-sentido é utilizado para regular negativamente ou bloquear a expressão de NFIF. Numa forma de realização preferida, o ácido nucleico codifica moléculas de ARN anti-sentido. Nesta forma de realização, o ácido nucleico é ligado operacionalmente a sinais que permitem a expressão da sequência de ácido nucleico e é introduzido numa célula utilizando, de um modo preferido, as construções de vector recombinante que expressam o ácido nucleico anti-sentido uma vez que o vector é introduzido na célula. Os exemplos de vectores adequados incluem plasmídeos, adenovírus, vírus adeno-associados, retrovírus e herpes vírus. De um modo preferido, o vector é um adenovírus. De um modo muito preferido, o vector é um adenovírus deficiente em replicação compreendendo uma deleção nas regiões E1 e/ou E3 do vírus.

Em outra forma de realização, o ácido nucleico anti-sentido é sintetizado e pode ser quimicamente modificado para resistir à degradação por nucleases intracelulares, como discutido acima. Os oligonucleótidos anti-sentido sintéticos podem ser introduzidos numa célula utilizando lipossomas. A incorporação celular ocorre quando um oligonucleótilo anti-sentido é encapsulado num lipossoma. Com um sistema de distribuição eficaz, podem ser utilizadas baixas concentrações, não tóxicas, da molécula anti-sentido, para inibir a tradução do ARNm alvo. Além disso, os lipossomas que são conjugados com sítios de

ligação específicos para a célula dirigem um oligonucleótido anti-sentido para um tecido particular.

**Métodos Utilizando Anticorpos Neutralizantes e Outras Proteínas de Ligação**

Em outra forma de realização, a expressão de NFIF é regulada negativamente ou bloqueada pela expressão de uma sequência de ácido nucleico que codifica uma proteína de ligação intracelular que é capaz de interactuar selectivamente com NFIF. Os documentos WO 94/29446 e WO 94/02610 divulgam a transfecção celular com genes que codificam uma proteína de ligação intracelular. Uma proteína de ligação intracelular inclui qualquer proteína capaz de interagir selectivamente ou de se ligar com NFIF na célula em que é expressa e de neutralização da função do NFIF ligado. De um modo preferido, a proteína de ligação intracelular é um antícorpo neutralizante ou um fragmento de um antícorpo neutralizante. De um modo mais preferido, a proteína de ligação intracelular é um antícorpo de cadeia única.

O documento WO 94/02610 divulga a preparação de anticorpos e identificação do ácido nucleico que codifica um antícorpo particular. Utilizando NFIF ou um seu fragmento, é preparado um antícorpo monoclonal específico por técnicas conhecidas pelos especialistas da técnica. Um vector compreendendo o ácido nucleico que codifica uma proteína de ligação intracelular, ou uma sua porção, e capaz de expressão numa célula hospedeira é subsequentemente preparada para utilização no método aqui descrito.

Alternativamente, a actividade de NFIF pode ser bloqueada por administração de um anticorpo neutralizante na circulação. Este anticorpo neutralizante pode ser administrado directamente como uma proteína, ou pode ser expresso a partir de um vector (com um sinal de secreção).

#### **Métodos que Utilizam uma Molécula Inibidora que Previne a Expressão do Gene de NFIF**

Em outra forma de realização, as moléculas inibidoras, incluindo compostos de baixo peso molecular, são capazes de regular negativamente a expressão de NFIF ao nível de transcrição, tradução ou pós-tradução. De modo a identificar estas moléculas inibidoras, os sistemas de gene repórter descritos acima podem ser utilizados. Estas moléculas inibidoras podem ser combinadas com um veículo farmaceuticamente aceitável e administradas utilizando métodos convencionais conhecidos na técnica.

#### **Métodos que Utilizam Ribozimas**

As ribozimas podem ser administradas a células por encapsulação em lipossomas, por iontoforese, por incorporação em hidrogéis, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegráveis e microesferas bioadesivas ou por qualquer um de vários outros métodos discutidos acima. A ribozima pode ser distribuída num tecido alvo por injecção directa ou por utilização de um cateter, bomba de infusão ou "stent". As vias alternativas de distribuição incluem injecção intravenosa, injecção intramuscular, injecção subcutânea, inalação de aerossol,

distribuição oral (forma de comprimido ou pílula), tópica, sistémica, ocular, intraperitoneal e/ou intratecal.

Nas formas de realização preferidas, uma sequência que codifica a ribozima é clonada num vector de expressão de ADN. A transcrição da sequência de ribozima é conduzida a partir de uma polimerase II de ARN (pol II) eucariótica ou promotor de polimerase III de ARN (pol III). O vector de expressão pode ser incorporado numa variedade de vectores incluindo os vectores de ADN viral, tais como vectores de adenovírus ou associados a adenovírus discutidos acima.

Numa forma de realização preferida da invenção, uma unidade de transcrição que expressa uma ribozima que cliva ARN de NFIF é inserida num vector viral de ADN de adenovírus. O vector é distribuído como partículas virais recombinantes e é localmente administrado no sítio de tratamento, através da utilização de um cateter, "stent" ou bomba de infusão.

### **Exemplos**

#### **Exemplo 1 - Método para Clonagem de NFIF-14b e NFIF-7a**

Para isolar o ADN que codifica NFIF-14b e NFIF-7a, foi preparada uma biblioteca de ADNc a partir de ARN total de células vasculares de músculo liso humano (SMC) utilizando um kit de síntese de biblioteca de ADNc Clontech Marathon™. O kit de síntese de ADNc também inclui uma biblioteca de ADN de placenta humana de controlo. As bibliotecas são lineares e amplificadas por PCR.

Os genes de NFIF-14b e NFIF-7a foram obtidos por PCR efectuado nas bibliotecas de ADNC marathon de SMC Vasculares Humanas e de Placenta Humana.

Para efectuar as reacções de PCR, os componentes convencionais de PCR [tampão Perkin Elmer 10X e Taq Gold Polymerase] foram utilizados e a reacção foi efectuada como segue. As misturas de reacção foram aquecidas a 94 °C durante 10 minutos, depois termocicladas 10 vezes com um passo desnaturante de 94 °C durante 30 segundos, um passo de emparelhamento de 65 °C durante 30 segundos, e um passo de extensão de 72 °C durante 1,5 minutos. Depois destes dez ciclos, a reacção foi termociclada 30 vezes com um passo desnaturante de 94 °C durante 30 segundos, um passo de emparelhamento de 46 °C durante 30 segundos, e um passo de extensão de 72 °C durante 1,5 minutos. Depois destes 30 ciclos, as reacções foram incubadas a 72 °C durante 7 minutos e armazenadas a 4 °C. As reacções de PCR foram efectuadas num termociclagor Perkin Elmer 9600.

O produto de PCR de cada PCR foi ligado ao pCR2.1 (Invitrogen) e transformada em DH5 $\alpha$ -*E.coli*. Os clones foram picados e cultivados em 5 mL de LB-amp; os plasmídeos foram depois isolados e digeridos com EcoRI para verificar o tamanho da inserção libertada. Cinco de quinze clones produziram bandas de tamanho de 1,2-1,3 Kb, sugestivo do gene alvo e foram sequenciados.

Os clones putativos de NFIF foram identificados com base numa grelha de leitura aberta e alinhamento de sequências da sequência contra uma sequência 5' prevista. Os clones Nº 14b e 7a foram seleccionados para caracterização posterior.

As preparações de plasmídeo em larga escala foram cultivadas a partir dos stocks originais de glicerol do clone 7 e 14 e isolados utilizando um Qiagen MaxiPrep Kit.

**Exemplo 2 - Subclonagem do clone 7a e 14b num vector de expressão eucariótico**

Os clones 14b e 7a foram ainda subclonados no vector plasmídico pCDNA3.1mychis disponível de Invitrogen. Este vector de expressão inclui um forte promotor para a expressão de elevado nível em células de mamífero e um marcador de selecção para produzir linhas celulares estáveis. Uma marca de fusão C-terminal no vector consiste numa sequência de poli-histidina para a purificação rápida e um epitopo myc para a conveniente detecção com um anticorpo anti-myc.

As reacções de PCR foram efectuadas utilizando iniciadores de PCR

5'hasm - 5'-tccaccatggcgctggtgcgcgactc-3' (SEQ ID Nº: 6) e

fushasm3' - 3'-ctggatatcgtaattgtgctttataaaagctg-5' (SEQ ID Nº: 7) e a construção pCR2.1 para cada clone de comprimento total como molde. As condições de PCR utilizando 475 pg do pCR2.1 clone 7a ou 500 pg de pCR2.1 clone 14b foram como se segue: as misturas de reacção foram aquecidas a 95 °C durante 10 minutos, depois termocicladas 30 vezes com um passo desnaturante de 95 °C durante 30 segundos, um passo de emparelhamento de 52 °C durante 30 segundos e, depois, um passo de extensão de 72 °C durante 1,5 minutos. Após estes 30 ciclos,

as reacções foram incubadas a 72 °C durante 7 minutos, e armazenadas a 4 °C.

O produto de PCR foi ligado com pCR2.1 e a inserção de ADN sequenciada utilizando um Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction e um Perkin Elmer Applied Biosystems ABI Prism 377 DNA Sequencer. A sequenciação demonstrou que o iniciador de PCR removeu o codão de interrupção natural (TAG) e introduziu um sítio EcoRV.

As construções positivas de NFIF-14b e -7a foram digeridas com EcoRI e EcoRV e subclonados em pcDNA3.1 mychis (Invitrogen) digerido com EcoRI e EcoRV. Isto resultou na etiqueta myc em fusão com a extremidade 3' dos ADNc de NFIF. Estas construções foram denominadas pcDNA3.1mychasm7a e pcDNA3.1hasm14bmyc.

### **Exemplo 3 – Preparação ou Variantes de Deleção de NFTF**

Os mutantes de deleção de NFIF-14b e NFIF-7a foram preparados por reacções de PCR utilizando os plasmídeos pcDNA3.1mychasm7a e pcDNA3.1hasm14bmyc descrito acima. Dois conjuntos de iniciadores de PCR foram utilizados para preparar os mutantes de deleção:

hasm313mut + hasm3'mut:

5' gctccaccatgatatggacagggatag 3' (SEQ ID N°: 8)  
5' gccactgtgctggatatcgtaattaac 3' (SEQ ID N°: 9)

hasm396mut + hasm3'mut:

5' gctccaccatgacaaccaccatccagagtc 3' (SEQ ID N°: 10)

5' gccactgtgctggatatcgtaattaac 3' (SEQ ID N°: 9)

O par de iniciadores hasm313+hasm3'mut produziu a sequência idêntica de ADNc de comprimento total do clone 14b ou 7a mas numa grelha de leitura aberta iniciada a jusante das 313 pb (ATG). (A numeração é desde o ATG no clone de comprimento total). A sequência de consenso de Kozak foi incluída no iniciador directo para optimizar a tradução.

O par de iniciadores hasm396+hasm3'mut produziu a sequência idêntica de ADNc de comprimento total mas numa grelha de leitura aberta iniciada a jusante de 394 pb (ATG).

Os produtos de PCR foram ligados no pCR2.1 e a inserção de ADN sequenciada. Cada mutante de deleção foi digerido com EcoRI/EcoRV e subclonado em pcDNA3.1mychis digerido com EcoRI e EcoRV. Os clones de deleção NFIF-14b com a sequência correcta foram denominados pcDNAmychis 14-313 e pcDNAmychis 14-396. os clones de deleção NFIF-7a com a sequência correcta foram denominados pcDNAmychis 7-313 e pcDNAmychis 7-396.

A análise dos clones acima utilizando transcrição/tradução *in vitro* incorporando [<sup>35</sup>S metionina] na reacção [Promega TnT Quick Coupled Transcription Translation kit N° L1170] produziu bandas do tamanho esperado (NFIF 14b=51 kDa; NFIF 14-313=40 kDa; NFIF 14-396=37 kDa; NFIF 7a=41 kDa; NFIF 7-313=30 kDa; e NFIF 7-396=27 kDa) para grelhas de leitura aberta mais curtas. A facilidade de tradução foi importante para determinar antes da avaliação da actividade funcional e determinação que domínios foram importantes para a actividade.

**Exemplo 4 - Método para transfectar células com NFIF-14b ou NFIF-7a para produzir linhas celulares estáveis contendo plasmídeos**

Para preparar linhas celulares estáveis contendo NFIF-14b, NFIF-7a e os mutantes de deleção, placas Falcon de 6 poços foram semeadas com  $2 \times 10^5$  células HEK293 ou COS-7, as construções finalizadas do ADNC de NFIF pCDNAmychis7, pCDNAmychis7-313, pCDNAmychis7-396; pCDNAmychis14, pCDNAmychis14-313, pCDNAmychis14-396 (0,8 µg) em conjunto com o vector Stratagene pNFκB-Luc reporter gene (0,1 µg) e o vector Clontech EGFP (0,1 µg), foram transfectados utilizando 6 µL de Lipofectamina e 200 µL de Optimem em placas de 6 poços (com 800 µL de Optimem fresco/poço). A transfecção foi incubada durante 4 h a 37 °C e depois as placas foram supridas com meio completo (3 mL).

Às 24, 48 e 72 horas pós-transfecção os lisados foram preparados utilizando 200 µL de solução 1X Reporter Lysis Buffer (E397A-Promega). Os lisados foram incubados durante 20 minutos em gelo, submetidos a vórtice, depois centrifugados a 12000 rpm durante 5 minutos. O sobrenadante foi utilizado para avaliar a actividade de luciferase pelas instruções no kit Stratagene pNFκB-luc reporter gene.

Para preparar linhas celulares estáveis, os duplicados das culturas de 48 h acima foram divididas numa proporção de 1:100 em meio de crescimento completo em conjunto com G418 para a selecção de células que incorporaram os plasmídeos no seu ADN. Os clones celulares foram isolados e transferidos em placas de cultura de 48 poços para crescimento. Os clones foram

seleccionados de acordo com a sua actividade no ensaio repórter de luciferase de NFκB.

A actividade de luciferase foi medida a partir dos lisados das células de todas as linhas celulares infectadas de forma transiente. Foram adicionados 20 µL de lisado a uma placa de 96 poços Costar serocluster (Nº 3789) brancas de fundo redondo. Foram adicionados 100 µL de Reagente de Luciferase (Promega E1501) directamente antes da leitura da amostra num 1450 Microbeta Walko jet.

A análise dos resultados dos pontos de tempo de 24 horas, 48 horas, 72 horas identificou o ponto de tempo de 48 horas como o óptimo para avaliar a actividade. O controlo positivo para o ensaio foi uma estimulação de 24 horas com o factor de necrose de tumor ( $\alpha$ ) (TNF $\alpha$ ) das células um dia pós-transfecção com o vector pcDNA3.1mychis. Nas células HEK293, a transfecção transiente de ADNc de comprimento total de pcDNAmychis 7, pcDNAmychis14 demonstrou a contagem de luminómetro por segundo a ~3,1 vezes e ~2,1 vezes respectivamente, acima do vector apenas (Figura 5) e em células COS-7 (Figure 6) o clone pcDNAmychis 7 de comprimento total produziu um sinal 2,4 vezes e pcDNAmychis 14 um aumento de 2,3 vezes na contagem no luminómetro por segundo acima do vector apenas.

Os mutantes de deleção (pcDNAmychis 7-313, pcDNAmychis 7-396, pcDNAmychis 14-313 e pcDNAmychis 14-396) apresentaram actividade reduzida. Ensaios realizados noutros dias utilizando o ponto de tempo das 48 horas produziu variabilidade na resposta variando entre um aumento de 2-5 vezes para o clone 7 (comprimento total) e 2-4 vezes para o clone 14.

**Exemplo 5 – Identificação de Tecidos que Expressam ou Contêm  
Proteínas NFIF**

De modo a determinar que tecidos humanos expressam as proteínas NFIF, uma transferência de Northern pré-preparada da Clontech (Human 12 lane nº 7780-1) foi pesquisada com sondas aleatórias iniciadoras marcadas com p32 preparadas a partir de NFIF. Os resultados podem ser observados na Figura 8. Como a Figura 8 ilustra, a expressão de NFIF é particularmente evidente no músculo esquelético, rim, fígado e tecido da placenta.

De modo a determinar se a proteína NFIF estava associada com patologias incluindo ateroscleroze que envolve a inflamação e para identificar tecidos que podem ser tratados utilizando os métodos aqui descritos, um estudo imunocitoquímico foi efectuado utilizando um anticorpo monoclonal de coelho designado 99-06 dirigido contra um péptido antígeno (SKGANASNPGPFGDV) (SEQ ID NO.: 5) derivado dos resíduos 65 a 79 da proteína NFIF. O péptido foi sintetizado na escala de 0,25 mmole utilizando uma metodologia de fase sólida com um esquema de protecção com FMOC (9-fluorenilmetiloxicarbonil) em conjunto com a química de activação HOBT/HBTU (Fields et al., *Peptide Research*, 4:95-101 (1991)). Um Applied Biosystems 433 Peptide Synthesizer a realizar um ciclo de acoplamento Applied Biosystems Fast-Moc foi utilizado para a síntese do péptido.

O péptido foi clivado durante 1,5 horas à temperatura ambiente utilizando um reagente de clivagem de 82,5% de ácido trifluoroacético (TFA), 5% de fenol, 5% de H<sub>2</sub>O, 5% de tioanisole e 2,5% de etanoeditiol (King et al., *Intl. J. Peptide and Protein Research*, 36, 255-266 (1990)). Após a clivagem, o péptido foi precipitado com éter terc-butílico; lavado, depois

seco durante 1 hora sob vácuo. O péptido foi, então, solubilizado em 0,1% de TFA/água e purificado utilizando HPLC de fase reversa em C18. Um nível de pureza de >95% foi conseguido para o péptido, juntamente com dados correctos de peso molecular de MALDI-TOF.

10-30 mg de péptido purificado foram conjugados com hemocianina de lapa utilizando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC). A preparação foi dialisada contra PBS a 4 °C exaustivamente. A preparação hapteno/veículo foi misturada 1:1 com adjuvante Completo de Freunds e utilizada para injectar coelhos para a produção de anti-soros contra o péptido. O péptido de 15-resíduos foi utilizado para preparar anticorpos anti-NFIF em coelhos utilizando métodos convencionais conhecidos na técnica. Os coelhos foram imunizados por injecção subcutânea com uma emulsão de antígeno/adjuvante Completo de Freund (50% de solução de antígeno/50% de adjuvante Completo de Freund). O adjuvante completo de Freund (CFA) foi utilizado para a imunização inicial porque este adjuvante foi utilizado com muito sucesso na produção de respostas de anticorpo contra uma vasta gama de antígenos de proteína e péptido e a incidência de reacções adversas de mínima ou nenhuma. O esquema de injecção a seguir descrito foi optimizado para utilização com adjuvante de Freund. A área a ser injectada foi cortada de modo a permitir a avaliação visual de qualquer reacção na emulsão. Antes da injecção, os sítios de injecção foram lavados com solução de limpeza diluída Nolvasan. Os sítios de injecção foram nas costas começando entre as omoplatas. Os sítios de injecção foram amplamente separados e mantidos próximos da linha média para reduzir a possibilidade do animal arranhar os sítios de injecção. Tipicamente, 100 µL contendo 20 µg de antígeno foram injectados em 5 sítios subcutâneos por coelho num total de

100 µg/coelho. Injecções subsequentes, de reforço, foram dadas com 4 semanas de intervalo com uma emulsão de antigénio/adjuvante incompleto de Freund. Após seis semanas, 5-30 mL de sangue foi recolhido para determinar o título do anticorpo. Se o título de anticorpo não foi suficiente, foram dadas injecções adicionais de reforço com intervalo semanal e as amostras de sangue foram recolhidas em cada 2-4 semanas. Antes de cada injecção de antigénio, o estado dos sítios de injecção anteriores foram avaliados para reacções adversas. Os animais que produziram uma resposta de anticorpo positiva foram mantidos e reforçados e sangrados periodicamente de modo a produzir um grande stock de anti-soros.

As experiências de titulação do anticorpo foram conduzidas com Anticorpo 99-06 para estabelecer concentrações que produzem um sinal de ruído de fundo mínimo e detecção máxima. Um estudo de diluições seriadas demonstrou a maior proporção sinal-pararuído a uma diluição de 1:500 e 1:1000 e as lâminas foram incubadas com estas concentrações de anticorpo foram analisadas pelos patologistas. O anticorpo 99-06 foi utilizado como o anticorpo primário e o sistema principal de detecção consistiu de um Vector ABC-AP Kit (AK5002) com um kit Vector Red substrate que produziu um depósito vermelho cor fúcsia (SK-5100). Os tecidos foram também corados com um anticorpo de controlo positivo (CD31) dirigido contra o antigénio de leucócito humano (Stockinger et al., *J. Immunol.*, 145(11):3889-97 (1990)) para assegurar que os antigénios de tecido foram conservados e acessíveis para análise imunocitoquímica. Além disso, para amostras de artérias coronárias, os tecidos adicionais que foram corados e visualizados durante a Fase II deste estudo foram o baço normal, timo e nódulo linfático. A coloração foi efectuada no baço, timo e nódulo linfático de modo a auxiliar na

identificação de subconjuntos inflamatórios de células que expressam a proteína.

No baço, timo e nódulos linfáticos, o Anticorpo 99-06 apresentou uma forte coloração positiva nos linfócitos da bainha periarterial linfática, as cordas de Billroth, linfócitos tímicos corticais, células do centro germinal no nódulo linfático e no endotélio vascular e músculo liso. Outros tipos de células que coraram moderadamente a fortemente positivos com este anticorpo, incluíram células de Schwann e miócitos cardíacos. O sinal foi predominantemente nuclear nos tipos de células examinadas, excepto para granularidade citoplásrica que foi observada nas células do músculo liso e em macrófagos que foram preenchidos com resíduos celulares em regiões da placa ou de trombo em organização.

Nas artérias coronárias normais, o anticorpo foi amplamente negativo no endotélio da túnica íntima excepto para células ocasionais apresentando um sinal nuclear e células do músculo liso mioíntimo apresentaram sinais nucleares fracos. Na túnica média, o anticorpo foi moderadamente uniformemente positivo nas células do músculo liso. Na adventícia, o endotélio, células vasculares do músculo liso e inflamatórias foram moderadamente positivos para a coloração. As lamelas elásticas internas e externas foram negativas para a coloração.

Nas amostras de aterosclerose mínima, o endotélio apresentou: apenas sinais fracos ocasionais mesmo nas que cobriam o ateroma. No ateroma superficial, as células mioíntimas do músculo liso mostraram apenas sinais esbatidos. Em regiões mais profundas do ateroma, as formas fibroblásticas proliferativas e macrófagos espumosos apresentaram um nível de

coloração elevado. Em algumas amostras que apresentaram placas contendo colesterol e áreas de calcificação, as células do músculo liso e histiocitos espumantes que rodeiam as placas com colesterol e material calcificado apresentaram níveis elevados de coloração.

Nas amostras de aterosclerose moderada, o endotélio, o da túnica íntima e de áreas de neovascularização, mostraram uma coloração aumentada com o Anticorpo 99-06. As células inflamatórias marginais em conjunto com ou subjacentes ao endotélio foram fortemente positivas para a coloração. O endotélio que reveste novos vasos foi moderadamente a fortemente positivo para coloração e em áreas, os miofibroblastos subendoteliais foram menos positivos do que o endotélio associado. Em geral, as formas fibroblásticas de células mioíntimas foram muito menos positivas do que as formas proliferativas ou histiocíticas das células de músculo liso. Além disso, os macrófagos associados com colesterol, calcificação, ou macrófagos espumantes nas placas mostraram um nível aumentado de coloração. O músculo liso da túnica média foi quase uniformemente moderadamente positiva em todas as amostras em que a média estava intacta e o músculo liso nos vasos adventícios foi do mesmo modo positivo.

Em casos de aterosclerose grave, a maior parte do endotélio que reveste a túnica íntima foi desnudada ou o endotélio residual foi fracamente a moderadamente positivo para coloração. O infiltrado inflamatório associado a placa apresentou uma coloração positiva muito forte nos macrófagos e linfócitos, incluindo nas regiões de neovascularização. Foi também observada uma coloração aumentada em macrófagos e linfócitos adjacentes a ou circundantes de calcificações e colesterol e nas áreas de

trombos em organização. O endotélio que reveste novos vasos foi fortemente positivo nestas áreas. A intensidade de sinal aumentada foi de novo observada nas formas histiocíticas e proliferativas em comparação com formas fibroblásticas de células do músculo liso. Nestes casos, as células inflamatórias tais como um subconjunto de linfócitos, células do plasma e macrófagos na adventícia foram também fortemente positivos para a coloração.

Nas áreas de estádio tardio de aterosclerose grave com inflamação mínima e placas quiescentes, existia muito menos coloração. Nestas amostras, o endotélio foi menos intensivamente positivo para coloração, embora os linfócitos e macrofágicos residuais que envolvem material calcificado apresentaram coloração positiva.

#### **Material Biológico Útil na Prática da Invenção**

Um depósito de factor de indução de Nf<sub>κ</sub>B humano 7a (NFIF-7a) clonado a partir de uma biblioteca de ADNC de células de vasculares humanas do músculo liso subclonado no vector plasmídico pCR2.1 e um depósito de factor de indução de Nf<sub>κ</sub>B humano 14b (NFIF-14b) clonado a partir de uma biblioteca de ADNC de células de vasculares humanas do músculo liso subclonado no vector plasmídico pCR2.1 foram efectuados na American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, como indicado a seguir.

Estirpe/Plasmídeo	ATCC Nº	Data	de
		Depósito	
Factor de indução de NfκB humano 14B clonado a partir de uma biblioteca de ADNc de células de vasculares humanas do músculo liso subclonado no vector pCR2.1:NFIF14B	PTA-1596	29 de Março	de 2000
Factor de indução de NfκB humano 7A clonado a partir de uma biblioteca de ADNc de células de vasculares humanas do músculo liso subclonado no vector pCR2.1:NFIF7A	PTA-1597	29 de Março	de 2000

---

#### LSITAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Aventis Pharmaceuticals Inc

<120> FACTOR INDUTOR DO FACTOR NUCLEAR KB

<130> 40/604/P/EP

<140> 01920925.3 (PCT/US01/10719)

<141> 2000-03-31

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 453

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Met Ala Leu Val Arg Ala Leu Val Cys Cys Leu Leu Thr Ala Trp His			
1	5	10	15
Cys Arg Ser Gly Leu Gly Leu Pro Val Ala Pro Ala Gly Gly Arg Asn			
20	25	30	
Pro Pro Pro Ala Ile Gly Gln Phe Trp His Val Thr Asp Leu His Leu			
35	40	45	
Asp Pro Thr Tyr His Ile Thr Asp Asp His Thr Lys Val Cys Ala Ser			
50	55	60	
Ser Lys Gly Ala Asn Ala Ser Asn Pro Gly Pro Phe Gly Asp Val Leu			
65	70	75	80
Cys Asp Ser Pro Tyr Gln Leu Ile Leu Ser Ala Phe Asp Phe Ile Lys			
85	90	95	
Asn Ser Gly Gln Glu Ala Ser Phe Met Ile Trp Thr Gly Asp Ser Pro			
100	105	110	
Pro His Val Pro Val Pro Glu Leu Ser Thr Asp Thr Val Ile Asn Val			
115	120	125	
Ile Thr Asn Met Thr Thr Ile Gln Ser Leu Phe Pro Asn Leu Gln			
130	135	140	
Val Phe Pro Ala Leu Gly Asn His Asp Tyr Trp Pro Gln Asp Gln Leu			
145	150	155	160

Ser Val Val Thr Ser Lys Val Tyr Asn Ala Val Ala Asn Leu Trp Lys  
165 170 175

Pro Trp Leu Asp Glu Glu Ala Ile Ser Thr Leu Arg Lys Gly Gly Phe  
180 185 190

Tyr Ser Gln Lys Val Thr Thr Asn Pro Asn Leu Arg Ile Ile Ser Leu  
195 200 205

Asn Thr Asn Leu Tyr Tyr Gly Pro Asn Ile Met Thr Leu Asn Lys Thr  
210 215 220

Asp Pro Ala Asn Gln Phe Glu Trp Leu Glu Ser Thr Leu Asn Asn Ser  
225 230 235 240

Gln Gln Asn Lys Glu Lys Val Tyr Ile Ile Ala His Val Pro Val Gly  
245 250 255

Tyr Leu Pro Ser Ser Gln Asn Ile Thr Ala Met Arg Glu Tyr Tyr Asn  
260 265 270

Glu Lys Leu Ile Asp Ile Phe Gln Lys Tyr Ser Asp Val Ile Ala Gly  
275 280 285

Gln Phe Tyr Gly His Thr His Arg Asp Ser Ile Met Val Leu Ser Asp  
290 295 300

Lys Lys Gly Ser Pro Val Asn Ser Leu Phe Val Ala Pro Ala Val Thr  
305 310 315 320

Pro Val Lys Ser Val Leu Glu Lys Gln Thr Asn Asn Pro Gly Ile Arg  
325 330 335

Leu Phe Gln Tyr Asp Pro Arg Asp Tyr Lys Leu Leu Asp Met Leu Gln  
340 345 350

Tyr Tyr Leu Asn Leu Thr Glu Ala Asn Leu Lys Gly Glu Ser Ile Trp  
355 360 365

Lys Leu Glu Tyr Ile Leu Thr Gln Thr Tyr Asp Ile Glu Asp Leu Gln  
370                    375                    380

Pro Glu Ser Leu Tyr Gly Leu Ala Lys Gln Phe Thr Ile Leu Asp Ser  
385                    390                    395                    400

Lys Gln Phe Ile Lys Tyr Tyr Asn Tyr Phe Phe Val Ser Tyr Asp Ser  
405                    410                    415

Ser Val Thr Cys Asp Lys Thr Cys Lys Ala Phe Gln Ile Cys Ala Ile  
420                    425                    430

Met Asn Leu Asp Asn Ile Ser Tyr Ala Asp Cys Leu Lys Gln Leu Tyr  
435                    440                    445

Ile Lys His Asn Tyr  
450

<210> 2  
<211> 364  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

Met Ala Leu Val Arg Ala Leu Val Cys Cys Leu Leu Thr Ala Trp His  
1                    5                    10                    15

Cys Arg Ser Gly Leu Gly Leu Pro Val Ala Pro Ala Gly Gly Arg Asn  
20                    25                    30

Pro Pro Pro Ala Ile Gly Gln Phe Trp His Val Thr Asp Leu His Leu  
35                    40                    45

Asp Pro Thr Tyr His Ile Thr Asp Asp His Thr Lys Val Cys Ala Ser  
50 55 60

Ser Lys Gly Ala Asn Ala Ser Asn Pro Gly Pro Phe Gly Asp Val Leu  
65 70 75 80

Cys Asp Ser Pro Tyr Gln Leu Ile Leu Ser Ala Phe Asp Phe Ile Lys  
85 90 95

Asn Ser Gly Gln Glu Ala Ser Phe Met Ile Trp Thr Gly Asp Ser Pro  
100 105 110

Pro His Val Pro Val Pro Glu Leu Ser Thr Asp Thr Val Ile Asn Val  
115 120 125

Ile Thr Asn Met Thr Thr Ile Gln Ser Leu Phe Pro Asn Leu Gln  
130 135 140

Val Phe Pro Ala Leu Gly Asn His Asp Tyr Trp Pro Gln Val Tyr Ile  
145 150 155 160

Ile Ala His Val Pro Val Gly Tyr Leu Pro Ser Ser Gln Asn Ile Thr  
165 170 175

Ala Met Arg Glu Tyr Tyr Asn Glu Lys Leu Ile Asp Ile Phe Gln Lys  
180 185 190

Tyr Ser Asp Val Ile Ala Gly Gln Phe Tyr Gly His Thr His Arg Asp  
195 200 205

Ser Ile Met Val Leu Ser Asp Lys Lys Gly Ser Pro Val Asn Ser Leu  
210 215 220

Phe Val Ala Pro Ala Val Thr Pro Val Lys Ser Val Leu Glu Lys Gln  
225 230 235 240

Thr Asn Asn Pro Gly Ile Arg Leu Phe Gln Tyr Asp Pro Arg Asp Tyr  
245 250 255

Lys Leu Leu Asp Met Leu Gln Tyr Tyr Leu Asn Leu Thr Glu Ala Asn  
 260 265 270  
 Leu Lys Gly Glu Ser Ile Trp Lys Leu Glu Tyr Ile Leu Thr Gln Thr  
 275 280 285  
 Tyr Asp Ile Glu Asp Leu Gln Pro Glu Ser Leu Tyr Gly Leu Ala Lys  
 290 295 300  
 Gln Phe Thr Ile Leu Asp Ser Lys Gln Phe Ile Lys Tyr Tyr Asn Tyr  
 305 310 315 320  
 Phe Phe Val Ser Tyr Asp Ser Ser Val Thr Cys Asp Lys Thr Cys Lys  
 325 330 335  
 Ala Phe Gln Ile Cys Ala Ile Met Asn Leu Asp Asn Ile Ser Tyr Ala  
 340 345 350  
 Asp Cys Leu Lys Gln Leu Tyr Ile Lys His Asn Tyr  
 355 360

<210> 3

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

```

atggcgctgg tgcgcgcaact cgtctgctgc ctgctgactg cctggcactg ccgctccggc 60
ctcgggctgc ccgtggcgcc cgccaggcggc aggaatcctc ctccggcgat aggacagttt 120
tggcatgtga ctgacttaca ctttagaccct acttaccaca tcacagatga ccacacaaaa 180
gtgtgtgctt catctaaagg tgcaaattgcc tccaaacctg gccctttgg agatgttctg 240
tgtgattctc catatcaact tattttgtca gcatttgatt ttattaaaaaa ttctggacaa 300
gaagcatctt tcatgatatg gacaggggat agcccacctc atgttcctgt acctgaactc 360
tcaacagaca ctgttataaa tgtgatcaact aatatgacaa ccaccatcca gagtctctt 420
ccaaatctcc aggtttcccc tgcgctgggt aatcatgact attggccaca ggatcaactg 480

```

tctgtagtca ccagtaaagt gtacaatgca gtagcaaacc tctggaaacc atggctagat 540  
gaagaagcta ttagtacttt aaggaaaggt ggaaaaattt cacagaaagt tacaactaat 600  
ccaaaccta ggatcatcag tctaaacaca aacttgtact acggcccaaataatgaca 660  
ctgaacaaga ctgacccagc caaccagttt gaatggctag aaagtacatt gaacaactct 720  
cagcagaata aggagaaggt gtatatcata gcacatgttc cagtgggta tctgccatct 780  
tcacagaaca tcacagcaat gagagaatac tataatgaga aattgataga tattttcaa 840  
aaatacagtg atgtcattgc aggacaattt tatggacaca ctcacagaga cagcattatg 900  
gttcttcag ataaaaaagg aagtccagta aatttttgt ttgtggctcc tgctgttaca 960  
ccagtgaaga gtgtttaga aaaacagacc aacaatcctg gtatcagact gtttcagttat 1020  
gatcctcgtg attataaattt attggatatg ttgcagtatt acttgaatct gacagaggcg 1080  
aatctaaagg gagagtccat ctgaaagctg gagtatatcc tgacccagac ctacgacatt 1140  
gaagattgc agccggaaag tttatatgga ttagctaaac aatttacaat cctagacagt 1200  
aagcagttta taaaatacta caattacttc tttgtgagtt atgacagcag tgtaacatgt 1260  
gataagacat gtaaggcctt tcagatttgt gcaattatga atcttgataa tatttcctat 1320  
gcagattgcc tcaaacagct ttatataaag cacaattact ag 1362

<210> 4

<211> 1095

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

atggcgctgg tgcgcgcact cgtctgctgc ctgctgactg cctggcactg ccgctccggc 60  
ctcgggctgc ccgtggcgcc cgcaaggcgcc aggaatcctc ctccggcgat aggacagttt 120  
tggcatgtga ctgacttaca cttagaccctt acttaccaca tcacagatga ccacacaaaa 180  
gtgtgtgctt catctaaagg tgcaaattgcc tccaaccctg gccctttgg agatgttctg 240  
tgtgattctc catatcaact tattttgtca gcatttgatt ttattaaaaa ttctggacaa 300  
gaagcatctt tcatgatatg gacaggggat agcccacctc atgttcgtt acctgaactc 360  
tcaacagaca ctgttataaa tgtgatcact aatatgacaa ccaccatcca gagtctctt 420

ccaaatctcc aggtttccc tgcgctgggt aatcatgact attggccaca ggtgtatatc 480  
atagcacatg ttccagtgg gtatctgcca tcttcacaga acatcacagc aatgagagaa 540  
tactataatg agaaatrgat agatatttt caaaagtaca gtgatgtcat tgcaggacaa 600  
tttatggac acactcacag agacagcatt atggttctt cagataaaaa aggaagtcca 660  
gtaaattctt tggttgcc tcctgctgtt acaccagtga agagtgtttt agaaaaacag 720  
accaacaatc ctggtatcag actgtttcag tatgatcctc gtgattataa attattggat 780  
atgtgcagt attacttcaa tctgacagag gcgaatctaa agggagagtc catctggaag 840  
ctggagtata tcctgaccca gacctacgac attgaagatt tgcagccgga aagtttatat 900  
ggatttagcta aacaatttac aatcctagac agtaagcagt ttataaaata ctacaattac 960  
ttcttgtga gttatgacag cagtgtaca tgtgataaga catgtaaaggc ctttcagatt 1020  
tgtgcaatta tgaatcttga taatattcc tatgcagatt gcctcaaaca gctttatata 1080  
aagcacaatt actag 1095

<210> 5

<211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 5

Ser	Lys	Gly	Ala	Asn	Ala	Ser	Asn	Pro	Gly	Pro	Phe	Gly	Asp	Val
1														15

<210> 6

<211> 27

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência Artificial: Baseada em NFIF-14b e  
NFIF-7a mas com a sequência Kozak 5' a ATG

<400> 6

tccaccatgg cgctggtgcg cgca

27

<210> 7

<211> 33

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição da sequência Artificial: Baseada em NFIF-14b e  
NFIF-7a mas com um sítio ECORV adicionado na extremidade

<400> 7

gtcgaaatat atttcgtgtt aatgctatag gtc

33

<210> 8

<211> 28

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Descrição da Sequência artificial: Baseada em NFIF-14b e  
NFIF-7a mas com a sequência Kozak 5' a ATG

<400> 8  
gctccaccat gatatggaca gggatag 28

<210> 9  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Sequência Artificial

<220>  
<223> Descrição da Sequência Artificial: Baseada em NFIF-14b e NFIF-7a mas com um sítio ECORV adicionado na extremidade

<400> 9  
gccactgtgc tggatatcgt aatthaac 27

<211> 30  
<212> ADN  
<213> Sequência Artificial

<220>  
<223> Descrição da Sequência Artificial: Baseada em NFIF-14b e NFIF-7a mas com a sequência Kozak 5' a ATG

<400> 10  
gctccaccat gacaaccacc atccagagtc 30

Lisboa, 29 de Dezembro de 2010

## **REIVINDICAÇÕES**

1. Ácido nucleico que codifica o polipéptido NFIF (Factor Indutor do Factor Nuclear)-14b compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 1.
2. Ácido nucleico que codifica o polipéptido NFIF (Factor Indutor do Factor Nuclear)-7a compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 2.
3. Ácido nucleico da Reivindicação 1, em que o referido ácido nucleico é um ADNc.
4. Ácido nucleico da Reivindicação 2, em que o referido ácido nucleico é um ADNc.
5. Péptido NFIF (Factor Indutor do Factor Nuclear)-14b isolado e purificado que induz NFκB e compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID N°: 1.
6. Péptido NFIF (Factor Indutor do Factor Nuclear)-7a isolado e purificado que induz NFκB e compreendendo uma sequência de aminoácidos da SEQ ID N°: 2.
7. Vector de expressão compreendendo um ácido nucleico da reivindicação 1 ligado operacionalmente a uma sequência de controlo.
8. Vector de expressão da Reivindicação 7, em que o referido vector de expressão é seleccionado do grupo consistindo em vectores retrovirais, vectores adenovirais, vectores virais

adeno-associados, vectores herpesvirais e vectores de ADN  
nus.

9. Vector de expressão compreendendo um ácido nucleico da reivindicação 2 ligado operacionalmente a uma sequência de controlo.
10. Vector de expressão da Reivindicação 9, em que o referido vector de expressão é seleccionado do grupo consistindo em vectores retrovirais, vectores adenovirais, vectores virais adeno-associados, vectores herpesvirais e vectores de ADN  
nus.
11. Composição compreendendo um péptido NFIF (Factor Indutor do Nuclear Factor)-14b, em que o referido polipéptido induz NF<sub>κ</sub>B e comprehende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 1 e um veículo farmaceuticamente aceitável.
12. Composição compreendendo uma péptido NFIF (Factor Indutor do Factor Nuclear)-7<sup>a</sup>, em que o referido polipéptido induz NF<sub>κ</sub>B e comprehende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 2 e um veículo farmaceuticamente aceitável.
13. Composição compreendendo um ácido nucleico anti-sentido complementar a um ácido nucleico que codifica um polipéptido NFIF (Factor Indutor do Factor Nuclear)-14b e/ou NFIF-7a seleccionado do grupo consistindo em SEQ ID N°: 1 e 2.

14. Composição compreendendo um anticorpo neutralizante que se liga ao polipéptido NFIF (Factor Indutor do Factor Nuclear)-14b e/ou NFIF-7a seleccionado do grupo consistindo em SEQ ID Nº: 1 e 2 e diminui a sua actividade.
15. Composição compreendendo uma ribozima que corta o ARN que codifica um polipéptido NFIF (Factor Indutor do Factor Nuclear)-14b e/ou NFIF-7a seleccionado do grupo consistindo em SEQ ID Nº: 1 e 2.
16. Método para avaliar se um composto de teste é eficaz na inibição da actividade de NFIF (Factor Indutor do Factor Nuclear)-14b com base na expressão de um gene repórter regulado por NFkB compreendendo:
  - (A) comparar o nível de expressão do gene regulado por NFkB numa primeira amostra compreendendo: (1) uma sequência de aminoácidos compreendendo SEQ ID Nº: 1; (2) o referido gene repórter regulado por NFkB; e (3) o referido composto de teste com o nível de expressão do gene repórter regulado por NFkB numa segunda amostra compreendendo (4) uma sequência de aminoácidos compreendendo SEQ ID Nº: 1; e (5) o referido gene repórter regulado por NFkB; e
  - (B) determinar se a expressão do referido gene repórter regulado por NFkB é inferior na referida primeira amostra em relação à referida segunda amostra.
17. Método para avaliar se um composto de teste é eficaz na inibição da actividade de NFIF (Factor Indutor do Factor Nuclear)-7a com base na expressão de um gene repórter regulado por NFkB compreendendo:

(A) comparar o nível de expressão do gene regulado por NF $\kappa$ B numa primeira amostra compreendendo: (1) uma sequência de aminoácidos compreendendo SEQ ID N°: 2; (2) o referido gene repórter regulado por NF $\kappa$ B; e (3) o referido composto de teste com o nível de expressão do gene repórter regulado por NF $\kappa$ B numa segunda amostra compreendendo: (4) uma sequência de aminoácidos compreendendo SEQ ID N°: 2; e (5) o referido gene repórter regulado por NF $\kappa$ B; e

(B) determinar se a expressão do referido gene repórter regulado por NF $\kappa$ B é inferior na referida primeira amostra em relação à referida segunda amostra.

18. Método para identificar se um composto de teste pode aumentar a actividade de NFIF (Factor Indutor do Factor Nuclear)-14b com base na expressão de um gene repórter regulado por NF $\kappa$ B compreendendo:

(A) comparar o nível de expressão do gene regulado por NF $\kappa$ B numa primeira amostra compreendendo (1) uma sequência de aminoácidos compreendendo SEQ ID N°: 1; (2) o referido gene repórter regulado por NF $\kappa$ B; e (3) o referido composto de teste com o nível de expressão do gene repórter regulado por NF $\kappa$ B numa segunda amostra compreendendo: (4) uma sequência de aminoácidos compreendendo SEQ ID N°: 1; e (5) o referido gene repórter regulado por NF $\kappa$ B; e

(B) determinar se a expressão do referido gene repórter regulado por NF $\kappa$ B é superior na referida primeira amostra em relação à referida segunda amostra.

19. Método para identificar compostos que aumentam a actividade de NFIF (Factor Indutor do Factor Nuclear)-7a com base na expressão de um gene repórter regulado por NFκB compreendendo:
- (A) comparar o nível de expressão do gene regulado por NFκB numa primeira amostra compreendendo: (1) uma sequência de aminoácidos compreendendo SEQ ID N°: 2; (2) o referido gene repórter regulado por NFκB; e (3) o referido composto de teste com o nível de expressão do gene repórter regulado por NFκB numa segunda amostra compreendendo: (4) uma sequência de aminoácidos compreendendo SEQ ID N°: 2; e (5) o referido gene repórter regulado por NFκB; e
- (B) determinar se a expressão do referido gene repórter regulado por NFκB é superior na referida primeira amostra em relação à referida segunda amostra.
20. Utilização de um polipéptido NFIF (Factor Indutor do Factor Nuclear) isolado compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 1 para a preparação de um medicamento pretendido para o tratamento e/ou prevenção de uma resposta inflamatória regulada por NFκB.
21. Utilização de um ácido nucleico que codifica um polipéptido NFIF (Factor Indutor do Factor Nuclear) compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 1 para a preparação de um medicamento pretendido para o tratamento e/ou prevenção de uma resposta inflamatória regulada por NFκB.

22. Utilização de um vector recombinante compreendendo um ácido nucleico que codifica um polipéptido NFIF (Factor Indutor do Nuclear Factor) compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID Nº: 1 para a preparação de um medicamento pretendido para o tratamento e/ou prevenção de uma resposta inflamatória regulada por NFκB.
23. Utilização de um vector viral recombinante deficiente compreendendo um ácido nucleico que codifica um polipéptido NFIF (Factor Indutor do Factor Nuclear) compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID Nº: 1 para a preparação de um medicamento pretendido para o tratamento e/ou prevenção de uma resposta inflamatória regulada por NFκB.
24. Utilização de polipéptido NFIF (Factor Indutor do Factor Nuclear) isolado compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID Nº: 2 para a preparação de um medicamento pretendido para o tratamento e/ou prevenção de uma resposta inflamatória regulada por NFκB.
25. Utilização de um ácido nucleico que codifica um polipéptido NFIF (Factor Indutor do Factor Nuclear) compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID Nº: 2 para a preparação de um medicamento pretendido para o tratamento e/ou prevenção de uma resposta inflamatória regulada por NFκB.
26. Utilização de um vector recombinante compreendendo um ácido nucleico que codifica um polipéptido NFIF (Factor Indutor do Factor Nuclear) compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID Nº: 2 para a preparação de um medicamento pretendido para o tratamento e/ou prevenção de uma resposta inflamatória regulada por NFκB.

27. Utilização de um vector viral recombinante deficiente compreendendo um ácido nucleico que codifica um polipéptido NFIF (Factor Indutor do Factor Nuclear) compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 2 para a preparação de um medicamento pretendido para o tratamento e/ou prevenção de uma resposta inflamatória regulada por NFkB.
28. Célula em cultura compreendendo o vector da reivindicação 8 ou 10.
29. Célula em cultura transfetada com o vector da reivindicação 8 ou 10, em que a célula expressa o referido polipéptido compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 1 ou 2.
30. Composição farmacêutica, compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma sequência de ácido nucleico isolado capaz de ser expresso que codifica uma sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 1 ou 2, e um veículo farmaceuticamente aceitável.
31. Composição farmacêutica, compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um vector recombinante compreendendo uma sequência de ácido nucleico capaz de ser expressa que codifica uma sequência de aminoácidos de SEQ ID N°: 1 ou 2, e um veículo farmaceuticamente aceitável.
32. Composição farmacêutica, compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um vector viral recombinante deficiente compreendendo uma sequência de ácido nucleico capaz de ser expressa que codifica uma sequência de

aminoácidos de SEQ ID N°: 1 ou 2, e um veículo farmaceuticamente aceitável.

Lisboa, 29 de Dezembro de 2010

Plasmídeo: **NFIF14B**  
 Aminoácidos: **453**

MALVRALVCCLLTAWHCRSG	20
LGLPVAPAGGRNPPPAIGQF	40
WHVTDLHLDPTYHITDDHTK	60
VCASSKGANASNPGPFGDVL	80
CDSPYQLILSAFDIKNSGQ	100
EASFMIWTGDSPPHVVPVEL	120
STDIVINVITNMTTIQSLF	140
PNLQVFPAALGNHDYWPQDQL	160
SVVTSKVYNNAVANLWKPWLD	180
EEAISTLRKGGFYSQKVTTN	200
PNLRIISLNTNLYYGPNIMT	220
LNKTDPANQFEWLESTLNNS	240
QQNKEKVYIIAHVPVGYLPS	260
SQNITAMREYYNEKLIDIFQ	280
KYSDVIAGQFYGHTHRDSIM	300
VLSDKKGSPVNSLFVAPAVT	320
PVKSVLEKQTNNPGIRLFQY	340
DPRDYKLLDMLQYYLNLTEA	360
NLKGESIWKLEYILTQTYDI	380
EDLQPESLYGLAKQFTILDS	400
KQFIKYNYFFVSYDSSVTC	420
DKTCKAFQICAIMNLDNISY	440
ADCLKQLYIKHNY	460

## FIGURA 1

Plasmídeo:	<b>NFIF7A</b>
Aminoácidos:	<b>364</b>
MALVRALVCCLLTAWHCRSG	20
LGLPVAPAGGRNPPPAIGQF	40
WHVTDLHLDPTYHITDDHTK	60
VCASSKGANASNPAGPFGDVL	80
CDSPYQLILSAFDIKNNSGQ	100
EASFMIWTGDSPPHVPVPEL	120
STDIVINVITNMTTIQSLF	140
PNLQVFPALGNHDYWPQVYI	160
IAHVPVGYPSSQNITAMRE	180
YYNEKLIDIFQKYSDVIAGQ	200
FYGHTHRDSIMVLSDDKGSP	220
VNSLFVAPAVTPVKSVLEKQ	240
TNNPGIRLFQYDPRDYKLLD	260
MLQYYLNLTEANLKGESIWK	280
LEYILTQTYDIEDLQPESLY	300
GLAKQFTILDSDKQFIKYNY	320
FFVSYDSSVTCDKTCKAFQI	340
CAIMNLDNISYADCLKQLYI	360
KHNY	380

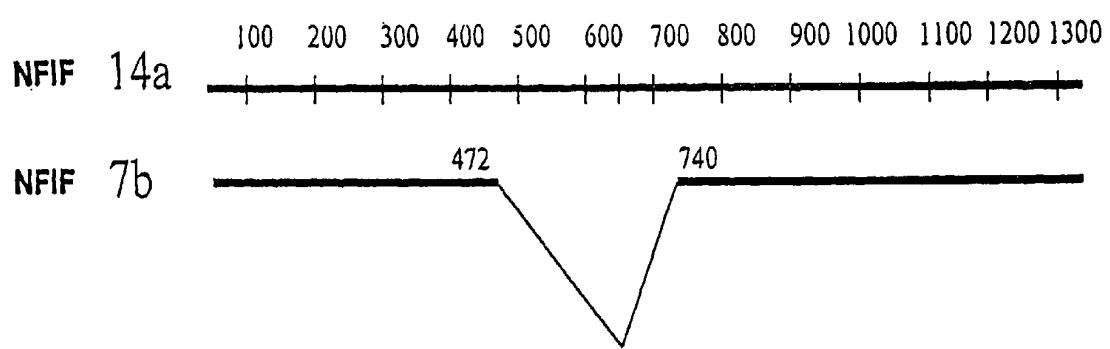
**FIGURA 2**

1 ATGGCGCTGGTGCGCGCACTCGTCTGCTGCCTGACTGCCCTGGCACTG NFIF14B  
 1 ATGGCGCTGGTGCGCGCACTCGTCTGCTGCCTGACTGCCCTGGCACTG NFIF7A  
 51 CCCGCTCCGGGCTCGGGCTGCCCGTGGCGCCCGCAGGGCGGGCAGGAATCCTC NFIF14B  
 51 CCCGCTCCGGCCTCGGGCTGCCCGTGGCGCCCGCAGGGCGGGCAGGAATCCTC NFIF7A  
 101 CTCCCGGCATAAGGACAGTTTGGCATGTGACTGACTTACACTTAGACCCCT NFIF14B  
 101 CTCCCGGCATAAGGACAGTTTGGCATGTGACTGACTTACACTTAGACCCCT NFIF7A  
 151 ACTTACCAACATCACAGATGACCCACACAAAGTGTGTGCTTCATCTAAAGG NFIF14B  
 151 ACTTACCAACATCACAGATGACCCACACAAAGTGTGTGCTTCATCTAAAGG NFIF7A  
 201 TGCAAAATGCCTCCAAACCCCTGGCCCTTTGGAGATGTTCTGTTGATTCCTC NFIF14B  
 201 TGCAAAATGCCTCCAAACCCCTGGCCCTTTGGAGATGTTCTGTTGATTCCTC NFIF7A  
 251 CATATCAACTTATTTGTCAAGCATTTGATTTTATTAAAAATTCTGGACAA NFIF14B  
 251 CATATCAACTTATTTGTCAAGCATTTGATTTTATTAAAAATTCTGGACAA NFIF7A  
 301 GAAGCATCTTCATGATATGGACAGGGGATAGCCCACCTCATGTTCCGT NFIF14B  
 301 GAAGCATCTTCATGATAAGGACAGGGGATAGCCCACCTCATGTTCCGT NFIF7A  
 351 ACCTGAACTCTCAACAGACACTGTTATAAATGTGATCACTAAATGACAA NFIF14B  
 351 ACCTGAACTCTCAACAGACACTGTTATAAATGTGATCACTAAATGACAA NFIF7A  
 401 CCACCATCCAGAGTCTCTTCAAATCTCCAGGTTTCCCTGCGCTGGGT NFIF14B  
 401 CCACCATCCAGAGTCTCTTCAAATCTCCAGGTTTCCCTGCGCTGGGT NFIF7A  
 451 AATCATGACTATTGGCCACAGGGATCAACCTGTCGTAGTCACCAGTAAGT NFIF14B  
 451 AATCATGACTATTGGCCACAGGG----- NFIF7A  
 501 GTACAATGCAGTAGCAAACCTCTGGAAACCATGGCTAGATGAAGAAGCTA NFIF14B  
 473 ----- NFIF7A  
 551 TTAGTACTTTAAGGAAAGGTGGTTTTATTCAACAGAAAGTTACAACTAAT NFIF14B  
 473 ----- NFIF7A  
 601 CCRAACCTTACGGATCATCAGTCATAACACAAACCTGTTACTACGGCCCAA NFIF14B  
 473 ----- NFIF7A  
 651 TATAATGACACTGARCAAGACTGACCCAGCCAAACCAAGTTGAATGGCTAG NFIF14B  
 473 ----- NFIF7A  
 701 AAAGTACATTGAAACACTCTCAGCAGAAATAAGGAGAAGGTGTATATCATA NFIF14B  
 473 ----- TGATATCATA NFIF7A  
 751 GCACATGTTCCAGTGGGTATCTGCCATCTTCACAGAACATCACAGCAAT NFIF14B  
 484 GCACATGTTCCAGTGGGTATCTGCCATCTTCACAGAACATCACAGCAAT NFIF7A  
 801 GAGAGAATACTATAATGAGAAATTGATAGATATTTCACAAATAACAGTG NFIF14B  
 334 GAGAGAATACTATAATGAGAAATTGATAGATATTTCACAAAGTACAGTG NFIF7A  
 851 ATGTCATTGCAGGACAAATTCTATGGACACACTCACAGAGACAGCATTTG NFIF14B  
 384 ATGTCATTGCAGGACAAATTCTATGGACACACTCACAGAGACAGCATTTG NFIF7A  
 901 GTTCTTCAGATAAAAAGGAAGTCCAGTAAATTCTTGTGTTGCTCC NFIF14B  
 634 GTTCTTCAGATAAAAAGGAAGTCCAGTAAATTCTTGTGTTGCTCC NFIF7A

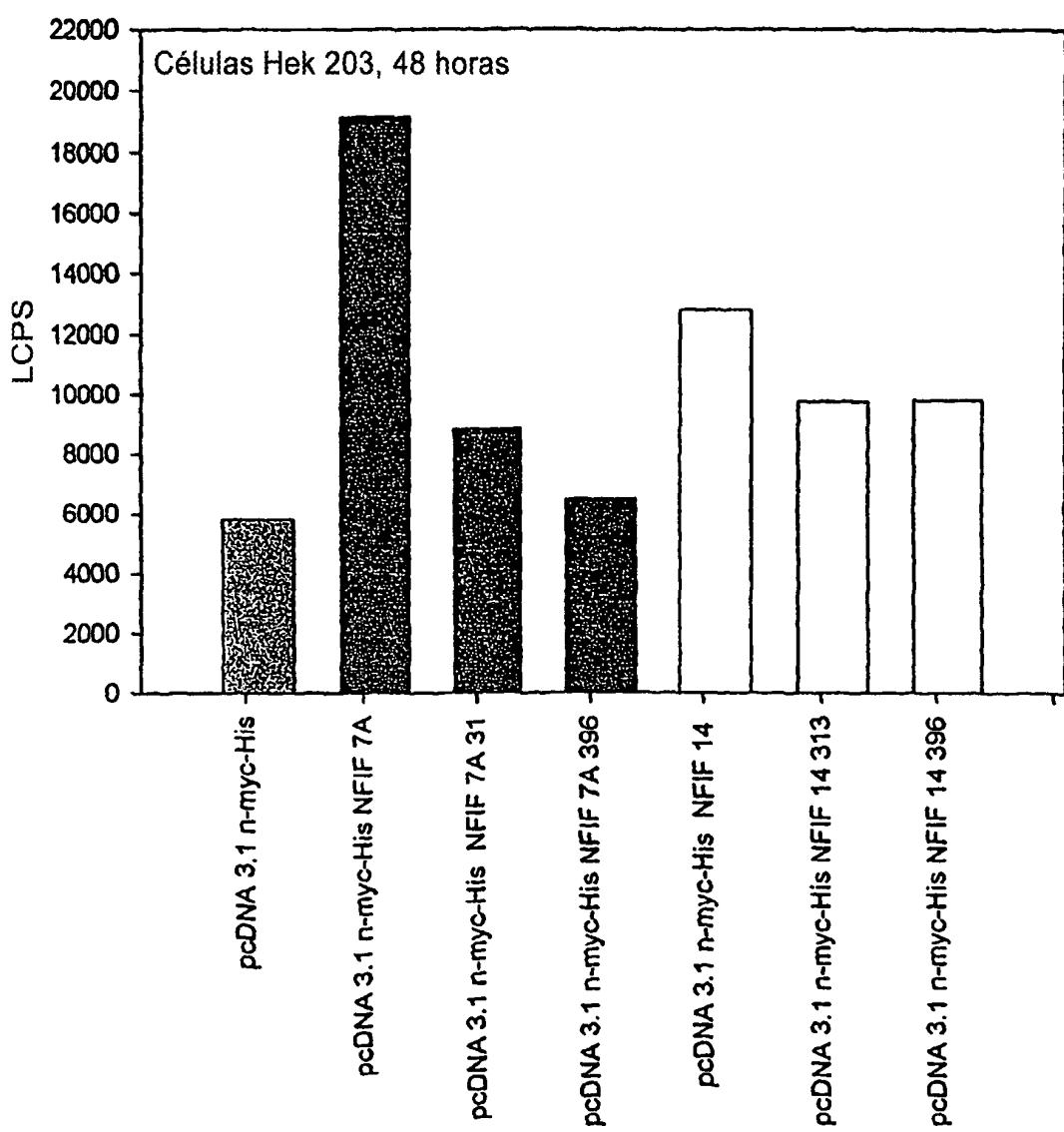
FIGURA 3

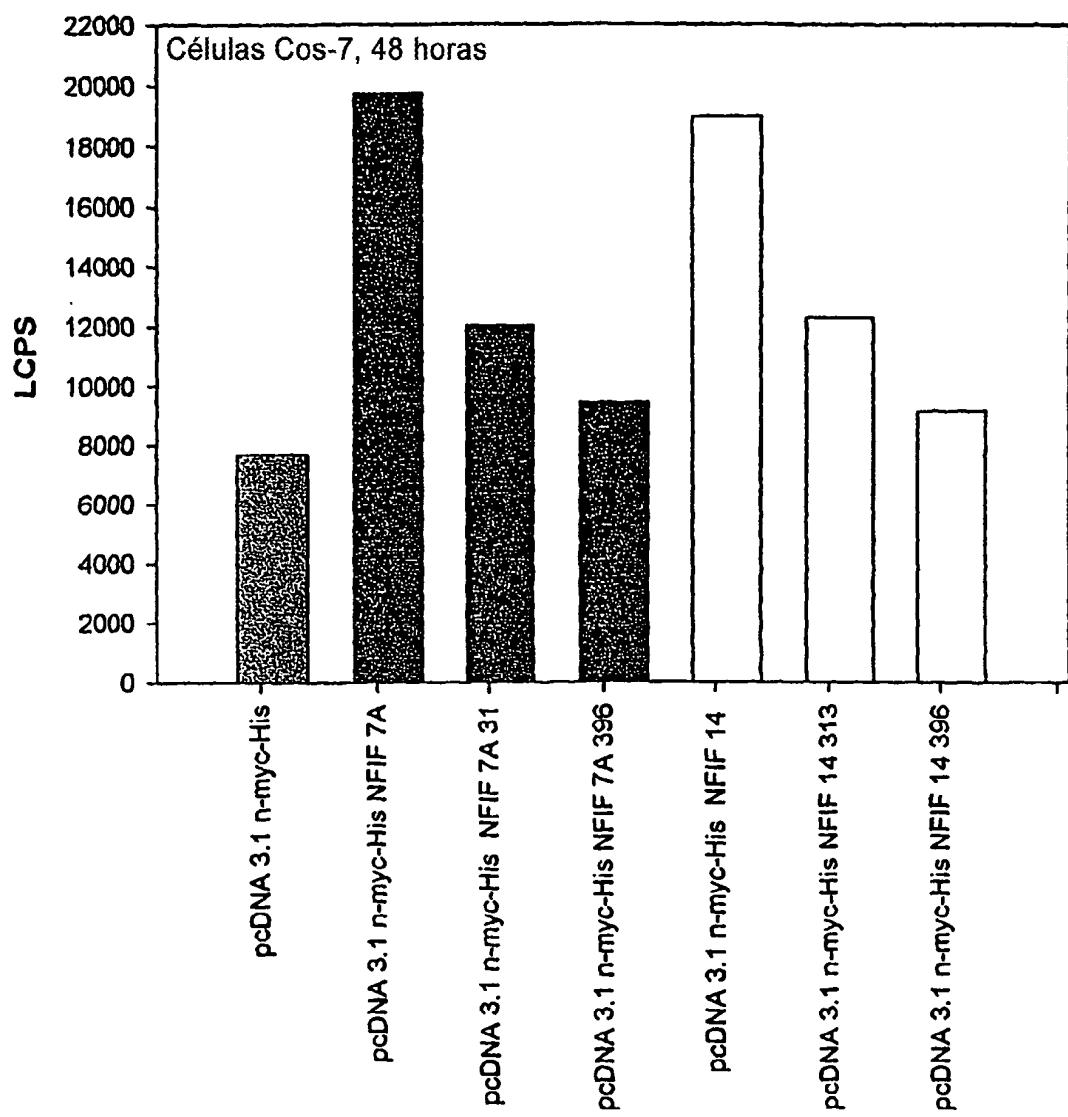
951	TGCTGTTACACCAAGTGAAGAGTGT	TTTAGA	AAACAGACCAACAAATCCTG	NFIF14B
684	TGCTGTTACACCAAGTGAAGAGTGT	TTTAGA	AAACAGACCAACAAATCCTG	NFIF7A
1001	GATATCAGACTGTTCA	GATGATCGCTCGTGATTATA	AAATTATGGATATG	NFIF14B
734	GATATCAGACTGTTCA	GATGATCGCTCGTGATTATA	AAATTATGGATATG	NFIF7A
1051	TTGCAGTATTACTTGA	ATCTGACAGAGGCCAATCTAA	AGGGAGAGTC	CATNFIF14B
784	TTGCAGTATTACTTGA	ATCTGACAGAGGCCAATCTAA	AGGGAGAGTC	CATNFIF7A
1101	CTGGAAAGCTGGAGT	ATATCC	TGACCCAGACCTACGACATTG	AAGATTTGCNFIF14B
634	CTGGAAAGCTGGAGT	ATATCC	TGACCCAGACCTACGACATTG	AAGATTTGCNFIF7A
1151	AGCCGGAAAGTT	TATATGGATTAGCT	AAACAAATTACAATCCTAGACAGT	NFIF14B
884	AGCCGGAAAGTT	TATATGGATTAGCT	AAACAAATTACAATCCTAGACAGT	NFIF7A
1201	AAAGCAGTT	TATAAAATACTACAATTACT	TCTTGTGAGTTATGACAGCAG	NFIF14B
934	AAAGCAGTT	TATAAAATACTACAATTACT	TCTTGTGAGTTATGACAGCAG	NFIF7A
1251	TGTAACATGTGATA	AAAGACATGTAA	GGCCCTTCAGATTTGTGCAATTATG	A NFIF14B
984	TGTAACATGTGATA	AAAGACATGTAA	GGCCCTTCAGATTTGTGCAATTATG	A NFIF7A
1301	ATCTTGATA	AAATTTCTATGCAGAT	TGCCTCAAAACAGCTTATATAAAG	NFIF14B
1034	ATCTTGATA	AAATTTCTATGCAGAT	TGCCTCAAAACAGCTTATATAAAG	NFIF7A
1351	CACAAATTACTAG			NFIF14B
1084	CACAAATTACTAG			NFIF7A

FIGURA 3 (cont.)



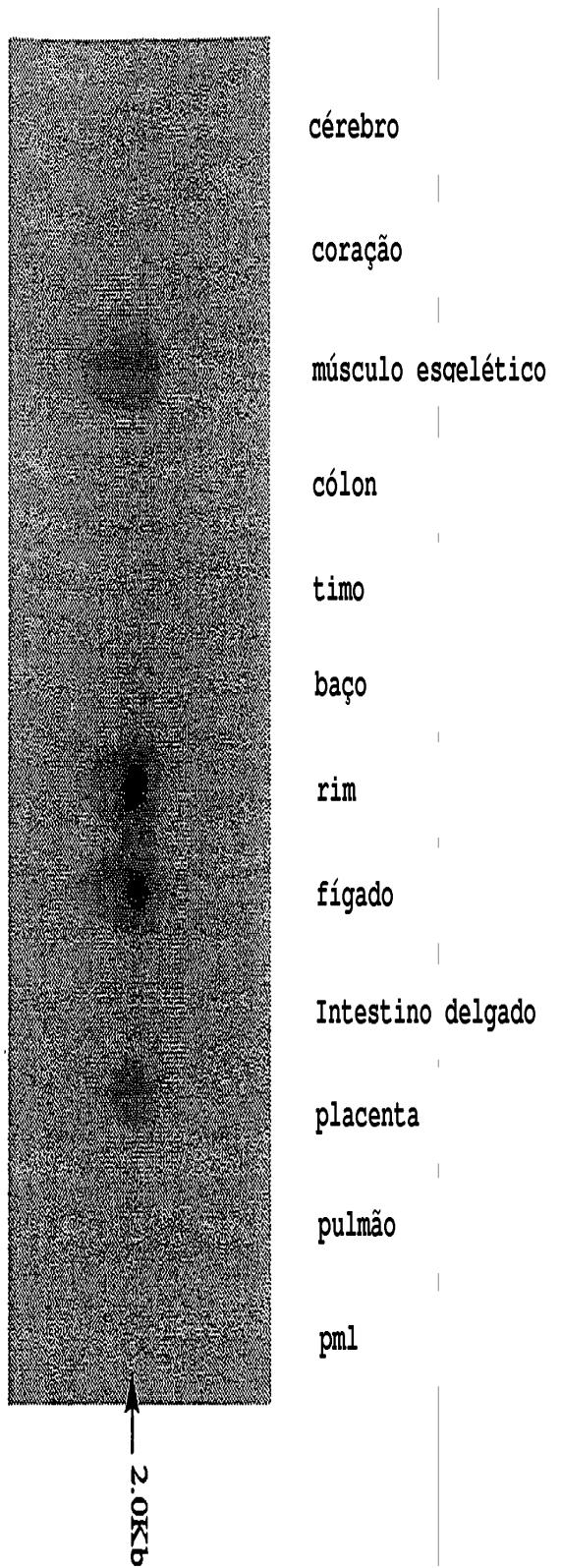
**FIGURA 4**

**NF<sub>k</sub>B Repórter com NFIF****FIGURA 5**

**NF<sub>k</sub>B Repórter com NFIF****FIGURA 6**

**SKGANASNPGPFGDV**

**FIGURA 7**



**FIGURA 8**

## **RESUMO**

### **"FACTOR INDUTOR DO FACTOR NUCLEAR KB"**

A presente invenção é dirigida a polipéptidos do factor de indução do factor nuclear κB (NFκB) (péptidos NFIF) que são capazes de induzir NFκB. A presente invenção inclui no seu âmbito polipéptidos NFIF, incluindo NFIF-14b e NFIF-7a, ADN, incluindo ADNc, que codificam estes polipéptidos e vectores de expressão capazes de expressar os polipéptidos NFIF. Estão também incluídos métodos e composições para aumentar a indução de NFκB num doente, métodos e composições para diminuir a indução de NFκB num doente, métodos para inibir a inflamação e métodos para a preparação de um medicamento pretendido para o tratamento e/ou prevenção de uma resposta inflamatória regulada por NFκB. Além disso, são proporcionados métodos para determinar se um composto de teste inibe ou estimula a actividade de péptidos NFIF.