



(22) Data do Depósito: 09/12/2009

República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(43) Data da Publicação Nacional: 17/02/2021

(54) Título: INIBIDOR COM BASE EM PEPTÍDEO PENETRANTE CELULAR DE QUINASES

(51) Int. Cl.: A01N 37/18; A61K 38/00.

(30) Prioridade Unionista: 10/12/2008 US 61/121396.

(71) Depositante(es): PURDUE RESEARCH FOUNDATION.

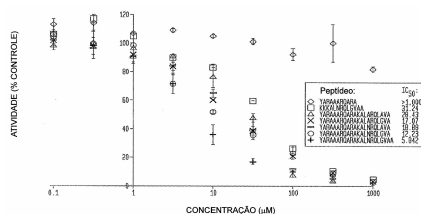
(72) Inventor(es): ALYSSA PANITCH; BRANDON SEAL.

(86) Pedido PCT: PCT US2009067378 de 09/12/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/068692 de 17/06/2010

(85) Data da Fase Nacional: 10/06/2011

(57) Resumo: COMPOSIÇÃO DE INIBIÇÃO DE QUINASE NO TRATAMENTO DE UM DISTÚRBO INFLAMATÓRIO. A presente invenção refere-se a composições de inibição de quinase contendo uma quantidade terapêutica de um peptídeo inibidor terapêutico que inibe pelo menos uma enzima quinase, métodos para tratar um distúrbio inflamatório cuja patofisiologia compreende expressão de citocina inflamatória, e métodos para tratar um distúrbio inflamatório cuja patofisiologia compreende expressão de citocina inflamatória utilizando as composições de inibição de quinase.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**COMPOSIÇÃO DE INIBIÇÃO DE QUINASE NO TRATAMENTO DE UM DISTÚRBO INFLAMATÓRIO**".

REFERÊNCIAS CRUZADAS

- 5 Este pedido reivindica o benefício de prioridade ao pedido provisional U.S. 61/121.396, depositado em 10 de dezembro de 2008, incorporado aqui por referência em sua totalidade.

DECLARAÇÃO DE FINANCIAMENTO DO GOVERNO

- 10 A invenção descrita foi feita com o apoio do governo em Grant K25HL074968 emitido pelo Instituto Nacional de Saúde. O governo tem certos direitos na invenção.

CAMPO DA INVENÇÃO

- 15 A presente invenção refere-se a biologia de célula, peptídeos penetrante celular, composições de peptídeo penetrante celular, e métodos de uso dos mesmos, e métodos de construção de proteína.

ANTECEDENTES

- 20 A conformação tridimensional de uma molécula de proteína é determinada por sua sequência de aminoácido, e os detalhes da conformação de uma proteína determinam sua química.
- 25 Uma proteína geralmente consiste em um esqueleto de polipeptídeo com cadeias laterais presas. A sequência das cadeias laterais quimicamente diferentes do aminoácido torna cada proteína distinta. A estrutura dobrada de uma proteína é estabilizada por interações não covalentes (por exemplo, ligações de hidrogênio, ligações iônicas, e atrações de van der Waals) que formam entre as partes diferentes da cadeia de polipeptídeo, uma parte da cadeia e outra. A estabilidade de cada forma dobrada é determinada pela força combinada de grandes números de tais ligações não covalentes.

- 30 Cada proteína tem quatro níveis de organização estrutural. A sequência de aminoácido é a estrutura primária da proteína. A estrutura secundária é definida por padrões de ligações de hidrogênio entre os grupos amida e carboxila do esqueleto sem consideração de ligação de hidrogênio de cadeia lateral-cadeia principal e cadeia lateral-cadeia lateral (por exem-

plo, α hélice, β -folha). A estrutura terciária, a organização tridimensional total de uma cadeia de polipeptídeo, é a maneira na qual as folhas e hélices da estrutura secundária de uma proteína se dobram sobre elas mesmas para definir a estrutura tridimensional. A estrutura quaternária se refere à estrutura completa de uma molécula de proteína formada como um complexo de mais do que uma cadeia de polipeptídeo,

Os domínios de proteína são unidades estruturais que se do-
bram mais ou menos independentemente de cada outro para formar estru-
turas compactas globulares. Um domínio geralmente contém entre cerca de
40 e cerca de 350 aminoácidos, e a unidade modular da qual muitas proteí-
nas maiores são construídas. Os domínios diferentes de uma proteína ge-
ralmente estão associados com as funções diferentes. A estrutura final do-
brada, ou conformação, adotada por qualquer cadeia de polipeptídeo geral-
mente é aquela na qual a energia livre é minimizada.

1. Quinases

Quinases são um grupo ubíquo de enzimas que catalisam a rea-
ção de transferência de fosforila de um doador de fosfato (geralmente ade-
nosina-5' -trifosfato (ATP)) para um substrato receptor. Embora todas as
quinases catalisem essencialmente a mesma reação de transferência de
fosforila, elas exibem diversidade notável em sua especificidade de substra-
to, estrutura, e as séries de reação nas quais elas participam. Uma classifi-
cação recente de todas as sequências quinase disponíveis (aproximadamen-
te 60,000 sequências) indica que quinases podem ser agrupadas em 25 fa-
mílias de proteínas homólogas. Estas famílias de quinase são também mon-
tadas em 12 grupos dobrados com base na similaridade da dobra estrutural.
Além disso, 22 das 25 famílias (aproximadamente 98,8% de todas as se-
quências) pertencem a 10 grupos dobrados para que a dobra estrutural seja
conhecida. Das outras 3 famílias, polifosfato quinase forma um grupo dupli-
cado distinto, e as 2 famílias restantes são ambas quinases de membrana
integral e compreendem o grupo duplicado final. Estes grupos dobrados não
somente incluem algumas das dobras de proteína mais amplamente disper-
sas, tais como dobra do tipo de Rossmann (três ou mais cepas beta parale-

las ligadas por duas alfa hélices na beta-alfa-beta-alfa-beta de ordem topológica), dobra do tipo de ferredoxina (uma dobra de proteína $\alpha+\beta$ comum com uma estrutura secundária de assinatura $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ ao longo de seu esqueleto), dobra de TIM-barril (significando uma dobra de proteína conservada consistindo em oito α -hélices e oito β -cepas paralelas que se alternam ao longo do esqueleto de peptídeo), e dobra de β -barril antiparalela (um beta barril é uma beta-folha grande que se torce e enrosca-se para formar uma estrutura fechada na qual a primeira cepa é hidrogênio ligado ao último), porém também todas as classes principais (todos α , todos β , $\alpha+\beta$, α/β) de estruturas de proteína. Em um grupo duplicado, o núcleo do domínio de ligação de nucleotídeo de cada família tem a mesma arquitetura, e a topologia do núcleo de proteína é ou idêntico ou relacionado com permutação circular. A homologia entre as famílias em um grupo duplicado não está implicada.

As quinases do Grupo 1 (23,124 sequências) incorporam proteína na S/T-Y quinase, proteína atípica quinase, lipídeo quinase, e enzimas ATP grasp e também compreendem a proteína S/T-Y quinase, e família de proteína atípica quinase (22,074 sequências). Estas quinases incluem: colina quinase (EC 2.7.1.32); proteína quinase (EC 2.7.1.37); fosforilase quinase (EC 2.7.1.38); homoserina quinase (EC 2.7.1.39); 1-fosfatidilinositol 4-quinase (EC 2.7.1.67); estreptomicina 6-quinase (EC 2.7.1.72); etanolamina quinase (EC 2.7.1.82); estreptomicina 3'-quinase (EC 2.7.1.87); canamicina quinase (EC 2.7.1.95); 5-metiltiorribose quinase (EC 2.7.1.100); viomicina quinase (EC 2.7.1.103); [hidroximetilglutaril-CoA reductase (NADPH₂)] quinase (EC 2.7.1.109); proteína-tirosina quinase (EC 2.7.1.112); [de-hidrogenase de isocitrato (NADP⁺)] quinase (EC 2.7.1.116); [cadeia leve de miosina] quinase (EC 2.7.1.117); higromicina-B quinase (EC 2.7.1.119); proteína dependente de cálcio/calmodulina quinase (EC 2.7.1.123); rodopsina quinase (EC 2.7.1.125); [receptor beta-adrenérgico] quinase (EC 2.7.1.126); [cadeia pesada de miosina] quinase (EC 2.7.1.129); [proteína Tau] quinase (EC 2.7.1.135); macrolida 2'-quinase (EC 2.7.1.136); 1-fosfatidilinositol 3-quinase (EC 2.7.1.137); subunidade de [RNA-polimerase] quinase (EC 2.7.1.141); fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinase (EC 2.7.1.153); e fosfatidilinositol-4-

fosfato 3-quinase (EC 2.7.1.154). Grupo I também compreende a família de lipídeo quinase (321 sequências). Estas quinases incluem: I-fosfatidilinositol-4-fosfato 5-quinase (EC 2.7.1.68); I D-mio-inositol-trifosfato 3-quinase (EC 2.7.1.127); inositol-tetracisfosfato 5-quinase (EC 2.7.1.140);
 5 I-fosfatidilinositol-5-fosfato 4-quinase (EC 2.7.1.149); 1-fosfatidilinositol-3-fosfato 5-quinase (EC 2.7.1.150); inositol-polifosfato multiquinase (EC 2.7.1.151); e inositol-hexacisfosfato quinase (EC 2.7.4.21). Grupo I também compreende as ATP-grasp quinases (729 sequências) que incluem inositol-tetracisfosfato I-quinase (EC 2.7.1.134); piruvato, fosfato diquinase (EC
 10 2.7.9.1); e piruvato, água diquinase (EC 2.7.9.2).

As quinases do Grupo II (17,071 sequências) incorporam as quinases do tipo de Rossman. O Grupo II compreende a família de P-alça quinase (7,732 sequências). Estas incluem gliconoquinase (EC 2.7.1.12); fosforribulokinase (EC 2.7.1.19); timidina quinase (EC 2.7.1.21); ribosilnicotinamida quinase (EC 2.7.1.22); defosfo-CoA quinase (EC 2.7.1.24); adenilil-sulfato quinase (EC 2.7.1.25); pantotenato quinase (EC 2.7.1.33); proteína quinase (bacteriana) (EC 2.7.1.37); uridina quinase (EC 2.7.1.48); chiquimato quinase (EC 2.7.1.71); deoxicitidina quinase (EC 2.7.1.74); deoxiadenosina quinase (EC 2.7.1.76); polinucleotídeo 5'-hidroxil-quinase (EC 2.7.1.78);
 20 6-fosfofruto-2-quinase (EC 2.7.1.105); deoxiguanosina quinase (EC 2.7.1.113); tetra-acildissacarídeo 4'-quinase (EC 2.7.1.130); deoxinucleosídeo quinase (EC 2.7.1.145); adenosilcobinamida quinase (EC 2.7.1.156); polifosfato quinase (EC 2.7.4.1); fosfomevalonato quinase (EC 2.7.4.2); adenilato quinase (EC 2.7.4.3); nucleosídeo-fosfato quinase (EC 2.7.4.4); guanilato quinase (EC 2.7.4.8); timidilato quinase (EC 2.7.4.9); nucleosídeo-trifosfato-adenilato quinase (EC 2.7.4.10); (deoxi)nucleosídeo-fosfato quinase (EC 2.7.4.13); citidilato quinase (EC 2.7.4.14); e uridilato quinase (EC 2.7.4.-).
 25 Grupo II também compreende a família fosfoenolpiruvato carboxiquinase (815 sequências). Estas enzimas incluem proteína quinase (HPr quinase/fosfatase) (EC 2.7.1.37); fosfoenolpiruvato carbóxiquinase (GTP) (EC 4.1.1.32); e fosfoenolpiruvato carboxiquinase (ATP) (EC 4.1.1.49). Grupo II também compreende a família de fosfoglicerato quinase (1,351 sequências).

Estas enzimas incluem fosfoglicerato quinase (EC 2.7.2.3) e fosfoglicerato quinase (GTP) (EC 2.7.2.10). Grupo II também compreende a família de aspartoquinase (2,171 sequências). Estas enzimas incluem carbamato quinase (EC 2.7.2.2); aspartato quinase (EC 2.7.2.4); acetilglutamato quinase (EC 2.7.2.8 1); glutamato 5-quinase (EC 2.7.2.1) e uridilato quinase (EC 2.7.4.-). Grupo II também compreende a família de quinase do tipo de fosfofrutoquinase (1,998 sequências). Estas enzimas incluem 6- fosfofrutoquinase (EC 2.7.1.1 1); NAD(+) quinase (EC 2.7.1.23); 1-fosfofrutoquinase (EC 2.7.1.56); difosfato-fructose-6-fosfato 1-fosfotransferase (EC 2.7.1.90); esfinganina quinase (EC 2.7.1.91); diacilglicerol quinase (EC 2.7.1.107); e ceramida quinase (EC 2.7.1.138). Grupo II também compreende a família do tipo de riboquinase (2,722 sequências). Estas enzimas incluem: glicoquinase (EC 2.7.1.2); cetoexoquinase (EC 2.7.1.3); fructoquinase (EC 2.7.1.4); 6-fosfofrutoquinase (EC 2.7.1. 11); riboquinase (EC 2.7.1.15); adenosina quinase (EC 2.7.1.20); piridoxal quinase (EC 2.7.1.35); 2-de-hidro-3- deoxigliconoquinase (EC 2.7.1.45); hidroximetilpirimidina quinase (EC 2.7.1.49); hidroxietiltiazol quinase (EC 2.7.1.50); 1-fosfofrutoquinase (EC 2.7.1.56); inosina quinase (EC 2.7.1.73); 5-de-hidro-2-deoxigliconoquinase (EC 2.7.1.92); tagatose-6- fosfato quinase (EC 2.7.1.144); fosfofructoquinase dependente de ADP (EC 2.7.1.146); glicoquinase dependente de ADP (EC 2.7.1.147); e fosfometilpirimidina QUINASE (EC 2.1 A.I). Grupo II também compreende a família de tiamina pirofosfoquinase (175 sequências) que inclui tiamina pirofosfoquinase (EC 2.7.6.2). Grupo II também compreende a família de glicerato quinase (107 sequências) que inclui glicerato quinase ((EC 2.7.1.31).

25 As quinases do Grupo III (10.973 sequências) compreendem as quinases duplicadas do tipo de ferredoxina. O Grupo III também compreende a família de nucleosídeo-difosfato quinase (923 sequências). Estas enzimas incluem nucleosídeo-difosfato quinase (EC 2.7.4.6). Grupo III também compreende a família HPPK quinase (609 sequências). Estas enzimas incluem 2-amino-4-hidróxi-6-hidroximetildi-hidropteridina pirofosfoquinase (EC 30 2.7.6.3). O Grupo III também compreende a família de guanido quinase (324 sequências). Estas enzimas incluem guanidoacetato quinase (EC 2.7.3.1);

creatina quinase (EC 2.7.3.2); arginina QUINASE (EC 2.7.3.3); e lombricina quinase (EC 2.7.3.5). Grupo III também compreende a família de histidina quinase (9.117 sequências). Estas enzimas incluem proteína quinase (histidina quinase) (EC 2.7.1.37); [piruvato de-hidrogenase (lipoamida)] quinase (EC 2.7.1.99); e [3-metil-2-oxibutanoato de-hidrogenase(lipoamida)] quinase (EC 2.7.1.115).

As quinases do Grupo IV (2.768 sequências) incorporam quinases do tipo de ribonuclease H. Estas enzimas incluem hexoquinase (EC 2.7.1.1); glicoquinase (EC 2.7.1.2); fructoquinase (EC 2.7.1.4); ramnuloquinase (EC 2.7.1.5); manoquinase (EC 2.7.1.7); gliconoquinase (EC 2.7.1.12); L-ribuloquinase (EC 2.7.1.16); xiluloquinase (EC 2.7.1.17); eritritol quinase (EC 2.7.1.27); glicerol quinase (EC 2.7.1.30); pantotenato quinase (EC 2.7.1.33); D-ribuloquinase (EC 2.7.1.47); L-fucoloquinase (EC 2.7.1.51); L-xiluloquinase (EC 2.7.1.53); alose quinase (EC 2.7.1.55); 2-de-hidro-3-deoxigalactonoquinase (EC 2.7.1.58); N-acetilglicosamina quinase (EC 2.7.1.59); N-acilmanosamina quinase (EC 2.7.1.60); polifosfato-glicose fosfo-transferase (EC 2.7.1.63); beta-glicosídeo quinase (EC 2.7.1.85); acetato quinase (EC 2.7.2.1); butirato quinase (EC 2.7.2.7); quinase de ácido graxo de cadeia ramificada (EC 2.7.2.14); e propionato quinase (EC 2.7.2.-).

As quinases do Grupo V (1.119 sequências) incorporam TIM β/α -barril quinases. Estas enzimas incluem piruvato quinase (EC 2.7.1.40).

As quinases do Grupo VI (885 sequências) incorporam GHMP quinases. Estas enzimas incluem galactoquinase (EC 2.7.1.6); mevalonato quinase (EC 2.7.1.36); homosserina quinase (EC 2.7.1.39); L-arabinoquinase (EC 2.7.1.46); fucoquinase (EC 2.7.1.52); chiquimato quinase (EC 2.7.1.71); 4-(citidina 5'-difosfo)-2-C-metil-D-eritriol quinase (EC 2.7.1.148); e fosfomevalonato quinase (EC 2.7.4.2)

As quinases do Grupo VII (1.843 sequências) incorporam quinases do tipo de AIR sintetase. Estas enzimas incluem tiamina-fosfato quinase (EC 2.7.4.16) e selenida, água diquinase (EC 2.7.9.3).

As quinases do Grupo VIII (565 sequências) incorporam riboflavina quinases (565 sequências). Estas enzimas incluem riboflavina quinase

(EC 2.7.1.26).

As quinases do Grupo IX (197 sequências) incorporam di-hidroxiacetona quinases. Estas enzimas incluem glicerona quinase (EC 2.7.1.29).

5 As quinases do Grupo X (148 sequências) incorporam glicerato quinases putativos. Estas enzimas incluem glicerato quinase (EC 2.7.1.31).

As quinases do Grupo XI (446 sequências) incorporam polifosfato quinases. Estas enzimas incluem polifosfato quinases (EC 2.7.4.1).

10 As quinases do Grupo XII (263 sequências) incorporam quinases de membrana integral. O Grupo XII compreende a família de dolicol quinase. Estas enzimas incluem dolicol quinases (EC 2.7.1.108). O Grupo XII também compreende a família de undecaprenol quinase. Estas enzimas incluem undecaprenol quinases (EC 2.7.1.66).

15 As quinases desempenham papéis indispensáveis em numerosas séries de reação de sinalização e metabólicas celulares, e elas estão entre as enzimas melhor estudadas nos níveis estruturais, bioquímicos e celulares. Apesar do fato de que todas as quinases usam o mesmo doador de fosfato (na maioria dos casos, ATP) e catalisam aparentemente a mesma reação de transferência de fosforila, elas desempenham diversidade notável em suas duplicações estruturais e mecanismos de reconhecimento de substrato. Isto é provavelmente devido grandemente a natureza diversa extraordinária das estruturas e propriedades de seus substratos.

2. Proteínas quinases ativadas por proteína quinase ativada por mitógeno (MK2 e MK3)

25 Diferentes grupos de proteínas quinases ativadas por MAPK (MAP-KAPKs) foram definidos a jusante de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs). Estas enzimas transduzem sinais para alvejar proteínas que não são substratos diretos dos MAPKs e, portanto, servem para reposicionar a sinalização dependente de fosforilação com cascatas de MAPK para diversas funções celulares. Um destes grupos é formado pelos três MAPKAPKs: MK2, MK3 (também conhecido como 3pK), e MK5 (também designado PRAK). A proteína quinase 2 ativada por proteína quinase ativa-

30

da por mitógeno (também referida como "MAPKAPK2", "MAPKAP- K2", "MK2") é uma quinase da família de proteína quinase serina/treonina (Ser/Thr). MK2 é altamente homólogo a MK3 (aproximadamente 75% de identidade de aminoácido). Os domínios de quinase de MK2 e MK3 são a

5 maioria similar (aproximadamente 35% a 40% de identidade) a proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina (CaMK), fosforilase b quinase, e o domínio de quinase de terminal de C (CTKD) das isoformas de quinase S6 ribossômica (RSK). O gene *mk2* codifica duas transcrições alternativamente emendadas de 370 aminoácidos (MK2A) e 400 aminoácidos (MK2B). O ge-

10 ne *mk3* codifica uma transcrição de 382 aminoácidos. As proteínas MK2- e MK3 são altamente homólogas, contudo MK2A possui uma região de terminal de C mais curta. O terminal de C de MK2B contém uma sequência de localização nuclear de bipartite funcional (NLS) (Lys-Lys-Xaa₁₀-Lys-Arg-Arg-Lys-Lys) (SEQ ID NO: 45) que não está presente nas isoformas MK2A mais

15 curtas, indicando que a divisão alternativa determina a localização celular das isoformas MK2. MK3 possui uma sequência de localização nuclear similar. A sequência de localização nuclear encontrada em ambos MK2B e MK3 abrange um domínio D (Leu-Leu-Lys-Arg-Arg-Lys-Lys) (SEQ ID NO: 46) cujo estudo tem mostrado mediar a interação específica de MK2B e MK3 com

20 p38 α e p38 β . MK2B e MK3 também possuem um sinal de exportação nuclear funcional (NES) localizado no terminal de N para o domínio NLS e D. O NES em MK2B é suficiente para ativar a exportação nuclear em seguida ao estímulo, um processo que pode ser inibido por leptomicina B. O terminal de N da sequência para o domínio catalítico em MK2 e MK3 é rica em prolina e

25 contém um (MK3) ou dois (MK2) sítios de ligação de domínio de homologia 3 (SH3) putativos, cujos estudos mostraram, para MK2, mediar a ligação ao domínio de SH3 de c-Abl *in vitro*. Estudos recentes sugerem que este domínio está envolvido na migração de célula mediada por MK2.

MK2B e MK3 estão localizados predominantemente no núcleo

30 de células quiescentes ao mesmo tempo em que MK2A está presente no citoplasma. Ambos MK2B e MK3 são rapidamente exportados para o citoplasma através de um mecanismo dependente de proteína de conservação

de região do cromossoma (CRM1) sob estímulo de tensão. A exportação nuclear de MK2B parece ser mediada por ativação de quinase, uma vez que a mutação fosfomimética de Thr334 na alça de ativação da quinase realça a localização citoplásmica de MK2B. Sem estar limitado pela teoria, é considerado que MK2B e MK3 podem conter um NLS constitutivamente ativo e um NES regulado por fosforilação.

MK2 e MK3 parecem ser expressos ubiquamente, com expressão predominante nos tecidos do coração, do músculo esquelético, e do rim.

2.1. Ativação

Vários ativadores de p38 α e p38 β potencialmente estimulam a atividade de MK2 e MK3. p38 media a fosforilação *in vitro* e fosforilação *in vivo* de MK2 em quatro sítios direcionados a prolina: Thr25, Thr222, Ser272, e Thr334. Destes sítios, somente Thr25 não é conservado em MK3. Sem estar limitado por teoria, ao mesmo tempo em que a função de Thr25 fosforilado é desconhecida, sua localização entre os dois sítios de ligação de domínio de SH3 sugere que ele pode regular as interações de proteína-proteína. Thr222 em MK2 (Thr201 em MK3) está localizado na alça de ativação do domínio de quinase e foi mostrado ser essencial para a atividade de MK2 e MK3 quinase. Thr334 em MK2 (Thr313 em MK3) está localizado no terminal de C para o domínio catalítico e é essencial para a atividade de quinase. A estrutura de cristal de MK2 foi resolvida e, sem estar limitado a teoria, sugere que a fosforilação de Thr334 pode servir como um desvio para importação e exportação nuclear de MK2. A fosforilação de Thr334 também pode enfraquecer ou interromper a ligação do terminal de C de MK2 ao domínio catalítico, expor o NES e promover a exportação nuclear.

Estudos mostraram que, ao mesmo tempo em que, p38 é capaz de ativar MK2 e MK3 no núcleo, evidência experimental sugere que a ativação e exportação nuclear de MK2 e MK3 são acoplados por um desvio conformacional dependente de fosforilação que também dita a estabilização e localização de p38, e a localização celular de p38 propriamente dito é controlada por MK2 e possivelmente MK3. Estudos adicionais mostraram que p38 nuclear é exportado para o citoplasma em um complexo com MK2 em

seguida a fosforilação e ativação de MK2. A interação entre p38 e MK2 pode ser importante para a estabilização de p38 uma vez que os estudos indicam que os níveis de p38 são baixos em células deficientes de MK2 e a expressão de uma proteína MK2 cataliticamente inativa restaura os níveis de p38.

2.2. Substratos e Funções

MK2 compartilha muitos substratos com MK3. Ambas as enzimas têm preferências de substrato comparáveis e substratos de peptídeo fosforilados com constantes cinéticas similares. A sequência mínima requerida para fosforilação eficiente por MK2 foi constada ser Hyd-Xaa-Arg-Xaa-Xaa-pSer/Thr, onde Hyd é um resíduo hidrofóbico volumoso.

Evidência experimental suporta uma função para p38 na regulação de biossíntese de citocina e migração de célula. A deleção alvejada do gene *mk2* em camundongos sugeriu que embora p38 medie a ativação de muitas quinases similares, MK2 procura ser a quinase principal responsável por estes processos biológicos dependentes de p38. A perda de MK2 leva (i) a um defeito na síntese induzida por lipopolissacarídeo (LPS) de citocinas tais como fator alfa de necrose de tumor (TNF α), interleucina-6 (IL-6), e interferon gama (IFN- γ) e (ii) a alterações na migração de fibroblastos embrionários de camundongo, células do músculo liso, e neutrófilos. De acordo com um papel para MK2 em respostas inflamatórias, os camundongos deficientes de MK2 mostram susceptibilidade aumentada a infecção de monocitogenes de *Listeria* e morte neuronal mediada por inflamação reduzida em seguida a isquemia focal. Uma vez que os níveis de proteína p38 também são reduzidos significativamente em células deficientes de MK2, foi necessário distinguir se estes fenótipos foram devidos somente à perda de MK2. Para obter isto, os mutantes de MK2 foram expressos em células deficientes de MK2, e os resultados indicaram que a atividade catalítica de MK2 não foi necessária para restaurar os níveis de p38, porém foi requerido regular a biossíntese de citocina.

2.3. Regulação de translação de mRNA.

Estudos têm mostrado que MK2 aumenta a produção de TNF α

aumentando-se a taxa de translação deste mRNA; nenhuma redução significativa na transcrição, processamento, e eliminação de TNF α pode ser detectada em camundongos deficientes de MK2. A série de reação de p38 é conhecida por desempenhar um importante papel na regulação da estabilidade de mRNA, e MK2 representa um alvo provável pelo qual p38 media esta função. Estudos utilizando camundongos deficientes de MK2 indicaram que a atividade catalítica de MK2 é necessária para seus efeitos na produção e migração de citocina, sugerindo que, sem estar limitado por teoria, MK2 fosforila alvos envolvidos na estabilidade de mRNA. De acordo com isto, MK2 foi mostrado ligar e/ou fosforilar a ribonucleoproteína nuclear heterogênea (hnRNP) tristetraprolina AO, a proteína de ligação de poli(A) PABPI, e HuR (um membro ubiquamente expresso da família elav (visual anormal embriônico-letal em *Drosophila melanogaster*) de proteína de ligação de RNA). Estes substratos são conhecidos por ligarem-se ou copurificar com mRNAs que contêm elementos ricos em AU na região não transladada 3', sugerindo que MK2 pode regular a estabilidade de mRNAs ricos em AU tais como TNF α . Atualmente, desconhece-se se MK3 desempenha funções similares, porém o tratamento de LPS de fibroblastos deficientes de MK2 completamente aboliu a fosforilação de hnRNP AO, sugerindo que MK3 não é capaz de compensar para a perda de MK2.

MK3 participa com MK2 na fosforilação da quinase de fator 2 de alongamento eucariótico (eEF2). A quinase de eEF2 fosforila e inativa eEF2. A atividade de eEF2 é crítica para o alongamento de mRNA durante a translação, e fosforilação de eEF2 em Thr56 resulta na terminação de translação de mRNA. A fosforilação de MK2 e MK3 de eEF2 quinase em Ser377 sugere que estas enzimas podem modular a atividade de eEF2 e desse modo regula o alongamento de translação de mRNA.

2.4. Regulação Transcricional por MK2 e MK3.

MK2 nuclear, similar a muitos MKs, contribui com a fosforilação de ligação de elemento de resposta de cAMP (CREB), fator de resposta de soro (SRF), e fator de transcrição ER81. A comparação de células do tipo selvagem e deficientes de MK2 revelou que MK2 é a SRF quinase principal

induzida pela tensão, sugerindo um papel para MK2 na resposta imediata precoce mediada por tensão. Ambos MK2 e MK3 interagem com o fator de transcrição hélice-alça-hélice básico E47 *in vivo* e E47 fosforilado *in vitro*. Descobriu-se que a fosforilação mediada por MK2 de E47 reprime a atividade transcricional de E47 e desse modo inibe a expressão de gene dependente de E47, sugerindo que MK2 e MK3 podem regular a diferenciação de célula e expressão de gene específica de tecido.

2.5. Outros alvos de MK2 e MK3.

Vários outros substratos de MK2 e MK3 também foram identificados, refletivos das diversas funções de MK2 e MK3 em vários processos biológicos. A proteína de sustentação 14-3-3 ζ é um substrato MK2 fisiológico. Estudos indicam que 14-3-3 ζ interage com vários componentes de séries de reação de sinalização de célula, incluindo proteínas quinase, fosfatases, e fatores de transcrição. Estudos adicionais mostraram que a fosforilação mediada por MK2 de 14-3-3 ζ em Ser58 compromete sua atividade de ligação, sugerindo que MK2 pode afetar a regulação de várias moléculas de sinalização normalmente reguladas por 14-3-3 ζ .

Estudos adicionais mostraram que MK2 também interage com e fosforila a subunidade p16 do complexo de Arp2 e Arp3 de sete membros (p16-Arc) em Ser77. p16-Arc tem funções na regulação do citoesqueleto de actina, sugerindo que MK2 pode estar envolvido neste processo. Outros estudos mostraram que a proteína de choque térmico pequena HSP27, proteína específica de linfócito LSP-I, e vimentina são fosforiladas por MK2. HSP27 é de interesse particular porque ele forma oligômeros grandes que podem agir como acompanhantes moleculares e protegem células de choque térmico e estresse oxidante. Sob fosforilação, HSP27 perde sua capacidade de formar grandes oligômeros e é incapaz de bloquear a polimerização de actina, sugerindo que a fosforilação mediada por MK2 de HSP27 serve como função homeostática destinada na regulação de dinâmicos de actina que de outro modo são desestabilizados durante o estresse. MK3 também foi mostrado fosforilar HSP27 *in vitro* e *in vivo*, porém seu papel durante as condições estressantes ainda não foi elucidado.

de catalisar sua reação. A ligação do inibidor é reversível ou irreversível. Os inibidores irreversíveis geralmente reagem com a enzima e alteram quimicamente (por exemplo, modificando-se os resíduos de aminoácido principais necessários para atividade enzimática) de modo que não seja mais capaz de catalisar sua reação. Em contraste, os inibidores reversíveis ligam não covalentemente e diferentes tipos de inibição são produzidos dependendo se estes inibidores ligam a enzima, o complexo de enzima-substrato, ou ambos.

Os inibidores de enzima geralmente são avaliados por sua especificidade e potência. O termo "especificidade" como utilizado neste contexto se refere à ligação seletiva de um inibidor e sua falta de ligação à outras proteínas. O termo "potência" como utilizado aqui se refere a uma constante de dissociação do inibidor, que indica a concentração de inibidor necessária para inibir uma enzima.

Os inibidores de proteínas quinase têm sido estudado para o uso como uma ferramenta na regulação da atividade de proteína quinase. Os inibidores têm sido estudados para uso com, por exemplo, quinase dependente de ciclina (Cdk), MAP quinase, serina/treonina quinase, proteína tirosina quinase da família de Src, tirosina quinase, calmodulina (CaM) quinase, caseína quinase, quinase de ponto de checagem (Chk1), glicogênio sintase quinase 3 (GSK-3), quinase de terminal de N de c-Jun (JNK), proteína quinase 1 ativada por mitógeno (MEK), quinase de cadeia leve de miosina (MLCK), proteína quinase A, Akt (proteína quinase B), proteína quinase C, proteína quinase G, proteína tirosina quinase, Raf quinase, e Rho quinase.

3.2. Anticorpos

Os anticorpos são proteínas do soro, as moléculas das quais possuem pequenas áreas de sua superfície que são complementares aos pequenos agrupamentos químicos em seus alvos. Estas regiões complementares (referidas como os sítios de combinação de anticorpo ou sítios de ligação de antígeno) das quais há pelo menos duas por moléculas de anticorpo, e em alguns tipos de moléculas de anticorpo dez, oito, ou em algumas espécies tanto quanto 12 podem reagir com sua região complementar correspondente no antígeno (o epítipo ou determinante antigênico) para li-

gar várias moléculas de antígeno multivalente umas às outras para formar uma treliça.

A unidade estrutural básica de uma molécula de anticorpo inteira consiste em quatro cadeias de polipeptídeo, duas cadeias leves idênticas (L) (cada contendo cerca de 220 aminoácidos) e duas cadeias pesadas idênticas (H) (cada geralmente contendo cerca de 440 aminoácidos). As duas cadeias pesadas e duas cadeias leves são mantidas juntas por uma combinação de ligações não covalente e covalente (dissulfeto). A molécula é composta de duas metades idênticas, cada com um sítio de ligação de antígeno idêntico composto da região de terminal de N de uma cadeia leve e a região de terminal de N de uma cadeia pesada. Ambas as cadeias leves e pesadas geralmente cooperam para formar a superfície de ligação de antígeno.

Os anticorpos humanos mostram dois tipos de cadeias leves, K e λ ; moléculas individuais de imunoglobulina geralmente são somente uma ou a outra. No soro normal, descobriu-se que 60% das moléculas têm K determinantes e 30 por cento λ . Descobriu-se que muitas outras espécies mostram dois tipos de cadeias leves, porém suas proporções variam.

Por exemplo, no camundongo e rato, as cadeias λ compreendem, porém alguns percentuais do total; no cão e gato, as cadeias K são muito baixas; o cavalo não parece ter qualquer cadeia K; os coelhos podem ter 5 a 40% de λ , dependendo da cepa e alótipo de b-local; e as cadeias leves do frango são mais homólogas a λ do que K.

Nos mamíferos, há cinco classes de anticorpos, IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, cada com sua própria classe de cadeia pesada - α (para IgA), δ (para IgD), ϵ (para IgE), γ (para IgG) e μ (para IgM). Além disso, há quatro subclasses de imunoglobulinas IgG (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄) tendo cadeias pesadas γ 1, γ 2, γ 3, e γ 4 respectivamente. Em sua forma secretada, IgM é um pentâmero composto de cinco unidades de quatro cadeias, dando um total de 10 sítios de ligação de antígeno. Cada pentâmero contém uma cópia de uma cadeia J, que é covalentemente inserida entre duas regiões de cauda adjacentes.

Todas as cinco classes de imunoglobulina diferem de outras proteínas do soro pelo fato de que elas mostram uma ampla faixa de mobilidade eletroforética e não são homogêneas. Esta heterogeneidade – em que as moléculas de IgG individuais, por exemplo, diferem uma da outra na carga líquida – é uma propriedade intrínseca das imunoglobulinas.

Os Anticorpos monoclonais (mAbs) podem ser gerados fundindo-se as células do baço de camundongo de um doador imunizado com uma linhagem de célula de mieloma de camundongo para produzir clones de hibridoma de camundongo estabelecidos que crescem em meios seletivos. Uma célula de hibridoma é uma célula híbrida imortalizada resultante da fusão *in vitro* de uma célula B secretora de anticorpo com uma célula de mieloma. A imunização *in vitro*, que se refere à ativação primária de células B específicas de antígeno na cultura, é outro meio bem estabelecido de produzir anticorpos monoclonais de camundongo.

Diversas bibliotecas de genes variáveis de cadeia pesada (VH) e leve (V_K e V_λ) de imunoglobulina de linfócitos do sangue periférico também podem ser amplificadas por amplificação de reação em cadeia de polimerase (PCR). O genes codificando cadeias de polipeptídeo únicas nas quais os domínios variáveis de cadeia pesada e leve são ligados por um espaçador de polipeptídeo (cadeia única Fv ou scFv) podem ser feitos randomicamente combinando-se o genes V de cadeia pesada e leve utilizando PCR. Uma biblioteca combinatória então pode ser clonada para exibição na superfície de bacteriófago filamentosos por fusão a uma proteína de revestimento menor na ponta do fago.

A técnica de seleção guiada é com base no embaralhamento de gene de imunoglobulina V com os genes de imunoglobulina V de roedores. O método envolve (i) embaralhar um repertório de cadeias leves λ humanas com o domínio de região variável de cadeia pesada (VH) de um anticorpo monoclonal de camundongo reativo com um antígeno de interesse; (ii) selecionar Fabs meio humanos neste antígeno (iii) utilizar os genes de cadeia leve λ selecionados como "domínios de acoplamento" para uma biblioteca de cadeias pesadas humanas em um segundo embaralhamento para isolar

os fragmentos de Fab do clone tendo genes humanos de cadeia leve; (v) transfectar as células de mieloma de camundongo por eletroporação com vetores de expressão de célula de mamífero contendo os genes; e (vi) expressar os genes V do Fab reativo com o antígeno como uma molécula de anticorpo λ , IgG1 completa no mieloma de camundongo.

Como utilizado aqui, o termo "anticorpo" inclui, por modo de exemplo, ambos os anticorpos de ocorrência natural e de ocorrência não natural. Especificamente, o termo "anticorpo" inclui anticorpos policlonais e anticorpos monoclonais, e fragmentos dos mesmos. Além disso, o termo "anticorpo" inclui anticorpos quiméricos e anticorpos completamente sintéticos, e fragmentos dos mesmos.

Um epitopo ou determinante antigênico é um sítio de antigênico em uma molécula. Os epitopos/determinantes antigênicos sequenciais essencialmente são cadeias lineares. Em estruturas ordenadas, tais como polímeros ou proteínas helicoidais, os determinantes/epitopos antigênicos essencialmente seriam emplastos ou regiões limitadas dentro ou sobre a superfície da estrutura envolvendo cadeias laterais de aminoácido de diferentes porções da molécula que poderiam chegar perto uma da outra. Estes são determinantes conformacionais. Como utilizado aqui, um epitopo pode ser um sítio de ligação de determinante antigênico/antígeno em um peptídeo de inibição de quinase. O epitopo pode ser sequência primária, secundária, ou terciária relacionada.

O princípio de complementariedade, que geralmente é comparado com o ajuste de uma chave em uma fechadura, envolve forças de ligação relativamente fracas (ligações de hidrogênio e hidrofóbicas, forças van der Waals, e interações iônicas), que são capazes de atuar eficazmente somente quando as duas moléculas de reação podem se aproximar muito uma da outra e mesmo tão perto que os átomos constituintes de projeção ou grupos de átomos de uma molécula podem se ajustar em recessos ou depressões de complementariedade na outra. As interações de antígeno-anticorpo mostram um grau elevado de especificidade, que se manifesta em muitos níveis. Trazido para o nível molecular, especificidade significa que os sítios de com-

binação de anticorpos com um antígeno têm uma complementaridade de modo algum similar aos determinantes antigênicos de um antígeno não relacionado. Sempre que determinantes antigênicos de dois antígenos diferentes têm alguma similaridade estrutural, algum grau de ajuste de um determinante no sítio de combinação de alguns anticorpos ao outro pode ocorrer, e que este fenômeno dá origem a reações cruzadas. As reações cruzadas são de grande importância no entendimento da complementaridade ou especificidade de reações de antígeno-anticorpo, especificidade imunológica ou complementaridade torna possível a detecção de pequenas quantidades de impurezas/contaminações entre os antígenos.

A especificidade das interações entre certos anticorpos e proteínas quinases foi estudada para uso na regulação da atividade de proteína quinase. Os anticorpos foram isolados para uso com, por exemplo, séries de reação de MAP quinase, proteína quinase A, proteína quinase B, proteína quinase G, serina/treonina quinases, glicogênio-sintase quinases-3 (GSK-3), séries de reação de proteína quinase ativada por estresse (SAP), e tirosina quinases. Adicionalmente, os anticorpos foram isolados para uso com inibidores de proteína quinase e substratos de proteína quinase.

3.3. Peptídeos de Bloqueio

Um peptídeo é um composto químico que é composto de uma cadeia de dois ou mais aminoácidos por meio dos quais o grupo carboxila de um aminoácido na cadeia é ligado ao grupo amino do outro através de uma ligação de peptídeo. Os peptídeos foram utilizados entre outras coisas no estudo de estrutura e função de proteína. Os peptídeos sintéticos podem ser utilizados entre outras coisas como sondas para observar onde as interações de proteína-peptídeo ocorrem. Os peptídeos inibidores podem ser utilizados entre outras coisas em pesquisa clínica para examinar os efeitos de peptídeos na inibição de proteínas quinases, proteínas de câncer e outros distúrbios.

O uso de vários peptídeos de bloqueio foi estudado. Por exemplo, a quinase regulada por sinal extracelular (ERK), uma proteína quinase MAPK, é essencial para a proliferação e diferenciação celular. A ativação de

MAPKs requer um mecanismo de cascata por meio do qual MAPK é fosforilado por um MAPKK a montante (MEK) que é então, sucessivamente fosforilado por uma terceira quinase MAPKKK (MEKK). O peptídeo inibidor de ERK funciona como uma isca de MEK ligando-se ao ERK. Ele contém os 13 aminoácidos de terminal de amino (GMPKKKPTPIQLN) [SEQ ID NO: 1] de MEK1 e se liga ao ERK. Isto bloqueia a ativação de ERK por MEK uma vez que ERK é incapaz de interagir com MEK. O peptídeo inibidor de ERK também contém uma sequência de transdução de proteína (PTD) (DRQI-KIWFQNRRMKWKK) [SEQ ID NO: 2] derivada de Antennapedia que torna a célula de peptídeo permeável.

Outros peptídeos de bloqueio incluem peptídeo inibidor relacionado com autocamtida-2 (AIP). Este peptídeo sintético é um inibidor altamente específico e potente de proteína quinase II dependente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII). AIP é um análogo não fosforilável de autocamtida-2, um substrato de peptídeo altamente seletivo para CaMKII. AIP inibe CaMKII com um IC_{50} de 100 nM (IC_{50} é a concentração de um inibidor requerido para obter 50% de inibição). A inibição de AIP é não competitiva com respeito a syntide-2 (substrato de peptídeo CaMKII) e ATP porém competitivo com respeito a autocamtida-2. A inibição é não afetada pela presença ou ausência de Ca^{2+} /calmodulina. A atividade de CaMKII é inibida completamente por AIP (1 μM) ao mesmo tempo em que PKA, PKC e CaMKIV são não afetados. A sequência de aminoácido de AIP é: KKALRRQE A VD AL (Lys-Lys- Ala-Leu- Arg-Arg- Gln-Glu-Ala-Val-Asp- Ala-Leu) [SEQ ID NO: 3].

Outros peptídeos de bloqueio incluem peptídeo inibidor (CIP) de proteína quinase 5 de divisão de célula (Cdk5), Cdk5 fosforila a proteína de microtúbulo tau em fosfoepitopos específicos de Mal de Alzheimer quando se associa com p25. p25 é um ativador truncado, que é produzido do ativador p35 fisiológico Cdk5 sob exposição aos peptídeos amiloide β ($\text{A}\Phi$). Em infecções neuronais com CIP, CIPs seletivamente inibem a atividade de p25/Cdk5 e suprime a hiperfosforilação anormal tau em neurônios corticais. As razões para a especificidade demonstrada por CIP não são completamente entendidas.

Os peptídeos de bloqueio adicionais foram estudados para quinase 2 extracelular-regulada (ERK2), ERK3, p38/HO1, proteína quinase C, caseína quinase II, Ca^{2+} /calmodulina quinase IV, caseína quinase II, Cdk4, Cdk5, proteína quinase dependente de DNA (DNA-PK), serina/treonina-proteína quinase PAK3, fosfoinosítido (PI)-3 quinase, PI-5 quinase, PSTAI-RE (a sequência altamente conservada cdk), quinase ribossômica S6, GSK-4, quinase de centro germinal (GCK), SAPK (proteína quinase ativada por tensão), SEKI (quinase de sinalização de tensão), e quinase de adesão focal (FAK).

10 3.4. Domínios de Transdução de Proteína

Os domínios de transdução de proteína (PTDs) são uma classe de peptídeos capaz de penetrar a membrana de plasma de células de mamífero e de transportar os compostos de muitos tipos e pesos moleculares através da membrana. Estes compostos incluem moléculas efetoras, tais como as proteínas, DNA, peptídeos conjugados, oligonucleotídeos, e pequenas partículas tais como lipossomas. Quando os PTDs são quimicamente ligados ou fundidos a outras proteínas, as proteínas de fusão resultantes ainda são capazes de entrar nas células. Embora o mecanismo exato de transdução seja desconhecido, a internalização destas proteínas não é acreditada ser mediada pelo receptor ou mediada pelo transportador. PTDs são geralmente 10-16 aminoácidos em comprimento e podem ser agrupados de acordo com sua composição, tal como, por exemplo, peptídeos ricos em arginina e/ou lisina.

O uso de PTDs capazes de transportar moléculas efetoras em células tornou-se crescentemente atrativo no desígnio de fármacos uma vez que eles promovem a captação celular de moléculas de carga. Estes peptídeos de penetração de célula, geralmente categorizados como anfipáticos (significando ter a terminação tanto polar quanto não polar) ou catiônicos dependendo de sua sequência, fornecem uma tecnologia de liberação não invasiva para macromoléculas. PTDs também geralmente são referidos como "peptídeos de Trojan", "sequências de translocação de membrana", ou "proteínas permeáveis de célula" (CPPs). PTDs também podem ser utiliza-

dos para ajudar novos inibidores de HSP27 quinase a penetrar as membranas celulares (vide, os Pedidos dos Estados Unidos No. de Série 11/972.459, intitulado "Polypeptic Inhibitors of HSP27 Kinase and Uses Thereof," depositado em 10 de janeiro de 2008, e No. de Série 12/188.109, intitulado "Kinases Inhibitors and Uses Thereof," depositado em 7 de agosto de 2008, incorporado por referência em sua totalidade aqui).

3.4.1. Proteínas Contendo PTD Viral

As primeiras proteínas a serem descritas como tendo propriedades de transdução foram de origem viral. Estas proteínas ainda são os modelos mais comumente aceitos para a ação de PTD. O Transativador de HIV-I de Transcrição (TAT) e proteína HSV-I VP 22 são as proteínas contendo PTD virais melhor caracterizadas.

TAT (produto de gene transativador de HIV-I) é um polipeptídeo de 86 aminoácidos, que atua como um poderoso fator de transcrição do genoma de HIV-I integrado. TAT age no genoma viral estimulando a replicação viral em células latentemente infectadas. As propriedades de translocação da proteína TAT permitem que ela ative as células infectadas quiescentes e a proteína pode estar envolvida na preparação de células não infectadas para infecção subsequente regulando-se muitos genes celulares, incluindo as citocinas. O PTD mínimo de TAT é a proteína de 9 aminoácidos de sequência RKKRRQRRR (TAT₄₉₋₅₇) [SEQ ID NO: 4]. Os estudos utilizando um fragmento mais longo de TAT demonstraram transdução bem sucedida de proteínas de fusão até 120 kDa. A adição de múltiplos TAT-PTDs bem como derivados de TAT sintéticos foi demonstrada mediar a translocação de membrana. As proteínas de fusão contendo TAT PTD foram utilizadas como frações terapêuticas em experimentos envolvendo câncer, transportando uma proteína morta para dentro de células, e os modelos de doença de distúrbios neurodegenerativos.

VP22 é a proteína de tegumento HSV-I, uma parte estrutural do vírion de HSV. VP22 é capaz de translocação independente de receptor e se acumula no núcleo. Esta propriedade de VP22 classifica a proteína como um peptídeo contendo PTD. As proteínas de fusão compreendendo VP22

de tamanho natural foram translocadas eficientemente através da membrana de plasma.

3.4.2, Homeoproteínas com Propriedades de Translocação Intercelular

As homeoproteínas são altamente conservadas, transativando os fatores de transcrição envolvidos e processos morfológicos. Elas se ligam ao DNA através de uma sequência específica de 60 aminoácidos. O homeodomínio de ligação de DNA é a sequência mais altamente conservada da homeoproteína. Várias homeoproteínas foram descritas para exibir a atividade do tipo de PTD; elas são capazes de translocação eficiente através de membranas celulares de uma maneira independente de energia e independente de endocitose sem especificidade do tipo celular.

A proteína de Antennapedia (Antp) é um fator de transativação capaz de translocação através das membranas celulares; a sequência mínima capaz de translocação é um peptídeo de 16 aminoácidos correspondendo à terceira hélice do homeodomínio da proteína (HD). A internalização desta hélice ocorre a 4°C, sugerindo que este processo não é dependente de endocitose. Os peptídeos até 100 aminoácidos produzidos como proteínas de fusão com AntpHD penetram as membranas celulares. Outros homeodomínios capazes de translocação incluem homeodomínio Fushi tarazu (Ftz) e Engrailed (En). Muitos homeodomínios compartilham uma terceira hélice altamente conservada.

3.4.3. PTDs Sintéticos

Vários peptídeos de PTD foram sintetizados. Muitos destes peptídeos sintéticos são com base em peptídeos existentes e bem documentados, ao mesmo tempo em que outros são selecionados para seus resíduos básicos e/ou carga positiva, que geralmente são acreditados serem cruciais para a função de PTD. Os peptídeos sintéticos incluem, porém não estão limitados a, PTD-4 (YARAAARQARA) [SEQ ID NO: 5]; PTD-5 (RRQRRTSKLMKR) [SEQ ID NO: 6]; MST-I (AAVLLPVLLAAR) [SEQ ID NO: 7]; L-R9 (RRRRRRRRR) [SEQ ID NO: 8]; e Peptídeo 2 (SGWFRRWKK.) [SEQ ID NO: 9].

3.4.4. PTDs Humanos

PTDs humanos podem envolver emissões de imunogenicidade

potenciais em introdução em um paciente humano. Os peptídeos com sequências PTD incluem: Hoxa-5, Hox- A4, Hox-B5, Hox-B6, Hox-B7, HOX-D3, GAX, MOX-2, e FtzPTD. Estas proteínas todas compartilham a sequência encontrada em AntpPTD (RQIKIWFQNRRMKWKK) [SEQ ID NO; 10]. Outros PTDs incluem Ilhota-1, interleucina-1 β , fator de necrose de tumor, e a sequência hidrofóbica de peptídeo de sinal de fator de crescimento de fibroblasto de Kaposi (K-FGF ou FGF-4), que é capaz de translocação independente de energia, receptor, e endocitose. Os PTDs não confirmados incluem membros da família do Fator de Crescimento de Fibroblasto (FGF).

10 4. Distúrbios: Distúrbios Inflamatórios

O termo "inflamação" como utilizado aqui se refere ao processo fisiológico pelo qual os tecidos vascularizados respondem à lesão. Vide, por exemplo, FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY, 4ª Ed., William E. Paul, ed. Lippincott-Raven Publishers, Filadélfia (1999) em 1051-1053, incorporado aqui por referência. Durante o processo inflamatório, as células envolvidas na desintoxicação e reparo são mobilizadas para o sítio comprometido por mediadores inflamatórios. A inflamação é geralmente caracterizada por uma forte infiltração de leucócitos no sítio da inflamação, particularmente neutrófilos (células polimorfonucleares). Estas células promovem o dano do tecido liberando-se substâncias tóxicas na parede vascular ou no tecido ileso. Tradicionalmente, a inflamação foi dividida em respostas aguda e crônica.

O termo "inflamação aguda" como utilizado aqui se refere à resposta rápida, breve (minutos a dias), relativamente uniforme à lesão aguda caracterizada por acúmulos de fluido, proteínas de plasma, e leucócitos neutrofilicos. Em inflamação aguda, a remoção dos estímulos para o recrutamento de monócitos (que se tornam macrófagos sob ativação apropriada) no tecido inflamado, e macrófagos existentes saem do tecido através de linfáticos. Os exemplos de agentes prejudiciais que causam inflamação aguda incluem, porém não estão limitados a, patógenos (por exemplo, bactérias, vírus, parasitas), corpos estranhos de exógenos (por exemplo, asbestos) ou endógenos (por exemplo, cristais de urato, complexos imunes), fontes, e agentes físicos (por exemplo, queimaduras) ou químicos (por exemplo, cáus-

ticos).

O termo "inflamação crônica" como utilizado aqui se refere à inflamação que é de duração mais longa e que tem uma terminação vaga e indefinida. A inflamação crônica ocorre quando a inflamação aguda persiste, ou através de depuração incompleta do agente inflamatório inicial ou como um resultado de múltiplos eventos agudos ocorrendo no mesmo local. A inflamação crônica, que inclui o influxo de linfócitos e macrófagos e crescimento de fibroblasto, pode resultar na cicatrização de tecido em sítios de atividade inflamatória prolongada ou repetida. Em inflamação crônica, os macrófagos existentes são presos no lugar, e a proliferação de macrófagos é estimulada.

Independentemente do agente iniciador, as alterações fisiológicas que acompanham a inflamação aguda abrange quatro características principais: (1) vasodilatação, que resulta em um aumento líquido no fluxo sanguíneo, é uma das primeiras respostas físicas à lesão de tecido aguda; (2) em resposta aos estímulos inflamatórios, células endoteliais que forram os vênulos se contraem, alargando as junções intracelulares para produzir aberturas, levando a permeabilidade vascular aumentada que permite o vazamento de proteínas de plasma e células sanguíneas para fora dos vasos sanguíneos; (3) inflamação geralmente é caracterizada por uma forte infiltração no sítio da inflamação, particularmente neutrófilos (células polimorfonucleares). Estas células promovem a lesão de tecido liberando-se substâncias tóxicas na parede vascular ou no tecido ileso; e (4) febre, produzida por pirogêneos liberados de leucócitos em resposta aos estímulos específicos.

Durante o processo inflamatório, mediadores inflamatórios solúveis da resposta inflamatória trabalham juntos com os componentes celulares de um modo sistêmico na tentativa de conter e eliminar os agentes causadores do sofrimento físico. O termo "mediadores inflamatórios" como utilizado aqui se refere aos mediadores moleculares do processo inflamatório. Estas moléculas solúveis, difusíveis agem tanto localmente no sítio do dano e infecção do tecido quanto em sítios mais distantes. Alguns mediadores inflamatórios são ativados pelo processo inflamatório, ao mesmo tempo em

que outros são sintetizados e/ou liberados de fontes celulares em resposta a inflamação aguda por outros mediadores inflamatórios solúveis. Os exemplos de mediadores inflamatórios da resposta inflamatória incluem, porém não estão limitados a, proteases de plasma, complemento, cininas, coagulação e proteínas fibrinolíticas, mediadores de lipídeo, prostaglandinas, leucotrienos, fator de ativação de plaquetas (PAF), peptídeos e aminas, incluindo, porém não limitado a, histamina, serotonina, e neuropeptídeos, citocinas pró-inflamatórias, incluindo, porém não limitado a, interleucina-1, interleucina-4 (IL-4), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), fator de necrose de tumor (TNF), interferon-gama, e interleucina 12 (IL-12).

Vários distúrbios associados com a inflamação sustentam uma variedade de doenças. Estes incluem, porém não estão limitados a, asma, doenças autoimunes, prostatite crônica, glomerulonefrite, doença inflamatória do intestino (IBD), doença inflamatória pélvica (PID), lesão de reperfusão, artrite reumatoide, vasculite e hipersensibilidades.

Asma

Asma é uma doença crônica envolvendo o sistema respiratório no qual as vias aéreas podem se contrair esporadicamente, ficam inflamadas, e são cobertas com quantidades excessivas de mucos, geralmente em resposta a um ou mais ativadores. Estes ativadores podem incluir, porém não estão limitados a, exposição a um estímulo ambiental tal como, porém não limitado a, alérgenos, fumaça, ar frio ou quente, perfume, pelo de animal, ar úmido, dificuldade de exercício ou esforço ou emocional. O estreitamento das vias aéreas apresenta sintomas tais como, porém não limitado a, respiração difícil, deficiência de respiração aperto no peito, tosse, dispneia, e estridor. Níveis de soro elevados de IL-6 em pacientes com asma comparado com pacientes de controle normais estavam implicados na patofisiologia de asma brônquica. Yokoyama, A. e outros, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 151(5): 1354-58 (1995). Estudos também sugeriram, com base na observação que níveis significantes de TNF- α e IL-6 foram detectados no fluido de lavagem broncoalveolar (BALF) de pacientes com asma, ao mesmo tempo em que níveis de IL-1 β em pacientes BALF de pacientes com asma assin-

tomática, ativação de macrófagos alveolares e células T (Broide, D.H., e outros J. Allergy Clin. Immunol. 89(5):958-67, 1992).

Doenças Autoimunes

Espondilite ancilosante (AS, doença de Bechterew, síndrome de Bechterew, doença de Marie Strumpell) é uma artrite crônica, inflamatória e doença autoimune. Principalmente afeta as articulações da coluna vertebral e o sacroílio na pelve, causando eventual fusão da coluna vertebral. Estudos reportaram que TNF- α e IL-6 só aumentados em pacientes AS (ao mesmo tempo em que os níveis de IL-1 β não são) e que IL-6 está estritamente correlacionada com a atividade da doença (Gratacos, J., e outros Br. J. Rheumatol. 33(10):927-931. 1994). Os sintomas de AS incluem, porém não estão limitados a, dor crônica e rigidez na parte inferior da coluna vertebral ou algumas vezes em toda a coluna vertebral, geralmente com dor referida a uma ou outra nádega ou parte posterior da coxa da articulação sacroilíaca, inflamação dos olhos (iridociclite, uveíte) causando vermelhidão, dor nos olhos, perda de visão, flutuantes, fotofobia, fadiga náuseas, aortite, fibrose pulmonar apical, e ectasia das bainhas da raiz do nervo sacral.

A diabetes tipo 1 é uma doença autoimune por meio da qual as células ilhota do pâncreas são atacadas por células T, o que torna o corpo incapaz de produzir insulina. Foi reportado que insulite destrutiva de célula β está associada com a expressão aumentada de IL-1 e TNF- α . Também, a expressão transgênica de citocinas em células β ilhotas pancreáticas de camundongos não propensos a diabetes e camundongos diabéticos não obesos (NOD) sugeriu papéis patogênicos para IFN α , IFN γ , IL-2 e IL-10 no desenvolvimento de diabetes melito dependente de insulina (IDDM) e papéis protetores para IL-4, IL-6 e TNF- α (Rabinovitch, A. Diabetes Metab. Rev. 14:129-151, 1998). Os sintomas de diabetes tipo 1 incluem, porém não estão limitados a, poliúria, polidipsia e perda de peso.

A síndrome de Guillaine-Barre é uma polineuropatia desmielinizante inflamatória aguda (um distúrbio autoimune que afeta o sistema nervoso periférico). Frequentemente é severo, e geralmente exibe como uma paralisia ascendente observada pela fraqueza nas pernas que se espalha para

os membros superiores e o rosto ao longo com perda completa dos reflexos do tendão profundos. Estudos reportaram que a expressão diferencial de IL- β , IL-6, e TNF- α em um modelo animal da doença defende um papel principal destas citocinas (Zhu, J., e outros Clin. Immunol. Immunopathol, 84(1):85-94. 1997). Ossintomas de síndrome de Guillame-Barre incluem, porém não estão limitados a, fraqueza simétrica que geralmente afeta os membros inferiores primeiro, e rapidamente progride de um modo ascendente, "pernas de borracha" com ou sem disestesias, fraqueza bubar (disfagia orofaríngea), dificuldades respiratórias, fraqueza facial, perda sensorial (propriocepção), amplas flutuações na pressão sanguínea, hipertensão ortostática, e arritmias cardíacas.

Lúpus é uma doença do tecido conjuntivo autoimune crônica, que afeta qualquer parte do corpo, causando inflamação e lesão do tecido. Lúpus mais geralmente prejudica o coração, articulações, pele, pulmões, vasos sanguíneos, fígado, rins e sistema nervoso. Estudos mostraram que IL-6 e TNF- α ativamente são sintetizados nos rins de pacientes com nefrite do lúpus (Herrera-Esparza, R., e outros Lúpus. 7(3): 154-158, 1998). Estudos adicionais reportaram que a expressão de TNF- α e IL- β são elevadas em modelos de animais de nefrite do lúpus (Boswell, J., e outros J. Immunol. 141(9):3050-3054, 1988). Os sintomas de lúpus incluem, porém não estão limitados a, fadiga, febre, ganho ou perda de peso, dores nas articulações, rigidez, inchaço, eritema malar na face, lesões na pele, feridas da boca, alopecia, encurtamento da respiração, dor no peito, olhos secos e fenômeno de Raynaud.

Esclerose múltipla (MS) é uma doença autoimune que afeta os neurônios mielinados do cérebro e medula espinhal. MS é causada por dano a bainha de mielina; impulsos nervosos são tornados lentos ou parados quando sua cobertura é danificada. Estudos reportaram expressão aumentada de TNF- α em casos de MS (Cannella, D., e outros Ann. Neurol. 37(4):424-435, 2004) e de IL-6 em lesões de pacientes de MS (Lock, C, e outros Nature Medicine, 8:500-508, 2002). Os sintomas de esclerose múltipla incluem, porém não estão limitados a, perda de equilíbrio, espasmos

musculares, entoprecimento ou sensação anormal em qualquer área, problemas no movimento dos braços e pernas e ao andar, tremor em um ou mais braços ou pernas, constipação, vazamento de fezes, incontinência, visão dupla, desconforto nos olhos, dor facial, e perda de audição.

5 Psoríase é uma doença autoimune crônica, não contagiosa que afeta a pele e as articulações. Geralmente causa manchas vermelhas, escamosas que aparecem na pele. Estas placas psoriáticas são áreas de inflamação e produção de pele excessiva. A pele rapidamente se acumula nestes sítios e assume uma aparência branca prateada. As placas podem
10 afetar qualquer área, incluindo o cotovelo, o joelho, o couro cabeludo, e os órgãos genitais. Estudos reportaram níveis elevados de TNF- α , IL-1 β e IL-6 em pacientes de psoríase (Mizutani, H.; e outros J. Dermatol. Sci, 14(2); 145-153. 1997).

 Escleroderma é uma doença do tecido conjuntivo generalizada
15 que envolve alterações na pele, vasos sanguíneos, músculos e órgãos internos. Estudos reportaram que IL-6 foi detectada mais frequentemente em soros de controles, e que TNF- α foi detectado nos mesmos níveis em ambos os grupos de pacientes, ao mesmo tempo em que IL-1 β não foi detectado em nenhum dos dois grupos (Needleman, B. W., e outros Artrite Rheum.
20 35(1):67-72, 1992). Os sintomas da pele incluem, porém não estão limitados a, branqueamento, coloração azulada ou vermelhidão dos dedos das mãos e dos pés em resposta ao calor e frio (fenômeno de Raynaud), perda de cabelo, escurecimento da pele, a pele fica anormalmente escura ou clara, engrossamento da pele e mãos e antebraços cintilantes, e ulcerações nas pontas dos dedos das mãos ou dos pés. Os sintomas ósseos e musculares incluem, porém não estão limitados a, dor nas articulações, dormência e dor nos pés, dor, rigidez e inchaço dos dedos das mãos e articulações, dor no punho. Sintomas adicionais incluem, porém não estão limitados a, constipação, diarreia, tosse seca, chiado, e dificuldade de deglutição.
25

30 A doença de Sjorgen (doença de Mikulicz, síndrome seca) é um distúrbio autoimune no qual as células imunes atacam e restauram as glândulas exócrinas que produzem lágrimas e saliva. Os estudos mostraram que

- os níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α são significativamente diferentes entre pacientes com doença de Sjogren e controles saudáveis normais (Szodoray, P., e outros Scand. J. Immunol, 59(6):592-599). Os sintomas de doença de Sjogren incluem, porém não estão limitados a, boca seca, olhos secos, ressecamento da pele, ressecamento nasal e ressecamento vaginal.

Glomerulonefrite

- Glomerulonefrite (nefrite glomerular, GN) é uma doença renal caracterizada por inflamação dos vasos sanguíneos pequenos (glomérulos) dos rins. Estudos reportaram que as citocinas inflamatórias IL-1 e TNF- α cada
- 10 da desempenha um papel no processo imune/inflamatório em glomerulonefrite e que o bloqueio de sua ação reduz a doença (Atkins, R.C.. Nephrology. 7(s1):S2-S6, 2007); Johnson, R.J., Nephron. 73(4):506-514, 1996). Estudos adicionais reportaram que IL-6 também desempenha um papel em glomerulonefrite (Takemura, T., e outros Virchows Archiv. 424(5):459-464, 1994).
- 15 Os sintomas de glomerulonefrite incluem, porém não estão limitados a, edema, pressão sanguínea elevada, e a presença de células sanguíneas vermelhas na urina.

Dor Pélvica Crônica Urológica

- As síndromes de dor pélvica crônica urológica referem-se a síndromes de dor associadas com a bexiga (isto é, cistite intersticial (IC), síndrome da bexiga dolorida (PBS)) e a glândula da próstata (prostatite crônica (CP), síndrome da dor pélvica crônica (CPPS)). Prostatite crônica/síndrome da dor pélvica crônica (CP/CPPS) é caracterizada por dor pélvica ou perineal sem evidência de infecção do trato urinário, durando mais do que 3 meses.
- 20 Estudos reportaram que os níveis de IL-1 β , TNF- α e IL-6 foram elevados significativamente em grupos tendo CPPS inflamatório e não inflamatório comparado com um grupo de controle (Orhan, L, e outros Int. J. Urol. 8(9):495-9, 2001; Alexander, R.B., e outros Urology. 52(5):744-749, 1998; Jang, T.L., e Schaeffer, A.J., World J. Urol. 21(2):95-99, 2003). Os sintomas
- 25 destas síndromes podem aumentar e diminuir. A dor pode variar de desconforto suave a debilitante, e pode radiar das costas e reto, tornando difícil sentar. Disúria (dificuldade ou dor à micção), artralgia (dor em uma articulação),
- 30

mialgia (dor nos músculos), fadiga inexplicável, dor abdominal, dor em queimação constante no pênis, e frequência podem todos estar presentes. A urinação frequente e urgência aumentada podem sugerir cistite intersticial (inflamação centralizada na bexiga ao invés da próstata). A ejaculação pode ser dolorosa, uma vez que a próstata contrai durante a emissão de sêmen, embora a dor pós-ejaculatória mediada pelo nervo e músculo seja mais comum. Alguns pacientes reportam baixa libido, disfunção sexual e dificuldades eréteis. A dor após a ejaculação é uma queixa muito específica que distingue CP/CPPS de homens com hiperplasia prostática benigna (BPH) ou homens normais.

Doença Inflamatória do Intestino (IBD)

O termo "Doença Inflamatória do Intestino (IBD)" se refere a um grupo de condições inflamatórias do intestino grosso e intestino pequeno. IBDs incluem doença de Crohn (CD) e colite ulcerativa (UC). Outras formas de IBD incluem colite colagenosa, colite linfocítica, colite isquêmica, colite, síndrome de Behcet, colite infecciosa e colite indeterminada. Muitos destes distúrbios podem apresentar os sintomas de dor abdominal, vômito, diarreia, hematoquesia (sangue vermelho brilhante), perda de peso e várias queixas associadas ou doenças como artrite, pioderma gangrenoso, e colangite esclerosante primária. Diagnóstico é geralmente por colonoscopia com biópsia de lesões patológicas. Estudos reportaram que as citocinas tais como IL-6, IL-1 e TNF- α desempenham um papel central na modulação do sistema imune intestinal e que as concentrações mucosais e sistêmicas de muitas citocinas pró- e antiinflamatórias são elevadas em IBD (Rogler, G., e Andus, T. World J. Surg. 22(4):382-9, 1998). Estudos também mostraram níveis elevados de TNF- α , IL-1 β e IL-6 em pacientes de Crohn e que as concentrações de IL-1 β e IL-6 no fluido sobrenadante de culturas de biópsia são positivamente correlacionadas com o grau de envolvimento do tecido medido por graduação tanto endoscópica quanto histológica (Reimund, J., e outros Gut, 39:684-689, 1996).

Doença Inflamatória Pélvica (PID)

A doença inflamatória pélvica (PID) se refere à inflamação do ú-

tero feminina, tubos falopianos, e/ou ovários quando progride para a formação de cicatriz com adesões aos órgãos e tecidos próximos. PID pode levar a necrose de tecido e formação de abscesso. Os estudos reportaram que IL-1 β , IL-6 e TNF- α são significativamente elevados em pacientes PID antes do tratamento antibiótico (em relação ao pós-tratamento) e que estas citocinas podem desempenhar um importante papel na patogênese de PID (Lee, S. A., e outros Clin. Chem. Lab. Med. 46(7):997-1003, 2008).

Lesão de Reperfusão

A lesão de reperfusão se refere ao dano ao tecido causado quando o fornecimento de sangue retorna para o tecido após um período de isquemia. A ausência de oxigênio e nutriente de sangue cria uma condição na qual a restauração da circulação resulta na inflamação e dano oxidativo através da indução de tensão oxidativa diferente da restauração da função normal. Os estudos reportaram que IL-6 previne o fígado contra isquemia quente/lesão de reperfusão através da sub-regulação de TNF- α (Camargo, C, e outros Hepatology. 26(6): 1513-1520, 2003). Os sintomas incluem, porém não estão limitados a, níveis elevados de glóbulos brancos, apoptose, e acúmulo de radical livre.

Artrite Reumatoide (RA)

Artrite reumatoide (RA) é um distúrbio crônico, sistêmico autoimune que mais geralmente causa inflamação e lesão de tecido nas articulações (artrite) e bainhas do tendão, junto com anemia. RA também pode produzir inflamação difusa nos pulmões, pericárdio, pleura e na esclera dos olhos, e também lesões nodulares, mais comuns no tecido subcutâneo sob a pele. RA pode ser uma condição dolorosa e incapacitante, que pode levar a perda substancial do funcionamento e mobilidade. Estudos reportaram que os níveis de IL-1 β , IL-6 e TNF- α são elevados no soro de pacientes de artrite juvenil e RA (Ziolkowska, M., e outros J. Immunol. 164:2832-2838, 2000). Os sintomas de RA podem se manifestar nas articulações (inchaço, dor, dormência, uma sensação de queimação localizada, rigidez e movimento restrito); pele (nódulo reumatoide); pulmões (fibrose, síndrome de Caplan, efusões pleurais); rins (anlioidose renal); coração e vasos sanguíneos (ate-

rosclerose, infarto do miocárdio, acidente vascular cerebral); e olhos (episclerite, ceratoconjuntivite seca).

Vasculite

"Vasculite" se refere a um distúrbio caracterizado por destruição inflamatória de vasos sanguíneos (artérias e veias). Estudos reportaram que TNF- α , IL-1, e IL-6 são alvos biológicos potenciais para o tratamento de vasculite sistêmica (Levine, S. M., e Stone, J.H. *Best Prac. Res. Clin. Rheumatol.* 15(2):315-333, 2001. Os sintomas de vasculite geralmente são sistêmicos com disfunção única ou de multiórgão. Estes sintomas podem incluir fadiga, fraqueza, febre, artralgias, dor abdominal, hipertensão, insuficiência renal, e disfunção neurológica. Os sintomas adicionais podem incluir mononeurite múltipla, púrpura palpável (manchas roxas na pele) e síndrome pulmonar-renal. Vasculite por hipersensibilidade (HSV) é uma vasculite secundária devido a uma resposta imune às substâncias exógenas. Estudos reportaram que IL-6 e TNF- α do soro é significativamente mais elevado em paciente de HSV ativo do que em um grupo de controle saudável (Nalbant, S., e outros *Rheumatol. Int.* 22(6):244-248, 2002).

5. Distúrbios: Fibrose

Fibrose é a formação ou desenvolvimento de tecido conectivo fibroso em excesso em um órgão ou tecido como um resultado de lesão ou inflamação de uma parte, ou de interferência com seu fornecimento de sangue. Pode ser uma consequência da resposta de cicatrização normal levando a uma cicatriz, ou pode ser um processo reativo anormal.

Há vários tipos de fibrose incluindo, porém não limitado a, fibrose cística do pâncreas e pulmões, fibrose de injeção, fibrose endomiocárdica, fibrose pulmonar idiopática do pulmão, fibrose mediastinal, mileofibrose, fibrose retroperitoneal, e fibrose sistêmica nefrogênica.

A fibrose cística (CF, mucovídose, mucoviscidose) é um distúrbio recessivo autossômico herdado. É um dos distúrbios genéticos fatais mais comuns nos Estados Unidos, afetando cerca de 30.000 indivíduos, e é mais prevalente na população Caucasiana, ocorrendo em um a cada 3.300 nascidos vivos. O gene envolvido na fibrose cística, que foi identificado em

1989, codifica para uma proteína chamada de reguladora da condução de transmembrana de fibrose cística (CFTR), CFTR normalmente é expressa por epitélios exócrinos por todo o corpo e regula o movimento de íons de cloreto e glutathione dentro e fora das células. Nos pacientes de fibrose cística, as mutações no gene de CFTR levam a alterações ou perda total da função de proteína de CFTR, resultando em defeitos em propriedades de osmolaridade, pH e redox de secreções exócrinas. Nos pulmões, CF se manifesta sozinho pela presença de uma secreção mucosa espessa que obstrui as vias aéreas. Em outros órgãos exócrinos, tais como as glândulas sudoríferas, CF pode não se manifestar sozinho por um fenótipo obstrutivo, porém de preferência por composição de sal anormal das secreções (portanto, o teste de osmolaridade de transpiração clínico para detectar os pacientes de CF). A causa predominante da doença e morte em pacientes de fibrose cística é doença pulmonar progressiva. A espessura de muco de CF, que bloqueia as passagens das vias aéreas, é acreditada provir de anormalidades na osmolaridade de secreções, bem como da presença de quantidades massivas de DNA, actina, proteases e enzimas pró-oxidativas se originando de um subgrupo de células inflamatórias, chamadas neutrófilos. Na verdade, a doença pulmonar CF é caracterizada por reações inflamatórias mediadas por neutrófilo hiperativo precoce, para ambos os patógenos virais e bacterianos. A síndrome hiperinflamatória de pulmões de CF tem vários fundamentos, entre os quais um desequilíbrio entre as quimiocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-8, e citocinas anti-inflamatórias, principalmente IL-10, foi reportado desempenhar um papel principal. Vide, Chmiel e outros Clin Rev Allergy Immunol. 3(1):5-27 (2002). Estudos reportaram que os níveis de TNF- α , IL-6 e IL-1 β foram mais elevados no fluido de lavagem broncoaveolar de pacientes de fibrose cística, do que em fluido de lavagem broncoalveolar de controle saudável (Bondfield, T.L., e outros Am. J. Resp. Crit. Care Med. 152(1):2111-2118, 1995).

A fibrose de injeção (IF) é uma complicação de injeção intramuscular geralmente ocorrendo no quadríceps, tríceps e músculos glúteos de lactantes e crianças na qual os pacientes são incapazes de completa-

mente flexionar o músculo afetado. Tipicamente é sem dor, porém progressivo. Estudos reportaram que a osteopontina de glicoproteína (OPN) desempenha um papel na remodelagem de tecido (Liaw, L., e outros J. Clin. Invest. 101(7):1469-1478, 1998) e que este mediador pró-inflamatório induz a superregulação de IL-1 β em monócitos humanos e uma produção realçada acompanhante de TNF- α e IL-6 (Naldini, A., e outros J. Immunol. 177:4267-4270, 2006; Weber, G.F., e Cantor, H. Citocina Growth Factor Reviews. 7(3):241~248, 1996).

A doença endomiocárdica (síndrome hiperosinofílica (HS)) é um processo de doença caracterizado por uma contagem de eosinófilo persistentemente elevada (>1500 eosinófilos/mm³) no sangue. HS afeta simultaneamente muitos órgãos. Estudos reportaram que IL-1 β , IL-6 e TNF- α são expressos em níveis elevados em pacientes de miocardite induzida por vírus (Sato, M., e outros Virchows Archiv. 427(5):503-509, 1996). Os sintomas podem incluir cardiomiopatia, lesões da pele, doença tromboembólica, doença pulmonar, neuropatia, hepatoesplenomegalia (aumento coincidente do fígado e baço), e tamanho ventricular reduzido. O tratamento pode incluir a utilização de corticosteroides para reduzir os níveis de eosinófilos.

A fibrose pulmonar idiopática (IPF, alveolite fibrosante criptogênica) é uma doença pulmonar intersticial progressiva crônica de causa desconhecida. Está associado com um padrão histológico de pneumonia intersticial usual e pode ser caracterizado por deposição anormal e excessivo de tecido fibrótico no interstício pulmonar com inflamação associada mínima. Os estudos reportaram aumentos significantes na liberação de TNF- α e IL-6 em pacientes com fibrose pulmonar idiopática (IPF) (Zhang, Y., e outros J. Immunol. 150(9):4188-4196, 1993), que foi atribuído ao nível de expressão de IL-1 β (Kolb, M., e outros J. Clin. Invest. 107(12): 1529-1536, 2001). Os sintomas incluem dispneia (respiração difícil), porém também inclui tosse não produtiva, baqueteamento (uma desfiguração dos dedos), e estalos (som de estalo nos pulmões durante a inalação).

Fibrose mediastinal (MF) é caracterizada por fibrose invasiva, calcificada centralizada nos linfonodos que bloqueia os vasos principais e

vias aéreas. MF é uma complicação tardia de histoplasmose. Os estudos em modelos de murino de fibrose reportaram que IL-1 β e TNF- α são significativamente elevados (Ebrahimi, B., e outros Am. J. Pathol. 158:2117-2125, 2001).

5 Mielofibrose (metaplasia mieloide, mielofibrose idiopática crônica, mielofibrose primária) é um distúrbio da medula óssea na qual a medula óssea sofre de fibrose. Mielofibrose leva a insuficiência da medula óssea progressiva. A sobrevivência média é de cinco anos e a causa de morte inclui infecção, hemorragia, falha do órgão, hipertensão portal, e transformação leucêmica. Foi reportado que os níveis de TNF- α e IL-6 são elevados em modelos de animais de mielofibrose induzida por vírus (Bousse-Kerdiles, M., e outros Ann. Hematol. 78:434-444, 1999).

15 Fibrose Retroperitoneal (doença de Ormond) é uma doença apresentando a proliferação de tecido fibroso no retroperitônio. O retroperitônio é o compartimento do corpo contendo os rins, aorta, trato renal, e outras estruturas. Foi reportado que IL-1, IL-6 e TNF- α têm funções importantes na patogênese de fibrose retroperitoneal (Demko, T., e outros J. Am. Soc. Nephrol. 8:684-688, 1997). Os sintomas de fibrose retroperitoneal podem incluir, porém não estão limitados a, dor lombar, insuficiência renal, hipertensão, e trombose venosa profunda.

20 Fibrose sistêmica nefrogênica (NSF, dermatia fibrosante nefrogênica) envolve fibrose da pele, articulações, olhos e órgãos internos. NSF pode estar associado com a exposição ao gadolínio. Os pacientes desenvolveram grandes áreas de pele endurecida com plaquetas e nódulos fibróticos. Contraturas de flexão com uma limitação acompanhante de variação de movimento também pode ocorrer, NSF mostra uma proliferação de fibroblastos dérmicos e células dendríticas, feixes de colágeno espessos, fibras elásticas aumentadas, e depósitos de mucina. Alguns relatos sugeriram que um estado pró-inflamatório fornece um fator de predisposição para

25

30 causar a fibrose sistêmica nefrogênica (Saxena, S., e outros Int. Urol. Nephrol. 40:715-724, 2008), e que o nível de TNF- α é elevado em modelos de animais de fibrose sistêmica nefrogênica (Steger-Hartmann, T., e outros Ex-

per. Tox. Pathol. 61(6):537-552, 2009).

6. Distúrbios: Disfunção Celular Endotelial

A disfunção celular endotelial (disfunção endotelial) se refere a disfunção fisiológica de processos bioquímicos normais realizados pelo endotélio, tais como mediação de coagulação, de adesão de plaqueta, de função imune, e de controle de volume e teor de eletrólito dos espaços intravasculares e extravasculares. A disfunção endotelial pode resultar de processos de doença, tais como, por exemplo, choque séptico, hipertensão, hipercolesterolemia, e diabetes bem como de fatores ambientais, tais como de tabagismo, produtos do tabaco. Estudos reportaram que sob a influência de citocinas, tais como IL-6, IL-1 β , e TNF- α , a dilatação dependente de endotélio pode ser comprometida e o endotélio pode perder sua capacidade de responder aos hormônios circulantes ou autacoides. Este efeito pode favorecer uma predisposição ao espasmo dos vasos, trombose ou aterogênese (Vila, E. e Salaices, M. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 288:H1016-H1021, 2005). Além disso, estudos sugeriram que a superexpressão de IL-6, como regulado por IL-1 β and TNF- α , tem um importante papel na disfunção celular endotelial (Kornman, K. e outros J. Perio. Res. 34(7):353-357 (2006); Libby, P., e outros Circulation. 86 (6 Suppl): III47-52 (1992)).

A disfunção endotelial pode ser caracterizada pela incapacidade das artérias e arteríolas dilatar em resposta a um estímulo apropriado. Por exemplo, células endoteliais disfuncionais (tendo vasodilatação reduzida) são incapazes de produzir óxido nítrico (NO) na mesma medida como células endoteliais saudáveis. Esta diferença é detectável por uma variedade de métodos incluindo iontoforese de acetilcolina, administração intra-arterial de vários agentes vasoativos, aquecimento localizado da pele e oclusão arterial temporária inflando-se um manguito de pressão sanguínea para pressões elevadas. O teste também ocorre nas próprias artérias coronárias, entretanto este procedimento invasivo normalmente não é realizado a menos que haja uma razão clínica para cateterização intracoronariana. Estas técnicas são consideradas estimular o endotélio a liberar NO que difunde no músculo liso vascular circundante causando a vasodilação.

Os sistemas que permitem a liberação de proteínas recombinantes biologicamente ativas e terapêuticos de peptídeo foram o objetivo de numerosos estudos. Os sistemas para liberação localizada de agentes terapêuticos permitem que os efeitos biológicos de tais agentes alcancem maior
5 eficácia.

Desafios persistem para liberar proteínas recombinantes para alvos desejados *in vivo*. Apesar dos desenvolvimentos na área de peptídeos de transdução de proteína, os métodos de liberação clássicos de genes de codificação de proteína através de vírus adenoassociado, adenovírus, lentivírus, vetores do vírus do herpes, e vetores de expressão de plasmídeo continuam sendo a escolha preferida para expressão de proteínas.
10

A expressão de gene mediada por vetor viral é considerada o método mais eficiente e confiável para expressar as proteínas funcionais de novo em tipos celulares mitoticamente ativos ou pós-mitoticamente bloqueados devido à capacidade natural de tais vetores de liberar os genes específicos para células permissivas. Todavia, vetores virais invariavelmente são
15 requeridos em grandes doses para obter níveis de expressão terapêuticos das proteínas pretendidas. Além disso, os vetores virais podem integrar com o material de cromatina hospedeiro. Estas propriedades exercem efeitos prolongados sobre os sistemas genéticos do hospedeiro, e, portanto, a segurança continua uma questão seria para sua aplicação clínica final.
20

Um método alternativo, seguro é produzir proteínas recombinantes exogenamente e em seguida liberá-las sistemicamente ou por injeções localizadas nos órgãos alvos. Entretanto, a liberação e biodisponibilidade de
25 proteínas recombinantes em células ou tecidos também precisa de melhoramentos. Embora vários estudos tenham sugerido o potencial de PTD na descoberta de fármaco e transdução de proteínas até 120 kDa em diferentes células, as questões sobre potência de transdução de proteína mediada por PTD ainda continuam não resolvidas. Na verdade, alguns estudos demonstraram falhas em transdução de proteína de fusão mediada por PTD *in vitro/in vivo* bem como uma capacidade de induzir uma resposta imune. Além
30 disso, alguns estudos mostraram que a expressão intracelular de proteínas

de fusão de PTD ou outras proteínas não secretórias pode não obter a mesma biodistribuição como proteína recombinante, e a entrada de PTD através da barreira hematoencefálica continua elusiva.

5 A invenção descrita fornece peptídeos inibidores terapêuticos para a inibição de quinases, uso de uma classe de peptídeos que inclui domínios terapêuticos e domínios de transdução de proteína como inibidores da atividade de quinase, e usos de PTDs como agentes terapêuticos para uma variedade de distúrbios.

SUMÁRIO

10 A invenção descrita fornece composições de inibição de quinase contendo uma quantidade terapêutica de um peptídeo inibidor terapêutico que inibe pelo menos uma enzima quinase, métodos para tratar um distúrbio inflamatório cuja patofisiologia compreende a expressão de citocina inflamatória, e métodos para tratar um distúrbio inflamatório cuja patofisiologia com-
15 preende expressão de citocina inflamatória utilizando as composições de inibição de quinase.

De acordo com um aspecto, a invenção descrita fornece uma composição de inibição de quinase para tratar um distúrbio inflamatório cuja patofisiologia compreende expressão de citocina inflamatória, a composição
20 compreendendo (a) uma quantidade terapeuticamente eficaz de um peptídeo inibidor terapêutico, onde a quantidade terapeuticamente eficaz do peptídeo inibidor terapêutico inibe pelo menos uma enzima quinase, onde o peptídeo inibidor terapêutico compreende um primeiro domínio e um segundo domínio, onde o primeiro domínio compreende um domínio de transdução de
25 proteína e está localizado próximo ao segundo domínio, onde o segundo domínio compreende um domínio terapêutico e está localizado próximo ao primeiro domínio, e (b) um veículo farmaceuticamente aceitável, onde a composição diretamente ou indiretamente reduz a expressão de pelo menos uma citocina inflamatória. De acordo com uma modalidade, o peptídeo inibi-
30 dor terapêutico é um peptídeo cuja sequência de aminoácido tem identidade substancial com a sequência de aminoácido Y ARRAAARQ ARAKAL ARQLG V AA [SEQ ID NO; 71]. De acordo com outra modalidade, o domínio

terapêutico do peptídeo inibidor terapêutico tem identidade substancial com a sequência de aminoácido KALNRQLG V AA [SEQ ID NO: 13]. De acordo com outra modalidade, o domínio de transdução do peptídeo inibidor terapêutico tem identidade substancial com a sequência de aminoácido WLRRI-KAWLRRIKA [SEQ ID NO: 31]. De acordo com outra modalidade, o domínio de transdução de proteína do peptídeo inibidor terapêutico tem identidade substancial com a sequência de aminoácido YARAAARQ ARA [SEQ ID NO: 5]. De acordo com outra modalidade, o domínio de transdução de proteína do peptídeo inibidor terapêutico tem identidade substancial com a sequência de aminoácido F AKL A ARL YRKA [SEQ ID NO: 43]. De acordo com outra modalidade, o domínio de transdução do peptídeo inibidor terapêutico tem identidade substancial com a sequência de aminoácido FAKLAARL YRKALARQLGV AA [SEQ ID NO: 12]. De acordo com outra modalidade, o domínio de transdução de proteína do peptídeo inibidor terapêutico tem identidade substancial com a sequência de aminoácido KAFAKLAARLYRKA [SEQ ID NO: 44]. De acordo com outra modalidade, o peptídeo inibidor terapêutico é um peptídeo cuja sequência de aminoácido tem identidade substancial com a sequência de aminoácido KAFAKLAARL YRKAL ARQLGV A A [SEQ ID NO: 15]. De acordo com outra modalidade, o polipeptídeo compreende pelo menos um variante que é pelo menos 90% idêntico a pelo menos uma das SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, e SEQ ID NO: 15 e que inibe a excreção de TNF- α . De acordo com outra modalidade, o polipeptídeo compreende pelo menos um variante que é pelo menos 90% idêntico a pelo menos uma das SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, e SEQ ID NO: 15 e que inibe a excreção de IL-1 β . De acordo com outra modalidade, o polipeptídeo compreende pelo menos um variante que é pelo menos 90% idêntico a pelo menos uma das SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, e SEQ ID NO: 15 e que inibe a excreção de IL-6. De acordo com outra modalidade, a enzima quinase é uma proteína quinase ativada por proteína quinase ativada por mitógeno. De acordo com outra modalidade, a enzima quinase é proteína quinase ativada por proteína quinase ativada por mitógeno 2. De acordo com outra modalidade, a enzima quinase é

proteína quinase ativada por proteína quinase ativada por mitógeno 3. De acordo com outra modalidade, a enzima quinase é proteína quinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina. De acordo com outra modalidade, o distúrbio inflamatório cuja patofisiologia compreende expressão de citocina inflamatória é pelo menos um distúrbio selecionado do grupo consistindo em asma, espondilite ancilosante, diabetes Tipo I, síndrome de Guilliame-Barre, lúpus, psoríase, escleroderma, doença de Sjorgen, prostatite crônica, glomerulonefrite, doença inflamatória do intestino, doença inflamatória pélvica, lesão de reperfusão, artrite reumatoide, vasculite, vasculite por hipersensibilidade, choque endotóxico, pancreatite, doença inflamatória localizada, aterosclerose, mal de Alzheimer, isquemia, hiperplasia íntima, estenose, restenose, leiomioma, espasmos do músculo liso, angina, angina de Prinzmetal, braquicardia, hipertensão, hipertrofia cardíaca, insuficiência renal, acidente vascular cerebral, hipertensão pulmonar, toxemia de gravidez, doença de Raynaud, uremia hemolítica, fissura anal, acalasia, impotência, enxaqueca, vasculopatia, insuficiência cardíaca congestiva, miocárdio atordado, disfunção diastólica, gliose, doença pulmonar obstrutiva crônica, osteopenia, artrite degenerativa, sepse, cirrose, fibrose intersticial, colite, apendicite, gastrite, laringite, meningite, otite, lesão cerebral traumática, lesão da medula espinhal, neuropatia periférica, esclerose múltipla, síndrome cardiometabólica, esteatoepatite não alcoólica, fibrose cística do pâncreas e pulmões, fibrose de injeção, fibrose endomiocárdica, fibrose pulmonar idiopática do pulmão, fibrose mediastinal, mielofibrose, fibrose retroperitoneal, fibrose sistêmica nefrogênica, câncer de mama, câncer de próstata e disfunção da célula endotelial. De acordo com outra modalidade, a pelo menos uma citocina inflamatória é pelo menos uma dentre IL-6, $\text{TNF}\alpha$, e IL- $\text{I}\beta$. De acordo com outra modalidade, a composição está disposta sobre ou dentro de um dispositivo médico.

De acordo com outro aspecto, a invenção descrita fornece um método para tratar um distúrbio inflamatório cuja patofisiologia compreende expressão de citocina inflamatória, o método compreendendo as etapas de (a) fornecer uma composição de inibição de quinase, onde a composição de

inibição de quinase compreende (i) uma quantidade terapeuticamente eficaz de um peptídeo inibidor terapêutico, onde a quantidade terapeuticamente eficaz do peptídeo inibidor terapêutico inibe pelo menos uma enzima quinase, onde o peptídeo inibidor terapêutico compreende um primeiro domínio e
5 um segundo domínio, onde o primeiro domínio compreende um domínio de transdução de proteína localizado próximo ao segundo domínio, onde o segundo domínio compreende um domínio terapêutico localizado próximo ao primeiro domínio, e (ii) um veículo farmaceuticamente aceitável; (b) administrar a composição de inibição de quinase a um paciente em necessidade da
10 mesma, desse modo inibindo pelo menos uma enzima quinase; e (c) reduzir a expressão de pelo menos uma citocina inflamatória, por meio da qual tratando o distúrbio. De acordo com uma modalidade, o peptídeo inibidor terapêutico é um peptídeo cuja sequência de aminoácido tem identidade substancial com a sequência de aminoácido YARRAAARQARAKALARQLGVAA
15 [SEQ ID NO: 71]. De acordo com outra modalidade, o domínio terapêutico do peptídeo inibidor terapêutico tem identidade substancial com a sequência de aminoácido KALNRQLGV AA [SEQ ID NO: 13]. De acordo com outra modalidade, o domínio de transdução de proteína do peptídeo inibidor terapêutico tem identidade substancial com a sequência de aminoácido WLRRRI-
20 KA WLRRRIKA [SEQ ID NO: 31]. De acordo com outra modalidade, o domínio de transdução de proteína do peptídeo inibidor terapêutico tem identidade substancial com a sequência de aminoácido YARAAARQARA [SEQ ID NO: 5]. De acordo com outra modalidade, o domínio de transdução de proteína do peptídeo inibidor terapêutico tem identidade substancial com a sequência de aminoácido F AKL AARL YRKA [SEQ ID NO: 43]. De acordo
25 com outra modalidade, o domínio de transdução de proteína do peptídeo inibidor terapêutico tem identidade substancial com a sequência de aminoácido F AKL A ARL YRKAL ARQL GVAA [SEQ ID NO: 12]. De acordo com outra modalidade, o domínio de transdução de proteína do peptídeo inibidor
30 terapêutico tem identidade substancial com a sequência de aminoácido KAFKLAARLYRKA [SEQ ID NO: 44]. De acordo com outra modalidade, o peptídeo inibidor terapêutico é um peptídeo cuja sequência de aminoácido

tem identidade substancial com a sequência de aminoácido KAF AKLAARL YRKALARQLGV AA [SEQ ID NO: 15]. De acordo com outra modalidade, o polipeptídeo compreende pelo menos um variante que é pelo menos 90% idêntica a pelo menos uma das SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, e SEQ ID NO: 15 e que inibe a excreção de TNF- α . De acordo com outra modalidade, o polipeptídeo compreende pelo menos um variante que é pelo menos 90% idêntica a pelo menos uma das SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, e SEQ ID NO: 15 e que inibe a excreção de IL-1 β . De acordo com outra modalidade, o polipeptídeo compreende pelo menos um variante que é pelo menos 90% idêntica a pelo menos uma das SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, e SEQ ID NO: 15 e que inibe a excreção de IL-6. De acordo com outra modalidade, a enzima quinase é uma proteína quinase ativada por proteína quinase ativada por mitógeno. De acordo com outra modalidade, a enzima quinase é proteína quinase ativada por proteína quinase ativada por mitógeno 2. De acordo com outra modalidade, a enzima quinase é proteína quinase ativada por proteína quinase ativada por mitógeno 3. De acordo com outra modalidade, a enzima quinase é proteína quinase dependente de Ca²⁺/calmodulina. De acordo com outra modalidade, o distúrbio inflamatório cuja patofisiologia compreende expressão de citocina inflamatória é pelo menos um distúrbio selecionado do grupo consistindo em asma, espondilite ancilosante, diabetes Tipo I, Síndrome de Guillaume-Barre, lúpus, psoríase, escleroderma, doença de Sjorgen, prostatite crônica, glomerulonefrite, doença inflamatória do intestino, doença inflamatória pélvica, lesão de reperfusão, artrite reumatoide, vasculite, vasculite por hipersensibilidade, choque endotóxico, pancreatite, doença inflamatória localizada, aterosclerose, mal de Alzheimer, isquemia, hiperplasia íntima, estenose, restenose, leiomioma, espasmos do músculo liso, angina, angina de Prinzmetal, braquicardia, hipertensão, hipertrofia cardíaca, insuficiência renal, acidente vascular cerebral, hipertensão pulmonar, toxemia de gravidez, doença de Raynaud, uremia hemolítica, fissura anal, acalasia, impotência, enxaqueca, vasculopatia, insuficiência cardíaca congestiva, miocárdio atordado, disfunção diastólica, gliose, doença pulmonar obstrutiva crônica,

osteopenia, artrite degenerativa, sepse, cirrose, fibrose intersticial, colite, apendicite, gastrite, laringite, meningite, otite, lesão cerebral traumática, lesão da medula espinhal, neuropatia periférica, esclerose múltipla, síndrome cardiometabólica, esteatoepatite não alcoólica, fibrose cística do pâncreas e pulmões, fibrose de injeção, fibrose endomiocárdica, fibrose pulmonar idiopática do pulmão, fibrose mediastinal, mielofibrose, fibrose retroperitoneal, fibrose sistêmica nefrogênica, câncer de mama, câncer de próstata, e disfunção da célula endotelial. De acordo com outra modalidade, a pelo menos uma citocina inflamatória é pelo menos uma das IL-6, TNF α , e IL-1 β . De acordo com outra modalidade, administração da etapa (a) é implantando-se um dispositivo bioquímico, onde a composição fica disposta sobre ou dentro do dispositivo. De acordo com outra modalidade, a etapa de administração (a) é parenteralmente.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1 mostra um plote de atividade (% relativo ao controle) versus concentração de peptídeo inibidor (μ M). A Figura 1 descreve SEQ ID NOs: 5, 30, 67-70 e 16, respectivamente, em ordem de aparência.

Figura 2 mostra um plote de atividade (% relativo ao controle) versus concentração de peptídeo inibidor (μ M). A Figura 2 descreve SEQ ID NOs: 14, 12, 15, 11 e 16, respectivamente, em ordem de aparência.

Figura 3 mostra um plote de velocidade de reação (RFU/s) versus concentração de peptídeo inibidor de MK2 (μ M). RFU/s = unidades de fluorescência relativa por segundo. A Figura 3 descreve SEQ ID NOs: 22-28 e 13, respectivamente, em ordem de aparência.

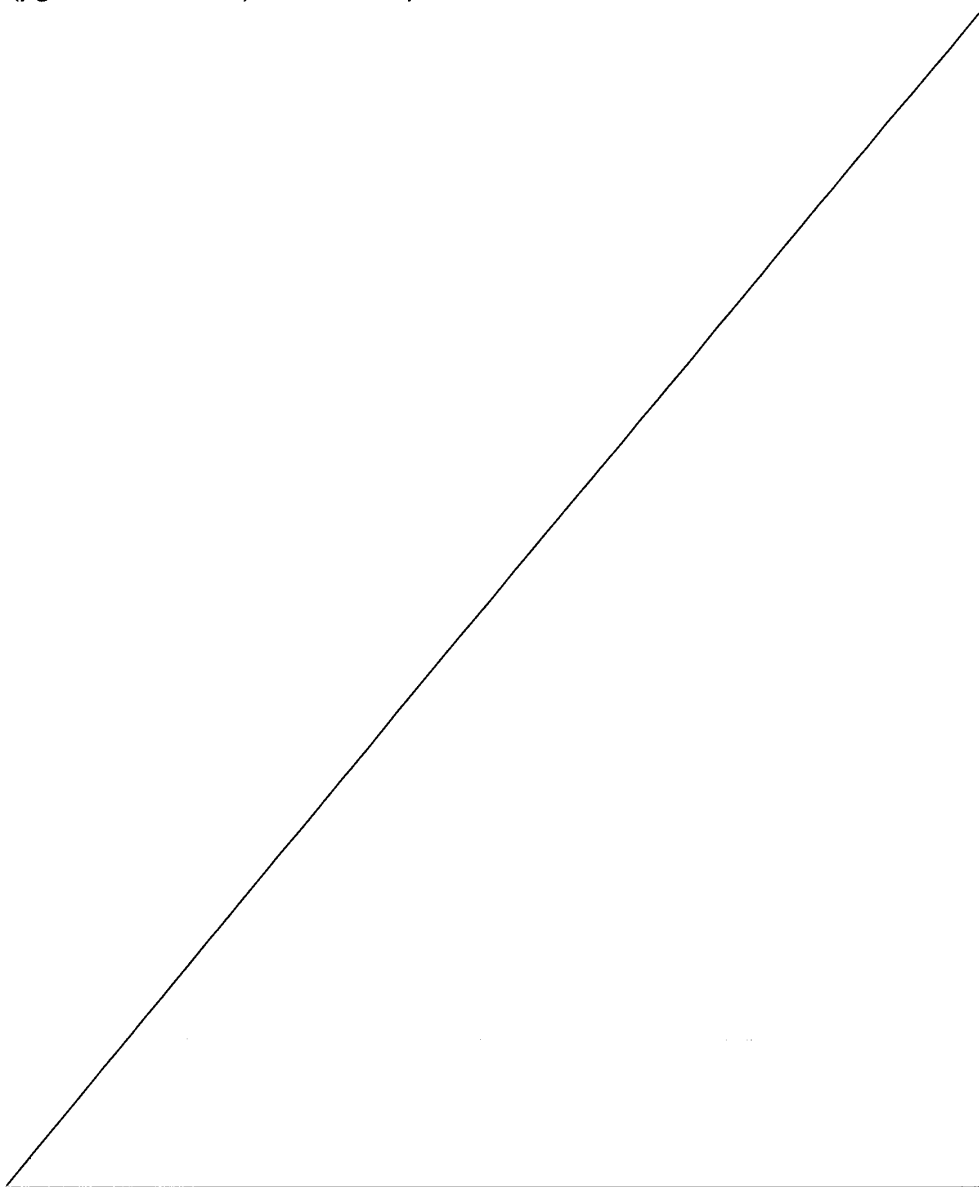
Figura 4 mostra um plote de velocidade de reação (RFU/s) versus concentração de peptídeo inibidor MK2 (μ). RFU/s = unidades de fluorescência relativa por segundo. A Figura 4 descreve "KALNRQLGVAA" como SEQ ID NO: 13.

Figura 5 mostra um plote de velocidade de reação (RFU/s) versus concentração de peptídeo inibidor MK2 (μ M). RFU/s = unidades de fluo-

rescência relativa por segundo. A Figura 5 descreve SEQ ID NOs: 29-30, 14 e 13, respectivamente, em ordem de aparência.

Figura 6 mostra um plote de velocidade de reação versus (RFU/s) concentração de peptídeo inibidor MK2 (μM). RFU/s = unidades de fluorescência relativa por segundo. A Figura 6 descreve SEQ ID NOs: 32, 31, 5 e 13, respectivamente, em ordem de aparência.

Figura 7 mostra um plote da concentração média de IL-6 ($\text{pg/ml}/10^5$ células) contra tempo. YARA = YARAAARQ ARAKALARQLGV



AA [SEQ ID NO: 11]. † – significativamente mais elevado do que 1 ng/mL de amostras tratadas com IL-1 β . * = significativamente menor do que 1 ng/mL de amostras tratadas com IL-1 β . As barras de erro representam desvio padrão entre as três amostras.

5 Figura 8 mostra um plote da concentração média de IL-6 (pg/ml/10⁵ células) contra tempo. YARA = YARAAARQARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 11]; FAK = FAKLAARLYRKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 12]. * - significativamente menor do que 1 ng/mL de amostras tratadas com TNF- α . As barras de erro representam desvio padrão entre as três amostras,

10 Figura 9 mostra um plote da concentração média de IL-6 (pg/ml/10⁵ células) contra tempo. YARA = YARAAARQARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 11]; FAK = FAKLAARLYRKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 12]. * = significativamente menor do que 10 ng/mL de amostras tratadas com TNF- α . As barras de erro representam desvio padrão entre as três amostras.

15 Figura 10 mostra um gráfico da concentração média de IL-1 β (pg/ml) de cada grupo de tratamento (i) MK2i a 1mM (peptídeo inibidor terapêutico YARAAARQARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 11]) com TNF- α (5 ng/ml); (ii) MK2i a 3 mM com TNF- α (5 ng/ml); (iii) MK2i a 1 mM com TNF- α (10 ng/ml); e (iv) MK2i a 3 mM com TNF- α (10 ng/ml).

20 Figura 11 mostra um gráfico da concentração média de IL-6 (pg/ml) de cada grupo de tratamento (i) controle negativo (média somente); (ii) TNF- α (5 ng/ml); (iii) TNF- α (10 ng/ml); (iv) TNF- α (5 ng/1) e MK2i (peptídeo inibidor terapêutico a 1 mM YARAAARQARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 11]); (v) TNF- α (10 ng/ml) e MK2i (1 mM); (vi) TNF- α (5 ng/ml) e MK2i (3 mM); e (vii) TNF- α (10 ng/ml) e MK2i (3 mM).

25 **DESCRIÇÃO DETALHADA**

A invenção descrita fornece composições de inibição de quinase terapêuticas e métodos úteis para inibir proteínas quinases ativadas por proteínas quinases ativadas por mitógeno.

30 **GLOSSÁRIO**

As abreviações utilizadas aqui para aminoácidos são aquelas abreviações que são convencionalmente utilizadas: A= Ala= Alanina;

- R=Arg=Arginina; N=Asn=Asparagina; D=Asp=Ácido aspártico; C=Cys=Cisteína; Q=Gln=Glutamina; E=Glu=Ácido glutâmico; G=Gly=Glicina; H=His=Histidina; I=Ile=Isoleucina; L=Leu=Leucina; K=Lys=Lisina; MTMMet=Metionina; F=Phe=Fenilalanina; P=Pro=Prolina; S=Ser=Serina; T=Thr=Treonina; W=Trp=Triptofano; Y=Tyr=Tirosina; V=Val=Valina. Os aminoácidos podem ser L- ou D-aminoácidos. Um aminoácido pode ser substituído por um aminoácido sintético que é alterado para aumentar a meia vida do peptídeo ou aumentar a potência do peptídeo, ou aumentar a biodisponibilidade do peptídeo.
- O termo "administrador" como utilizado aqui se refere a distribuição, fornecimento, aplicação, aplicação, divisão ou contribuição. Os termos "administrar" ou "administração" são utilizados alternadamente e incluem administração *in vivo*, bem como administração diretamente ao tecido *ex vivo*. Geralmente, as composições podem ser administradas sistemicamente ou oralmente, bucalmente, parenteralmente, topicamente, por inalação ou insuflação (isto é, através da boca ou através do nariz), ou retalmente em formulações de unidade de dosagem contendo portadores, adjuvantes e veículos farmacologicamente aceitáveis convencionais não tóxicos, como desejado, ou podem ser localmente administrados por meios tais como, porém não limitados a, injeção, implantação, enxertia, aplicação tópica, ou parenteralmente. O termo "parenteral" como utilizado aqui se refere a introdução no corpo por modo de uma injeção (isto é, administração por injeção), incluindo, por exemplo, subcutaneamente (isto é, uma injeção embaixo da pele), intramuscularmente (isto é, uma injeção dentro de um músculo), intravenosamente (isto é, uma injeção dentro de uma veia), intratecalmente (isto é, uma injeção dentro do espaço ao redor da medula espinhal ou sob a membrana aracnoide do cérebro), injeção intraesternal ou técnicas de infusão. Uma composição parenteralmente administrada é liberada utilizando uma agulha, por exemplo, uma agulha cirúrgica. O termo "agulha cirúrgica" como utilizado aqui, se refere a qualquer agulha adaptada para liberação de composições fluidas (isto é, capazes de fluir) em uma estrutura anatômica selecionada. Preparações injetáveis, tais como suspensões oleaginosas ou aquosas

injetáveis estéreis, podem ser formuladas de acordo com a técnica conhecida utilizando agentes umectantes ou dispersantes e agentes de suspensão adequados.

5 A administração adicional pode ser realizada, por exemplo, intravenosamente, pericardialmente, oralmente, através de implante, transmucosalmente, transdermicamente, intramuscularmente, subcutaneamente, intraperitonealmente, intratecalmente, intralinfaticamente, intralesionalmente, ou epiduralmente. A administração pode ser realizada, por exemplo, uma vez, uma pluralidade de vezes, e/ou durante um ou mais períodos prolongados. Os termos "administração tópica" e "topicamente administrando" como
10 utilizado aqui são utilizados alternadamente para se referir a liberação de um peptídeo, ácido nucleico, ou um vetor compreendendo o peptídeo ou o ácido nucleico em uma ou mais superfícies de um tecido ou célula, incluindo superfície epiteliais.

15 Administração tópica, ao contrário da administração transdérmica, geralmente fornece um efeito sistêmico ao invés de local. Os termos "administração tópica" e "administração transdérmica" como utilizado aqui, a menos que de outro modo declarado ou implicado, são utilizado alternadamente.

20 O termo "associado" e suas várias formas gramaticais como utilizado aqui se refere a ligação, conexão, ou combinação com, ou diretamente, indiretamente, ativamente, inativamente, inertemente, não inertemente, completamente ou incompletamente.

25 O termo "biocompatível" como utilizado aqui se refere a causar nenhuma irritação, lesão, reação tóxica ou reação imunológica no tecido clinicamente relevante ao tecido vivo com base em uma avaliação de risco/benefício clínica.

30 O termo "biodegradável" como utilizado aqui se refere ao material que degradará ativamente ou passivamente com o passar do tempo por processos químicos simples, por ação de enzimas corporais ou por outros mecanismos similares no corpo humano.

O termo "veículo" como utilizado aqui se refere a um ingrediente

orgânico ou inorgânico, natural ou sintético, com o qual o ingrediente ativo é combinado para facilitar a aplicação a qual não cause irritação significativa a um organismo e não anule a atividade biológica e propriedades da composição da invenção descrita. Os veículos devem ser de pureza suficientemente elevada e de toxicidade suficientemente baixa para torna-los adequados para administração a um paciente sendo tratado. O veículo pode ser inerte, ou pode possuir benefícios farmacêuticos, benefícios cosméticos ou ambos.

O termo "condição" como utilizado aqui se refere a uma variedade de estados de saúde e é pretendido incluir distúrbios ou doenças causadas por qualquer mecanismo subjacente ou distúrbio, lesão, e a promoção de órgãos e tecidos saudáveis.

O termo "contatar" como utilizado aqui se refere a levar ou colocar em contato. O termo "contato" como utilizado aqui se refere a um estado ou condição de tocar ou de proximidade imediata ou local. Contatar uma composição a um destino alvo, tal como, porém não limitado a, um órgão, tecido, célula ou tumor, pode ocorrer por qualquer meio de administração conhecido pelo técnico versado.

O termo "elemento regulador controlável" como utilizado aqui se refere às sequências de ácido nucleico capazes de afetar a expressão dos ácidos nucleicos, ou o produto de peptídeo ou proteína da mesma. Os elementos reguladores controláveis podem ser operavelmente ligados aos ácidos nucleicos, peptídeos, ou proteínas da presente invenção. Os elementos reguladores controláveis, tais como, porém não limitado a, sequências de controle, necessitam ser contíguos com os ácidos nucleicos, peptídeos, ou proteínas cuja expressão eles controlam contanto que eles funcionem para dirigir a expressão dos mesmos. Desse modo, por exemplo, sequências ainda transcritas não transladas intervenientes podem estar presente entre uma sequência promotora e um ácido nucleico da presente invenção e a sequência promotora pode ainda ser considerada "operavelmente ligada" à sequência de codificação. Outras tais sequências de controle incluem, porém não estão limitadas a, sinais de poliadenilação, sinais de terminação, e sítios de ligação de ribossoma.

O termo "liberação controlada" é pretendido referir-se a qualquer formulação contendo fármaco na qual a maneira e perfil da liberação de fármaco da formulação são controlados. Isto se refere às formulações de liberação imediata bem como não imediata, com formulações de liberação não imediata incluindo, porém não limitado a, formulações de liberação prolongada e liberação retardada.

O termo "citocina" como utilizado aqui se refere a pequenas substâncias de proteína solúveis secretadas por células que têm uma variedade de efeitos sobre outras células. As citocinas mediam muitas funções fisiológicas importantes incluindo crescimento, desenvolvimento, cura de ferida, e a resposta imune. Elas agem ligando-se aos seus receptores específicos de célula localizados na membrana celular, que permite que uma cascata de transdução de sinal distinta comece na célula, o que eventualmente levará às alterações bioquímicas e fenotípicas nas células-alvo. Geralmente, as citocinas agem localmente. Elas incluem as citocinas Tipo I, que abrangem muitas das interleucinas, bem como vários fatores de crescimento hematopoiéticos; citocinas tipo II, incluindo os interferons e interleucina-10; moléculas relacionadas com o fator de necrose de tumor ("TNF"), incluindo TNF α e linfotoxina; membros da superfamília de imunoglobulina, incluindo interleucina 1 ("IL-1"); e as quimiocinas, uma família de moléculas que desempenha um papel crítico em uma grande variedade de funções imunes e inflamatórias. A mesma citocina pode ter diferentes efeitos em uma célula dependendo do estado da célula. As citocinas geralmente regulam a expressão de, e ativam as cascatas de, outras citocinas.

O termo "liberação retardada" é utilizada aqui em seu sentido convencional para referir-se a uma formulação de fármaco na qual há um atraso no tempo entre a administração da formulação e a liberação do fármaco dela. "Liberação retardada" pode ou não envolver liberação gradual de fármaco durante um período prolongado de tempo, e desse modo pode ou não pode ser "liberação prolongada".

O termo "doença" ou "distúrbio" como utilizado aqui geralmente se refere a um prejuízo da saúde ou uma condição de funcionamento anor-

mal. Os distúrbios relevantes à invenção descrita podem incluir, porém não estão limitados a, doenças inflamatórias, fibrose, choque endotóxico, pancreatite, asma, doença inflamatória localizada, doença cardiovascular aterosclerótica, Mal de Alzheimer, doença oncológica, isquemia neural, artrite reumatoide, Doença de Crohn, doença inflamatória do intestino, hiperplasia íntima, estenose, reestenose, aterosclerose, tumores da célula do músculo liso e metástase, espasmo do músculo liso, angina, angina de Prinzmetal, isquemia, bradicardia, hipertensão, hipertrofia cardíaca, insuficiência renal, acidente vascular cerebral, hipertensão pulmonar, toxemia de gravidez, parto prematuro, pré-eclampsia, eclampsia, Doença de Raynaud ou fenômeno, uremia hemolítica, fissura anal, acalasia, impotência, enxaqueca, lesão muscular isquêmica associada com espasmo do músculo liso, vasculopatia, bradiarritmia, insuficiência cardíaca congestiva, miocárdio atordado, hipertensão pulmonar, disfunção diastólica, gliose (significando a proliferação de astrócitos, o que pode incluir a deposição de matriz extracelular (ECM) em áreas danificadas do sistema nervoso central), doença pulmonar obstrutiva crônica (significando doenças do trato respiratório caracterizadas por obstrução ou limitação do fluxo de ar; inclui, porém não limitado a bronquite crônica, e enfisema), osteopenia, disfunção endotelial, inflamação, artrite degenerativa, espondilite anquilosante, Doença de Sjorgen, doença de Guillame-Barre, doença infecciosa, sepse, choque endotoxêmico, psoríase, enterite por radiação, escleroderma, cirrose, fibrose intersticial, colite, apendicite, gastrite, laringite, meningite, pancreatite, otite, lesão de reperfusão, lesão cerebral traumática, lesão da medula espinhal, neuropatia periférica, esclerose múltipla, Lúpus, alergia, doenças cardiometabólicas obesidade, diabetes melito tipo II, diabetes melito Tipo I, e NASH/cirrose.

O termo "domínio" como utilizado aqui se refere a uma unidade estrutural de uma proteína que duplica mais ou menos independentemente para formar uma estrutura compacta globular. O termo "fármaco" como utilizado aqui se refere a um agente terapêutico ou qualquer substância, exceto comida, utilizada na prevenção, diagnóstico, alívio, tratamento ou cura de doença.

O termo "hibridização" se refere à ligação de duas moléculas de ácido nucleico de filamento único a cada outra através de pareamento de base. Os nucleotídeos se ligarão ao seu complemento sob condições normais, então dois filamentos perfeitamente complementares se ligarão (ou
5 'anelarão') a cada outra facilmente. Entretanto, devido às geometrias moleculares diferentes dos nucleotídeos, uma única inconsistência entre os dois filamentos tornará a ligação entre eles mais energeticamente desfavorável. Os efeitos de incompatibilidade de base podem ser medidos quantificando-se a taxa na qual dois filamentos se anelam, isto pode fornecer informação
10 como ara a similaridade em sequência de base entre os dois filamentos sendo anelados.

O termo "hidrogel" como utilizado aqui se refere a uma substância resultante de uma estrutura sólida, semissólida, pseudoplástica ou plástica contendo um componente aquoso necessário para produzir uma massa
15 gelatinosa ou como geleia. O hidrogel incorpora e retém quantidades significantes de H₂O, que eventualmente alcançarão um teor de equilíbrio na presença de um ambiente aquoso.

O termo "hidrofílico" como utilizado aqui se refere a um material ou substância tendo uma afinidade para substâncias polares, tal como água.
20 Os termos "no corpo", "volume vazio", "cavidade de ressecção", "escavação", "sítio de injeção", sítio de deposição" ou "sítio de implante", como utilizados aqui são pretendidos incluir todos os tecidos do corpo sem limite, e podem se referir aos espaços formados aqui de injeções, incisões cirúrgicas, remoção de tumor ou tecido, lesões do tecido, formação de abscesso, ou qualquer outra cavidade similar, espaço, ou cavidade formada
25 desse modo por ação de avaliação clínica, tratamento ou resposta fisiológica a doença ou patologia como exemplos não limitantes dos mesmos.

Os termos "inibindo", "inibir" ou "inibição" como utilizados aqui são utilizados para se referir a redução da quantidade ou taxa de um processo, para interromper o processo completamente, ou diminuir, limitar, ou
30 bloquear a ação ou função do mesmo. A inibição pode incluir uma redução ou diminuição da quantidade, taxa, ação, função, ou processo em pelo me-

nos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 45%, pelo menos 50%, pelo menos 55%, pelo menos 60%, pelo menos 65%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98%, ou pelo menos 99% quando comparado com uma substância de referência, onde a substância de referência é uma substância que não é inibida.

O termo "lesão" como utilizado aqui se refere ao dano ou prejuízo a uma estrutura ou função do corpo causado por uma força ou agente externo, que pode ser físico ou químico.

O termo "isolado" se refere ao material, tal como um ácido nucleico, um peptídeo, ou uma proteína, que é; (1) substancialmente ou essencialmente livre de componentes que normalmente acompanham ou interagem com ele quando encontrado em seu ambiente de ocorrência natural. Os termos "substancialmente ou essencialmente livre" são utilizados para se referir a um material, que é pelo menos 80% livre de componentes que normalmente acompanham ou interagem com ele quando encontrado em seu ambiente de ocorrência natural. O material isolado opcionalmente compreende o material não encontrado com o material em seu ambiente natural; ou (2) se o material não está em seu ambiente natural, o material foi sinteticamente (não naturalmente) alterado por intervenção humana deliberada para uma composição e/ou colocado em um local na célula (por exemplo, genoma ou organela subcelular) não nativa para um material encontrado neste ambiente. A alteração para produzir o material sintético pode ser realizada no material com, ou removido, de seu estado natural. Por exemplo, um ácido nucleico de ocorrência natural se torna um ácido nucleico isolado se for alterado, ou se for transcrito de DNA que foi alterado, por meios de intervenção humana realizada na célula da qual se origina. Vide, por exemplo, Compounds and Methods for Site Directed Mutagenesis in Eukaryotic Cells, Kmiec, Patente dos Estados Unidos No. 5.565.350; *In Vivo* Homologous Sequence Targeting in Eukaryotic Cells; Zarling e outros, PCT/US93/03868. Do mesmo modo, um ácido nucleico de ocorrência natural (por exemplo, um

promotor) se torna isolado se for introduzido por meios de ocorrência não natural a um local do genoma não nativo para aquele ácido nucleico. Os ácidos nucleicos que são "isolados" como definido aqui também são referidos como ácidos nucleicos "heterólogos".

5 O termo "quinase" como utilizado aqui se refere a um tipo de enzima que transfere os grupos de fosfato de moléculas doadoras de energia elevada para moléculas-alvo específicas ou substratos. Os grupos doadores de energia elevada podem incluir, porém não estão limitados a ATP.

O termo "atividade de quinase" como utilizado aqui se refere a fosforilação mediada por quinase de um substrato de quinase.

10 O termo "substrato de quinase" como utilizado aqui se refere a um substrato que pode ser fosforilado por uma quinase.

O termo "lábil" em suas várias formas gramaticais como utilizado aqui se refere a estar apto ou provável de mudar. Um composto lábil é um capaz de mudar o estado ou ficar inativo.

15 O termo "lipofílico" como utilizado aqui se refere a preferir ou possuir uma afinidade para um ambiente não polar comparado com um ambiente polar ou aquoso.

O termo "liberação prolongada", como utilizado aqui, significa que um implante é construído e disposto para liberar níveis terapêuticos de um ingrediente ativo durante pelo menos 7 dias, ou cerca de 30 a cerca de 60 dias.

20 O termo "célula de mamífero" como utilizado aqui se refere a uma célula derivada de um animal da classe *Mammalia*. Como utilizado aqui, as células de mamífero podem incluir células normais, anormais, e transformadas. Os exemplos de células de mamífero utilizadas na invenção descrita, incluem, porém não estão limitados a, neurônios, células epiteliais, células musculares, células sanguíneas, células imunes, células tronco, osteócitos, células endoteliais, e células do blasto.

30 O termo "modular" como utilizado aqui significa regular, alterar, adaptar, ou ajustar a uma certa medida ou proporção.

O termo "normal" se refere a um padrão, modelo, mediano ou

médio de um grande grupo.

O termo "paciente saudável normal" se refere a um paciente tendo nenhum sintoma ou outra evidência de um distúrbio inflamatório.

O termo "ácido nucleico" se refere a um polímero de deoxirribonucleotídeo ou ribonucleotídeo na forma de filamento único ou duplo, e a menos que de outro modo limitado, abrange análogos conhecidos tendo a natureza essencial de nucleotídeos naturais pelo fato de que eles hibridizam para ácidos nucleicos de filamento único de uma maneira similar aos nucleotídeos de ocorrência natural (por exemplo, ácidos nucleicos de peptídeo).

O termo "nucleotídeo" se refere a um composto químico que consiste em uma base heterocíclica, um açúcar, e um ou mais grupos fosfato. Nos nucleotídeos mais comuns a base é um derivado de purina ou pirimidina, e o açúcar é a pentose deoxirribose ou ribose. Os nucleotídeos são os monômeros de ácidos nucleicos, com três ou mais junções para formar um ácido nucleico. Os nucleotídeos são as unidades estruturais de RNA, DNA, e vários cofatores, incluindo, porém não limitados a, CoA, FAD, DMN, NAD, e NADP. As purinas incluem adenina (A), e guanina (G); as pirimidinas incluem citosina (C), timina (T), e uracila (U).

A frase "operavelmente ligado" se refere a uma primeira sequência(s) ou domínio estando posicionado suficientemente próximo a uma segunda sequência(s) ou domínio de modo que a primeira sequência(s) ou domínio possa exercer influência sobre a segunda sequência(s) ou domínio ou uma região sob o controle daquela segunda sequência ou domínio.

O termo "partículas" como utilizado aqui se refere a um constituinte extremamente pequeno (por exemplo, nanopartículas, micropartículas, ou em alguns casos maiores) que pode conter no total ou em parte a composição de inibição de quinase como descrito aqui.

O termo "peptídeo" como utilizado aqui se refere a dois ou mais aminoácidos unidos por uma ligação de peptídeo.

Os termos "polipeptídeo", "peptídeo" e "proteína" são utilizados alternadamente aqui para se referir a um polímero de resíduos de aminoácido. Os termos se aplicam aos polímeros de aminoácido nos quais um ou

mais resíduos de aminoácido é um análogo químico artificial de um aminoácido de ocorrência natural correspondente, bem como aos polímeros de aminoácido de ocorrência natural. A natureza essencial de tais análogos de aminoácidos de ocorrência natural é que, quando incorporado em uma proteína tal proteína é especificamente reativa aos anticorpos extraídos da mesma proteína, porém consistindo totalmente em aminoácidos de ocorrência natural. Os termos "polipeptídeo", "peptídeo" e "proteína" também são inclusivos de modificações incluindo, porém não limitado a, glicosilação, ligação de lipídeo, sulfatação, gama-carboxilação de resíduos de ácido glutâmico, hidroxilação e ADP- ribosilação. Será apreciado, como é bem conhecido e como notado acima, que os polipeptídeos podem não ser completamente lineares. Por exemplo, os polipeptídeos podem ser ramificados como um resultado de ubiquitinação, e eles podem ser circulares, com ou sem ramificação, geralmente como um resultado de eventos pós-translacionais, incluindo evento de processamento natural e eventos realizados por manipulação humana que ocorrem naturalmente. Os polipeptídeos circulares, ramificados e ramificados circulares podem ser sintetizados por processo natural de não translação e por métodos completamente sintéticos, também.

O termo "peptidomimético" como utilizado aqui se refere a uma pequena cadeia como proteína designada para imitar um peptídeo. Um peptidomimético tipicamente surge da modificação de um peptídeo existente para alterar as propriedades da molécula.

O termo "veículo farmacêuticamente aceitável" como utilizado aqui se refere a uma ou mais cargas sólidas ou líquidas compatíveis, diluentes ou substâncias de encapsulação que são adequadas para administração a um humano ou outro animal vertebrado.

O termo "polímero" como utilizado aqui se refere a qualquer dos vários compostos químicos feitos de moléculas idênticas menores (chamadas monômeros) unidas. Os polímeros geralmente têm pesos moleculares elevados. Os processos pelos quais as moléculas são unidas para formar polímeros são chamados "polimerização".

O termo "polinucleotídeo" se refere a um deoxirribopolinucleotí-

deo, ribopolinucleotídeo, ou análogos dos mesmos que têm a natureza essencial de um ribonucleotídeo natural pelo fato de que eles hibridizam, em condições de hibridização rigorosas, para substancialmente a mesma sequência de nucleotídeo como nucleotídeos de ocorrência natural e/ou permite a translação no mesmo aminoácido(s) como o nucleotídeo(s) de ocorrência natural. Um polinucleotídeo pode ser de tamanho natural ou uma subsequência de um gene regulador ou estrutural nativo ou heterólogo. A menos que de outro modo indicado, o termo inclui referência à sequência especificada bem como a sequência complementar da mesma. Desse modo, DNAs ou RNAs com esqueletos modificados para estabilidade ou por outras razões são "polinucleotídeos" uma vez que o termo é pretendido aqui. Além disso, DNAs ou RNAs compreendendo bases incomuns, tal como inosina, ou bases modificadas, tais como bases tritiladas, para citar apenas dois exemplos, são polinucleotídeos como o termo é utilizado aqui. Será apreciado que uma grande variedade de modificações tenha sido feita para DNA e RNA que servem para muitos propósitos úteis conhecidos por aqueles de experiência na técnica. O termo polinucleotídeo como é empregado aqui abrange tais formas quimicamente, enzimaticamente ou metabolicamente modificadas de polinucleotídeos, bem como as formas químicas de DNA e RNA característicos de vírus e células, incluindo entre outras coisas, células simples e complexas.

O termo "sequência primária" como utilizado aqui se refere a uma sequência de aminoácido.

O termo "profármaco" como utilizado aqui significa um peptídeo ou derivado, que está em uma forma inativa, e, que é convertido para uma forma ativa por conversão biológica em seguida a administração a um paciente.

Os seguintes termos são utilizados aqui para descrever as relações de sequência entre dois ou mais ácidos nucleicos ou polinucleotídeos:

(a) "sequência de referência", (b) "janela de comparação", (c) "identidade de sequência", (d) "percentual de identidade de sequência", e (e) "identidade substancial".

O termo "sequência de referência" se refere a uma sequência utilizada como uma base para a comparação de sequência. Uma sequência de referência pode ser um subgrupo ou a totalidade de uma sequência especificada; por exemplo, como um segmento de um cDNA de tamanho natural ou sequência de gene, ou o cDNA completo ou sequência de gene.

O termo "janela de comparação" se refere a um segmento contíguo e especificado de uma sequência de polinucleotídeo, onde a sequência de polinucleotídeo pode ser comparada com uma sequência de referência e onde a porção da sequência de polinucleotídeo na janela de comparação pode compreender adições ou deleções (isto é, espaços vazios) comparadas com a sequência de referência (que não compreende adições ou deleções) para alinhamento ideal das duas sequências. Geralmente, a janela de comparação é pelo menos 20 nucleotídeos contíguos em comprimento, e opcionalmente podem ser pelo menos 30 nucleotídeos contíguos em comprimento, pelo menos 40 nucleotídeos contíguos em comprimento, pelo menos 50 nucleotídeos contíguos em comprimento, pelo menos 100 nucleotídeos contíguos em comprimento, ou mais. Aqueles versados na técnica entendem que para evitar uma similaridade elevada com uma sequência de referência devido a inclusão de espaços vazios na sequência de polinucleotídeo, uma penalidade de espaço vazio tipicamente é introduzida e é subtraída do número de combinações.

Os métodos de alinhamento de sequência para comparação são bem conhecidos na técnica. O alinhamento ideal das sequências para comparação pode ser conduzido pelo algoritmo de homologia local de Smith e Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981); pelo algoritmos de alinhamento de homologia de Needleman e Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970); pela pesquisa para o método de similaridade de Pearson e Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci, 85:2444 (1988); por implementações computadorizadas destes algoritmos, incluindo, porém não limitados a: CLUSTAL no programa PC/Gene por Intelligenetics, Mountain View, Calif; GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA, e TFASTA no Pacote de Programa Wisconsin Genetics, Genetics Computer Grupo (GCG), 575 Science Dr., Madison, Wis., USA; o programa

CLUSTAL é bem descrito por Higgins e Sharp, *Gene* 73:237-244 (1988); Higgins e Sharp, *CABIOS* 5:151-153 (1989); Corpet, e outros, *Nucleic Acids Research* 16: 10881-90 (1988); Huang, e outros, *Computer Applications in the Biosciences* 8: 155-65 (1992), e Pearson, e outros, *Methods in Molecular Biology* 24:307-331 (1994). A família de BLAST de programas, que pode ser utilizada para pesquisas de similaridade de banco de dados, inclui: BLASTN para sequência de consulta de nucleotídeo contra sequências de banco de dados de nucleotídeo; BLASTX para as sequências de consulta de nucleotídeo contra sequências de banco de dados de nucleotídeo; BLASTP para sequências de consulta de proteína contra sequências de banco de dados de nucleotídeo; TBLASTN para sequências de consulta de proteína contra sequências de banco de dados de nucleotídeo; e TBLASTX para sequências de consulta de nucleotídeo contra sequências de banco de dados de nucleotídeo. Vide, *Current Protocols in Molecular Biology*, Capítulo 19, Ausubel, e outros, Eds., Greene Publishing and Wiley- Interscience, Nova Iorque (1995).

A menos que de outro modo declarado, os valores de identidade/similaridade de sequência fornecidos aqui se referem ao valor obtido utilizando o BLAST 2.0 adequado de programas utilizando parâmetros básicos. Altschul e outros, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (1997). O software para realizar as análises de BLAST está publicamente disponível, por exemplo, através do National Center for Biotechnology-Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Este algoritmo envolve primeiro identificar os pares de sequência de classificação elevada (HSPs) identificando-se palavras curtas de comprimento W na sequência de consulta, que corresponde ou satisfaz algum escore T de limiar de valor positivo quando alinhado com uma palavra do mesmo comprimento em uma sequência de banco de dados. T é referido como o limiar de escore de palavra vizinho (Altschul e outros, supra). Estas palavras HITs vizinhas iniciais agem como sementes para começar as pesquisas para encontrar HSPs mais longos contendo-os. As palavras HIT então são prolongadas e ambas as direções ao longo de cada sequência até o ponto que o escore de alinhamento cumulativo possa ser aumentado. Os escores cumulativos são calculados utilizando, para se-

quências de nucleotídeo, os parâmetros M (escores de recompensa para um par de resíduos de combinação; sempre >0) e N (escore de penalidade para resíduos de combinação imperfeita; sempre <0). Para sequências de amino-ácido, uma matriz de classificação é utilizada para calcular o escore cumulativo. A extensão da palavra HITS em cada direção é detida quando: o escore de alinhamento cumulativo cai pela quantidade X de seu valor máximo obtido; o escore cumulativo vai para zero ou mais baixo, devido ao acúmulo de um ou mais alinhamentos de resíduo de classificação negativa; ou a extremidade de cada uma da sequência é alcançada. Os parâmetros de algoritmo BLAST W, T, e X determinam a sensibilidade e velocidade do alinhamento. O programa BLASTN (para sequências de nucleotídeo) usa como padrão um comprimento de palavra (W) de 11, uma expectativa (E) de 10, uma redução de 100, M=5, N=-4, e uma comparação de ambos os filamentos. Para sequência de aminoácidos, o programa BLASTP usa como padrões um comprimento de palavra (W) de 3, uma expectativa (E) de 10, e a matriz de classificação BLOSUM62 (vide, Henikoff & Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915).

Além de calcular o percentual da identidade de sequência, o algoritmo BLAST também realiza uma análise estatística da similaridade entre duas sequências (vide, por exemplo, Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)). Uma medição de similaridade fornecida pelo algoritmo BLAST é a probabilidade de menor soma ($P(N)$), que fornece uma indicação da probabilidade pela qual uma combinação entre duas sequências de nucleotídeo ou aminoácido poderia ocorrer por acaso. As pesquisas de BLAST assumem que as proteínas podem ser moldadas como sequências aleatórias. Entretanto, muitas proteínas reais compreendem regiões de sequências não aleatórias que podem ser tratos homopoliméricos, repetições de período curto, ou regiões enriquecidas em um ou mais aminoácidos. Tais regiões de baixa complexidade podem ser alinhadas entre proteínas não relacionadas ainda que outras regiões da proteína sejam totalmente dissimilares. Vários programas de filtro de baixa complexidade podem ser empregados para reduzir tais alinhamentos de baixa complexidade. Por exem-

plo, o SEG (Wooten e Federhen, *Comput. Chem.*, 17:149-163 (1993)) e XNU (Claverie and States, *Comput. Chem.*, 17:191-201 (1993)) filtros de baixa complexidade podem ser empregados sozinhos ou em combinação.

Como utilizado aqui, "identidade de sequência" ou "identidade"

5 no contexto de duas sequências de ácido nucleico ou polipeptídeo se refere aos resíduos nas duas sequências que são as mesmas quando alinhadas para correspondência máxima em uma janela de comparação especificada. Quando a porcentagem de identidade de sequência é utilizada em referência às proteínas, é reconhecido que as posições do resíduo que são não idênticas

10 geralmente diferem por substituições de aminoácido conservadoras, isto é, onde os resíduos de aminoácido são substituídos por outros resíduos de aminoácido com propriedades químicas similares (por exemplo, carga ou hidrofobicidade) e, portanto não alteram as propriedades funcionais da molécula. Onde sequências diferem em substituições conservadoras, a porcentagem de identidade de sequência pode ser ajustada para cima para corrigir

15 a natureza conservadora da substituição. As sequências que diferem por tais substituições conservadoras são ditas ter "similaridade de sequência" ou "similaridade". Os meios para fazer este ajuste são bem conhecidos por aqueles de experiência na técnica. Tipicamente isto envolve classificar uma

20 substituição conservadora como um desequilíbrio parcial em vez de um desequilíbrio total, desse modo aumentando a porcentagem de identidade de sequência. Desse modo, por exemplo, onde a um aminoácido idêntico é dado um escore de 1 e à substituição não conservadora é dado um escore de zero, a uma substituição conservadora é dado um escore entre zero e 1.

25 A classificação de substituições conservadoras é calculada, por exemplo, de acordo com o algoritmo de Meyers e Miller, *Computer Applic. Biol. Sci.*, 4:11-17 (1988) por exemplo, como implementado no programa PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, Calif., USA).

Como utilizado aqui, "percentual de identidade de sequência"

30 significa o valor determinado comparando-se duas sequências idealmente alinhadas em uma janela de comparação, onde a porção da sequência de polinucleotídeo na janela de comparação pode compreender adições ou de-

leções (isto é, espaços vazios) quando comparada com a sequência de referência (que não compreende adições ou deleções) para alinhamento ideal das duas sequências. A porcentagem é calculada determinando-se o número de posições nas quais a base de ácido nucleico idêntica ou resíduo de aminoácido ocorre em ambas as sequências para produzir várias posições combinadas, dividindo o número de posições combinadas pelo número total de posições na janela de comparação, e multiplicando o resultado por 100 para produzir a porcentagem de identidade de sequência.

O termo "identidade substancial" de sequências de polinucleotídeo significa que um polinucleotídeo compreende uma sequência que tem pelo menos 70% de identidade de sequência, pelo menos 80% de identidade de sequência, pelo menos 90% de identidade de sequência e pelo menos 95% de identidade de sequência, comparada a uma sequência de referência utilizando um dos programas de alinhamento descrito utilizando parâmetros padrões. Alguém de experiência reconhecerá que estes valores podem ser ajustados apropriadamente para determinar a identidade correspondente de proteínas codificadas por duas sequências de nucleotídeo levando-se em conta a degeneração do códon, similaridade de aminoácido, posicionamento da estrutura de leitura e similares. A identidade substancial de sequência de aminoácidos para estes propósitos normalmente significa identidade de sequência de pelo menos 60%, ou pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90%, ou pelo menos 95%. Outra indicação que as sequências de nucleotídeo são substancialmente idênticas é se duas moléculas hibridizam para cada outra em condições severas. Entretanto, os ácidos nucleicos que não hibridizam para cada outro em condições severas são ainda substancialmente idênticos se os polipeptídeos que eles codificam são substancialmente idênticos. Isto pode ocorrer, por exemplo, quando uma cópia de um ácido nucleico é criada utilizando a degeneração de códon máxima permitida pelo código genético. Uma indicação que duas sequências de ácido nucleico são substancialmente idênticas é que o polipeptídeo que o primeiro ácido nucleico codifica é imunologicamente reativo cruzado com o polipeptídeo codificado pelo segundo ácido nucleico.

Os termos "identidade substancial" no contexto de um peptídeo indica que um peptídeo compreende uma sequência com pelo menos 70% de identidade de sequência com uma sequência de referência, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90% ou 95% de identidade de sequência com a sequência de referência em uma janela de comparação especificada. Opcionalmente, o alinhamento ideal é conduzido utilizando o algoritmo de alinhamento de homologia de Needleman e Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970). Uma indicação que duas sequências de peptídeo são substancialmente idênticas é que um peptídeo é imunologicamente reativo com os anticorpos aumentados contra o segundo peptídeo. Desse modo, um peptídeo é substancialmente idêntico uma vez que um segundo peptídeo, por exemplo, onde os dois peptídeos diferem somente por uma substituição conservadora. Os peptídeos que são "substancialmente similares" compartilham sequências como notado acima exceto que as posições de resíduo que não são idênticas podem diferir por mudanças de aminoácido conservador.

O termo "domínio de transdução de proteína" (também referida como "PTD", "peptídeo Trojan", "sequência de translocação de membrana", "proteína permeável a célula", "CPP") como utilizado aqui se refere a uma classe de peptídeos geralmente capaz de penetrar a membrana plasmática de células de mamífero. PTDs geralmente são 10-16 aminoácidos em comprimento, e são capazes de transportar os compostos de muitos tipos e pesos moleculares através de células de mamífero. Estes compostos incluem, porém não estão limitados a, moléculas efetoras, tais como proteínas, DNA, peptídeos conjugados, oligonucleotídeos, e partículas pequenas tais como lipossomas. Quando PTDs são quimicamente ligados ou fundidos a outras proteínas para formar as proteínas de fusão, estas proteínas de fusão ainda são capazes de penetrar a membrana plasmática e entrar nas células.

O termo "reduzir" ou "redução" como utilizado aqui se refere a uma redução ou diminuição no grau, intensidade, estado, condição ou extensão.

O termo "sequência reguladora" (também referida como uma "região reguladora" ou "elemento regulador") se refere a um promotor, real-

çador ou outro segmento de DNA onde as proteínas reguladoras, tais como fatores de transcrição, se ligam preferencialmente a expressão do gene de controle e desse modo expressão de proteína.

Os termos "sujeito" ou "indivíduo" ou "paciente" são utilizado alternadamente para se referir a um membro de uma espécie animal de origem de mamífero, incluindo, porém não limitado a, um camundongo, um rato, um gato, uma cabra, uma ovelha, cavalo, hamster, furão, ornitorrinco, porco, um cão, uma cobaia, um coelho e um primata, tal como, por exemplo, um macaco, símio, ou humano.

O termo "liberação prolongada" (também referido como "liberação estendida") é utilizado aqui em seu sentido convencional para se referir a uma formulação de fármaco que fornece liberação gradual de um fármaco durante um período prolongado de tempo, e que preferivelmente, embora não necessariamente, resulta em níveis sanguíneos substancialmente constantes de um fármaco durante um período de tempo prolongado.

O termo "sintoma" como utilizado aqui se refere a um sinal ou uma indicação de distúrbio ou doença, especialmente quando experimentado por um indivíduo como uma alteração da função, sensação, ou aparência normal.

O termo "síndrome" como utilizado aqui se refere a um padrão de sintomas indicativos de alguma doença ou condição.

O termo "agente terapêutico" como utilizado aqui se refere a um fármaco, uma molécula, um ácido nucleico, proteína, metabólito, peptídeo, composição ou outra substância que fornece um efeito terapêutico. O termo "ativo" como utilizado aqui se refere ao ingrediente, componente ou constituinte das composições da presente invenção responsáveis pelo efeito terapêutico pretendido. Os termos "agente terapêutico" e "agente ativo" são utilizados alternadamente aqui.

O termo "componente terapêutico" como utilizado aqui se refere a uma dosagem terapeuticamente eficaz (isto é, dose e frequência de administração) que elimina, reduz, ou previne a progressão de uma manifestação de doença particular em uma porcentagem de uma população. Um exemplo

de um componente terapêutico comumente utilizado é o ED50 que descreve a dose em uma dosagem particular que é terapeuticamente eficaz para uma manifestação de doença particular em 50% de uma população.

O termo "domínio terapêutico" como utilizado aqui se refere a

5 um peptídeo, segmento de peptídeo, ou variante ou derivado dos mesmos, com identidade substancial com o peptídeo KALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 13], ou segmento do mesmo. Os domínios terapêuticos geralmente não são capazes de penetrar a membrana plasmática de células de mamífero e quando contatados com uma enzima quinase, inibem a enzima quinase tal

10 que a atividade de quinase da enzima quinase é reduzida. Um domínio terapêutico pode inibir uma enzima quinase tal que a atividade da enzima quinase seja cerca de 99% daquela de uma enzima quinase não inibida. Um domínio terapêutico pode inibir uma enzima quinase tal que a atividade da enzima quinase seja cerca de 95% daquela de uma enzima quinase não inibida.

15 Um domínio terapêutico pode inibir uma enzima quinase tal que a atividade da enzima quinase seja cerca de 90% daquela de uma enzima quinase não inibida. Um domínio terapêutico pode inibir uma enzima quinase tal que a atividade da enzima quinase seja cerca de 85% daquela de uma enzima quinase não inibida. Um domínio terapêutico pode inibir uma enzima

20 quinase tal que a atividade da enzima quinase seja cerca de 80% daquela de uma enzima quinase não inibida. Um domínio terapêutico pode inibir uma enzima quinase tal que a atividade da enzima quinase seja cerca de 75% daquela de uma enzima quinase não inibida. Um domínio terapêutico pode inibir uma enzima quinase tal que a atividade da enzima quinase seja cerca de 70% daquela de uma enzima quinase não inibida.

25 Um domínio terapêutico pode inibir uma enzima quinase tal que a atividade da enzima quinase seja cerca de 80% daquela de uma enzima quinase não inibida. Um domínio terapêutico pode inibir uma enzima quinase tal que a atividade da enzima quinase seja cerca de 75% daquela de uma enzima quinase não inibida.

30 Um domínio terapêutico pode inibir uma enzima quinase tal que a atividade da enzima quinase seja cerca de 70% daquela de uma enzima quinase não inibida. Um domínio terapêutico pode inibir uma enzima quinase

tal que a atividade da enzima quinase seja cerca de 65% daquela de uma enzima quinase não inibida. Um domínio terapêutico pode inibir uma enzima quinase tal que a atividade da enzima quinase seja cerca de 60% daquela de uma enzima quinase não inibida. Um domínio terapêutico pode inibir

5 uma enzima quinase tal que a atividade da enzima quinase seja cerca de 55% daquela de uma enzima quinase não inibida. Um domínio terapêutico pode inibir uma enzima quinase tal que a atividade da enzima quinase seja cerca de 50% daquela de uma enzima quinase não inibida. Um domínio te-

10 rapêutico pode inibir uma enzima quinase tal que a atividade da enzima quinase seja cerca de 45% daquela de uma enzima quinase não inibida. Um domínio terapêutico pode inibir uma enzima quinase tal que a atividade da enzima quinase seja cerca de 40% daquela de uma enzima quinase não ini-

15 bida. Um domínio terapêutico pode inibir uma enzima quinase tal que a atividade da enzima quinase seja cerca de 35% daquela de uma enzima quinase não inibida. Um domínio terapêutico pode inibir uma enzima quinase tal que a atividade da enzima quinase seja cerca de 30% daquela de uma enzima quinase não inibida. Um domínio terapêutico pode inibir uma enzima quinase tal que a atividade da enzima quinase seja cerca de 25% daquela de uma enzima quinase não inibida. Um domínio terapêutico pode inibir uma enzima

20 quinase tal que a atividade da enzima quinase seja cerca de 20% daquela de uma enzima quinase não inibida. Um domínio terapêutico pode inibir uma enzima quinase tal que a atividade da enzima quinase seja cerca de 15% daquela de uma enzima quinase não inibida. Um domínio terapêutico pode inibir uma enzima quinase tal que a atividade da enzima quinase seja cerca de 10% daquela de uma enzima quinase não inibida. Um domínio terapêuti-

25 co pode inibir uma enzima quinase tal que a atividade da enzima quinase seja cerca de 9% daquela de uma enzima quinase não inibida. Um domínio terapêutico pode inibir uma enzima quinase tal que a atividade da enzima quinase seja cerca de 8% daquela de uma enzima quinase não inibida. Um

30 domínio terapêutico pode inibir uma enzima quinase tal que a atividade da enzima quinase seja cerca de 7% daquela de uma enzima quinase não inibi-

da. Um domínio terapêutico pode inibir uma enzima quinase tal que a ativi-

dade da enzima quinase seja cerca de 6% daquela de uma enzima quinase não inibida. Um domínio terapêutico pode inibir uma enzima quinase tal que a atividade da enzima quinase seja cerca de 5% daquela de uma enzima quinase não inibida. Um domínio terapêutico pode inibir uma enzima quinase tal que a atividade da enzima quinase seja cerca de 4% daquela de uma enzima quinase não inibida. Um domínio terapêutico pode inibir uma enzima quinase tal que a atividade da enzima quinase seja cerca de 3% daquela de uma enzima quinase não inibida. Um domínio terapêutico pode inibir uma enzima quinase tal que a atividade da enzima quinase seja cerca de 2% daquela de uma enzima quinase não inibida. Um domínio terapêutico pode inibir uma enzima quinase tal que a atividade da enzima quinase seja cerca de 1% daquela de uma enzima quinase não inibida. Um domínio terapêutico pode inibir uma enzima quinase tal que a atividade da enzima quinase seja cerca de 0,1% daquela de uma enzima quinase não inibida. Um domínio terapêutico pode inibir uma enzima quinase tal que a atividade da enzima quinase seja cerca de 0,01% daquela de uma enzima quinase não inibida.

O termo "peptídeo inibidor terapêutico" como utilizado aqui se refere a um peptídeo compreendido de um primeiro domínio e um segundo domínio. O primeiro domínio compreende um domínio de transdução de proteína (PTD) e está localizado próximo ao segundo domínio. O segundo domínio, localizado próximo ao primeiro domínio, compreende um domínio terapêutico. O termo "proximal" como utilizado aqui se refere a muito perto ou próximo, como no espaço, tempo, ou ordem.

O termo "efeito terapêutico" como utilizado aqui se refere a uma consequência de tratamento, os resultados do qual são julgados serem desejáveis e benéficos. Um efeito terapêutico pode incluir, diretamente ou indiretamente, a interrupção, redução, ou eliminação de uma manifestação de doença. Um efeito terapêutico pode também incluir, diretamente ou indiretamente, a interrupção, redução ou eliminação da progressão de uma manifestação de doença. O termo "quantidade terapeuticamente eficaz" ou uma "quantidade eficaz" de um ou mais dos agentes ativos da presente invenção é uma quantidade que é suficiente para fornecer um efeito terapêutico. Ge-

ralmente, uma quantidade eficaz dos agentes ativos que pode ser empregada de acordo com a invenção descrita varia de cerca de 0,000001 mg/kg de peso corporal a cerca de 100 mg/kg de peso corporal. Entretanto, os níveis de dosagem são com base em uma variedade de fatores, incluindo o tipo de
5 lesão, a idade, peso, sexo, condição médica do paciente, a gravidade da condição, a rotina de administração, e o agente ativo particular empregado. Desse modo, o regime de dosagem pode variar amplamente, porém pode ser determinado rotineiramente por um médico utilizando os métodos padrões.

10 Métodos existem para a transdução e a transfecção de ácidos nucleicos dentro das células. Os termos "transdução", ou "transduzir" como utilizados aqui são utilizados alternadamente para se referir ao processo de cruzamento de membranas biológicas. O cruzamento de membranas biológicas pode ser de uma célula com outra, do ambiente extracelular com o
15 ambiente intracelular, ou através de uma membrana de célula ou membrana nuclear. Os materiais que podem passar por transdução incluem, porém não estão limitados a, proteínas, proteínas de fusão, peptídeos, polipeptídeos, aminoácidos, DNA viral, e DNA bacteriano.

O termo "tratar" ou "tratamento" como utilizado aqui se refere à
20 realização de um ou mais dos seguintes: (a) redução da gravidade de um distúrbio; (b) limitação do desenvolvimento de sintomas característicos de um distúrbio sendo tratado; (c) limitação da piora de sintomas característicos de um distúrbio sendo tratado; (d) limitação da recorrência de um distúrbio em paciente que previamente tiveram o distúrbio; e (e) limitação de recor-
25 rência de sintomas em pacientes que foram previamente sintomáticos para o distúrbio.

O termo "variante" e suas várias formas gramaticais como utilizado aqui se refere a uma sequência de nucleotídeo ou uma sequência de aminoácido com identidade substancial com uma sequência de nucleotídeo
30 de referência ou sequência de referência de aminoácido, respectivamente. As diferenças nas sequências podem ser o resultado de alterações, naturalmente ou por desígnio, na sequência ou estrutura. As alterações naturais

podem surgir durante o curso da replicação ou duplicação normal na natureza de uma sequência de ácido nucleico particular. As alterações designadas podem ser especificamente designadas e introduzidas na sequência para propósitos específicos. Tais alterações específicas podem ser feitas *in vitro* utilizando uma variedade de técnicas de mutagênese. Tais variantes de sequência geradas especificamente podem ser referidas como "mutantes: ou "derivados" da sequência original.

Um técnico versado provavelmente pode produzir variantes de polipeptídeo tendo únicas ou múltiplas substituições, deleções, adições, ou substituições de aminoácido. Estas variantes podem incluir entre outras coisas: (a) variantes nos quais um ou mais resíduos de aminoácido são substituídos com aminoácidos conservadores ou não conservadores; (b) variantes nos quais um ou mais aminoácidos são adicionados; (c) variantes nos quais pelo menos um aminoácido inclui um grupo substituinte; (d) variantes nos quais uma proteína alvo é fundida com outro peptídeo ou polipeptídeo tal como um par de fusão, um rótulo de proteína ou outra fração química, que pode conferir propriedades úteis à proteína alvo, tal como, por exemplo, um epítipo para um anticorpo. As técnicas para obter tais variantes, incluindo técnicas genéticas (supressões, deleções, mutações, etc.), químicas, e enzimáticas são conhecidas pelo técnico versado. Como utilizado aqui, o termo "mutação" se refere a uma alteração da sequência de DNA em um gene ou cromossomo de um organismo resultando na criação de um novo caractere ou traço não encontrado no tipo origem, ou o processo pelo qual uma tal alteração ocorre em um cromossomo, ou através de uma alteração na sequência de nucleotídeo do DNA codificando para um gene ou através de uma alteração na disposição física de um cromossomo. Três mecanismos de mutação incluem substituição (permuta de um par de base para outro), adição (a inserção de uma ou mais bases em uma sequência), e deleção (perda de um ou mais pares de base).

O termo "substituição" é utilizado aqui para se referir àquele no qual uma base ou bases são permutadas para outra base ou bases no DNA. As substituições podem ser substituições sinônimas ou substituições não

sinônimas. Como utilizado aqui, "substituições sinônimas" se referem às substituições de uma base para outra em um exon de um gene codificando para uma proteína, tal que a sequência de aminoácido produzida não seja modificada. O termo "substituições não sinônimas" como utilizado aqui se
5 refere às substituições de uma base para outra em um exon de um gene codificando para uma proteína, tal que a sequência de aminoácido produzida seja modificada.

Os termos "deleção" e "mutação por deleção" são utilizados alternadamente aqui para se referir àquele no qual uma base ou bases são
10 perdidas do DNA.

O termo "adição" como utilizado aqui se refere à inserção de uma ou mais bases, ou de um ou mais aminoácidos, em uma sequência.

O seguinte representa grupos de aminoácidos que são substituições conservadoras para uma outra: 1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);
15 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutâmico (E); 3) Asparagina (N), Ácido glutâmico (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); e 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptofano (W).

Composições: Peptídeos Inibidores de Quinase Terapêuticos

De acordo com um aspecto, a invenção descrita fornece uma
20 composição de inibição de quinase para tratar um distúrbio inflamatório cuja patofisiologia compreende a expressão de citocina inflamatória, a composição compreendendo

(a) uma quantidade terapeuticamente eficaz de um peptídeo inibidor terapêutico, onde a quantidade terapeuticamente eficaz do peptídeo
25 inibidor terapêutico inibe pelo menos uma enzima quinase, onde o peptídeo inibidor terapêutico compreende um primeiro domínio e um segundo domínio, onde o primeiro domínio compreende um domínio de transdução de proteína (PTD) e está localizado proximal ao segundo domínio, onde o segundo domínio, localizado proximal ao primeiro domínio, compreende um domínio
30 terapêutico, onde a composição diretamente ou indiretamente reduz a expressão de pelo menos uma citocina inflamatória. De acordo com uma modalidade, o primeiro domínio está localizado 5' ao segundo domínio. De a-

cordo com outra modalidade, o segundo domínio está localizado 3' ao primeiro domínio.

De acordo com uma modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz do peptídeo inibidor terapêutico é de uma quantidade de cerca de 0,000001 mg/kg de peso corporal a cerca de 100 mg/kg de peso corporal.

5 De acordo com outra modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz do peptídeo inibidor terapêutico é de uma quantidade de cerca de 0,00001 mg/kg de peso corporal a cerca de 100 mg/kg de peso corporal. De acordo com outra modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz do peptídeo inibidor terapêutico é de uma quantidade de cerca de 0,0001 mg/kg de peso corporal a cerca de 100 mg/kg de peso corporal. De acordo com outra modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz do peptídeo inibidor terapêutico é de uma quantidade de cerca de 0,001 mg/kg de peso corporal a cerca de 100 mg/kg de peso corporal.

10 De acordo com outra modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz do peptídeo inibidor terapêutico é de uma quantidade de cerca de 0,01 mg/kg de peso corporal a cerca de 100 mg/kg de peso corporal. De acordo com outra modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz do peptídeo inibidor terapêutico é de uma quantidade de cerca de 0,1 mg/kg de peso corporal a cerca de 100 mg/kg de peso corporal.

15 De acordo com outra modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz do peptídeo inibidor terapêutico é de uma quantidade de cerca de 1 mg/kg de peso corporal a cerca de 100 mg/kg de peso corporal. De acordo com outra modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz do peptídeo inibidor terapêutico é de uma quantidade de cerca de 10 mg/kg de peso corporal a cerca de 100 mg/kg de peso corporal.

20 De acordo com outra modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz do peptídeo inibidor terapêutico é de uma quantidade de cerca de 20 mg/kg de peso corporal a cerca de 100 mg/kg de peso corporal. De acordo com outra modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz do peptídeo inibidor terapêutico é de uma quantidade de cerca de 30 mg/kg de peso corporal a cerca de 100 mg/kg de peso corporal.

25 De acordo com outra modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz do peptídeo inibidor terapêutico é de uma quantidade de cerca de 40 mg/kg de pe-

30

so corporal a cerca de 100 mg/kg de peso corporal. De acordo com outra modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz do peptídeo inibidor terapêutico é de uma quantidade de cerca de 50 mg/kg de peso corporal a cerca de 100 mg/kg de peso corporal. De acordo com outra modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz do peptídeo inibidor terapêutico é de uma

5 quantidade de cerca de 60 mg/kg de peso corporal a cerca de 100 mg/kg de peso corporal. De acordo com outra modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz do peptídeo inibidor terapêutico é de uma quantidade de cerca de 70 mg/kg de peso corporal a cerca de 100 mg/kg de peso corporal. De

10 acordo com outra modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz do peptídeo inibidor terapêutico é de uma quantidade de cerca de 80 mg/kg de peso corporal a cerca de 100 mg/kg de peso corporal. De acordo com outra modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz do peptídeo inibidor terapêutico é de uma quantidade de cerca de 90 mg/kg de peso corporal a cerca

15 de 100 mg/kg de peso corporal. De acordo com outra modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz do peptídeo inibidor terapêutico é de uma quantidade de cerca de 0,000001 mg/kg de peso corporal a cerca de 90 mg/kg de peso corporal. De acordo com outra modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz do peptídeo inibidor terapêutico é de uma quantidade

20 de de cerca de 0,000001 mg/kg de peso corporal a cerca de 80 mg/kg de peso corporal. De acordo com outra modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz do peptídeo inibidor terapêutico é de uma quantidade de cerca de 0,000001 mg/kg de peso corporal a cerca de 70 mg/kg de peso corporal. De acordo com outra modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz do

25 peptídeo inibidor terapêutico é de uma quantidade de cerca de 0,000001 mg/kg de peso corporal a cerca de 60 mg/kg de peso corporal. De acordo com outra modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz do peptídeo inibidor terapêutico é de uma quantidade de cerca de 0,000001 mg/kg de peso corporal a cerca de 50 mg/kg de peso corporal. De acordo com outra

30 modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz do peptídeo inibidor terapêutico é de uma quantidade de cerca de 0,000001 mg/kg de peso corporal a cerca de 40 mg/kg de peso corporal. De acordo com outra modalidade, a

quantidade terapeuticamente eficaz do peptídeo inibidor terapêutico é de uma quantidade de cerca de 0,000001 mg/kg de peso corporal a cerca de 30 mg/kg de peso corporal. De acordo com outra modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz do peptídeo inibidor terapêutico é de uma quantidade de cerca de 0,000001 mg/kg de peso corporal a cerca de 20 mg/kg de peso corporal. De acordo com outra modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz do peptídeo inibidor terapêutico é de uma quantidade de cerca de 0,000001 mg/kg de peso corporal a cerca de 10 mg/kg de peso corporal. De acordo com outra modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz do peptídeo inibidor terapêutico é de uma quantidade de cerca de 0,000001 mg/kg de peso corporal a cerca de 1 mg/kg de peso corporal. De acordo com outra modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz do peptídeo inibidor terapêutico é de uma quantidade de cerca de 0,000001 mg/kg de peso corporal a cerca de 0,1 mg/kg de peso corporal. De acordo com outra modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz do peptídeo inibidor terapêutico é de uma quantidade de cerca de 0,000001 mg/kg de peso corporal a cerca de 0,1 mg/kg de peso corporal. De acordo com outra modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz do peptídeo inibidor terapêutico é de uma quantidade de cerca de 0,000001 mg/kg de peso corporal a cerca de 0,01 mg/kg de peso corporal. De acordo com outra modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz do peptídeo inibidor terapêutico é de uma quantidade de cerca de 0,000001 mg/kg de peso corporal a cerca de 0,001 mg/kg de peso corporal. De acordo com outra modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz do peptídeo inibidor terapêutico é de uma quantidade de cerca de 0,000001 mg/kg de peso corporal a cerca de 0,0001 mg/kg de peso corporal. De acordo com outra modalidade, a quantidade terapeuticamente eficaz do peptídeo inibidor terapêutico é de uma quantidade de cerca de 0,000001 mg/kg de peso corporal a cerca de 0,00001 mg/kg de peso corporal.

De acordo com outra modalidade, o peptídeo inibidor terapêutico da invenção é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido WLRRIKA-WLRRIKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 14]. De acordo com outra modalidade,

o peptídeo inibidor terapêutico da invenção é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido FAKLAARL YRKALARQLGV AA [SEQ ID NO: 12]. De acordo com outra modalidade, o peptídeo inibidor terapêutico da invenção é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido KAF AKLAARL YRKALARQLGV

5 AA [SEQ ID NO: 15]. De acordo com outra modalidade, o peptídeo inibidor terapêutico da invenção é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido YARAAARQ ARAKALARQLGV AA [SEQ ID NO: 11]. De acordo com outra modalidade, o peptídeo inibidor terapêutico da invenção é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido YARAAARQARAKALNRQLGVAA [SEQ ID

10 NO: 16]. De acordo com outra modalidade, o peptídeo inibidor terapêutico da invenção é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido YARAAARG-QRAKALARQLAVA [SEQ ID NO: 17]. De acordo com outra modalidade, o peptídeo inibidor terapêutico da invenção é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido YARAAARGQRAKALARQLGVA [SEQ ID NO: 18]. De acordo

15 com outra modalidade, o peptídeo inibidor terapêutico da invenção é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido YARAAARGQRAKALNRQLAVA [SEQ ID NO: 19]. De acordo com outra modalidade, o peptídeo inibidor terapêutico da invenção é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido YARAAARGQRAKALNRQLGVA [SEQ ID NO: 20]. De acordo com outra moda-

20 lidade, o peptídeo inibidor terapêutico da invenção é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido Y ARAA ARGQRAKALNRQ LGVAA [SEQ ID NO: 21].

De acordo com outra modalidade, o domínio terapêutico da invenção é um domínio tendo a sequência de aminoácido KALNRQLGV AA

25 [SEQ ID NO: 13]. De acordo com outra modalidade, o domínio terapêutico da invenção é um domínio tendo a sequência de aminoácido KAANRQLGVAA [SEQ ID NO: 22]. De acordo com outra modalidade, o domínio terapêutico da invenção é um domínio tendo a sequência de aminoácido KALARQLGV AA [SEQ ID NO: 23]. De acordo com outra modalidade, o domínio

30 terapêutico da invenção é um domínio tendo a sequência de aminoácido KALNAQLGV AA [SEQ ID NO: 24]. De acordo com outra modalidade, o domínio terapêutico da invenção é um domínio tendo a sequência de amino-

ácido KALNRALGVAA [SEQ ID NO: 25]. De acordo com outra modalidade, o domínio terapêutico da invenção é um domínio tendo a sequência de aminoácido KALNRQ AGV AA [SEQ ID NO: 26]. De acordo com outra modalidade, o domínio terapêutico da invenção é um domínio tendo a sequência de aminoácido KALNRQLA V AA [SEQ ID NO: 27]. De acordo com outra modalidade, o domínio terapêutico da invenção é um domínio tendo a sequência de aminoácido KALNRQLGAAA [SEQ ID NO: 28]. De acordo com outra modalidade, o domínio terapêutico da invenção é um domínio tendo a sequência de aminoácido KALNRQLGVA [SEQ ID NO: 29]. De acordo com outra modalidade, o domínio terapêutico da invenção é um domínio tendo a sequência de aminoácido KKKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 30]. De acordo com outra modalidade, o domínio terapêutico da invenção é um domínio tendo a sequência de aminoácido KANRQLGV AA [SEQ ID NO: 22]. De acordo com outra modalidade, o domínio terapêutico da invenção é um domínio tendo a sequência de aminoácido KALNAQLGVAA [SEQ ID NO: 24]. De acordo com outra modalidade, o domínio terapêutico da invenção é um domínio tendo a sequência de aminoácido KALNRQ AGV AA [SEQ ID NO: 26]. De acordo com outra modalidade, o domínio terapêutico da invenção é um domínio tendo a sequência de aminoácido KALNRQLGAAA [SEQ ID NO: 28]. De acordo com outra modalidade, o domínio terapêutico da invenção é um domínio tendo a sequência de aminoácido KALNRQLGV AA [SEQ ID NO: 13]. De acordo com outra modalidade, o domínio terapêutico da invenção é um domínio tendo a sequência de aminoácido KALARQLGV AA [SEQ ID NO: 23]. De acordo com outra modalidade o domínio terapêutico da invenção é um domínio tendo a sequência de aminoácido KALNRALGVAA [SEQ ID NO: 25]. De acordo com outra modalidade, o domínio terapêutico da invenção é um domínio tendo a sequência de aminoácido KALNRQLA V AA [SEQ ID NO: 27].

De acordo com outra modalidade, o PTD do inibidor de peptídeo quinase terapêutico é um domínio tendo a sequência de aminoácido WLRRIKA WLRRIKA [SEQ ID NO: 31]. De acordo com outra modalidade, PTD do inibidor de peptídeo quinase terapêutico é um domínio tendo a sequência

de aminoácido WLRRKA [SEQ ID NO: 32]. De acordo com outra modalidade, o PTD do inibidor de peptídeo quinase terapêutico é um domínio tendo a sequência de aminoácido YARAA ARQ ARA [SEQ ID NO: 5]. De acordo com outra modalidade, o PTD do inibidor de peptídeo quinase terapêutico é um domínio tendo a sequência de aminoácido YGRKKRRQRRR [SEQ ID NO: 33]. De acordo com outra modalidade, o PTD do inibidor de peptídeo quinase terapêutico é um domínio tendo a sequência de aminoácido WLRRKA WLRR [SEQ ID NO: 34]. De acordo com outra modalidade, o PTD do inibidor de peptídeo quinase terapêutico é um domínio tendo a sequência de aminoácido FAKLAARL YR [SEQ ID NO: 35]. De acordo com outra modalidade, o PTD do inibidor de peptídeo quinase terapêutico é um domínio tendo a sequência de aminoácido K AF AKL AARL YR [SEQ ID NO: 36]. De acordo com outra modalidade, o PTD do inibidor de peptídeo quinase terapêutico é um domínio tendo a sequência de aminoácido YARAAARQARA [SEQ ID NO: 5]. De acordo com outra modalidade, o PTD do inibidor de peptídeo quinase terapêutico é um domínio tendo a sequência de aminoácido FAKLAARL YRKA [SEQ ID NO: 43]. De acordo com outra modalidade, o PTD do inibidor de peptídeo quinase terapêutico é um domínio tendo a sequência de aminoácido KAF AKLAARL YRKA [SEQ ID NO: 44].

De acordo com outra modalidade, o primeiro domínio está localizado 5' ao segundo domínio. De acordo com outra modalidade, o segundo domínio está localizado 3' ao primeiro domínio. De acordo com outra modalidade, o primeiro domínio é operavelmente ligado ao segundo domínio. De acordo com outra modalidade, o segundo domínio é operavelmente ligado ao primeiro domínio.

De acordo com outra modalidade, a enzima quinase é proteína quinase ativada por proteína quinase ativada por mitógeno. De acordo com algumas tais modalidades, a enzima quinase é MK2. De acordo com algumas tais modalidades, a enzima quinase é MK3. De acordo com outra modalidade, a enzima quinase é CaMK.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é fibrose.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é a disfunção da célula endotelial.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é choque endotóxico. O choque endotóxico (choque séptico) é uma condição na qual o sistema circulatório é incapaz de fornecer circulação adequada para os tecidos corporais devido à presença de uma substância inflamatória. Estudos reportaram que os níveis de soro de TNF- α determinam o curso fatal ou não fatal de choque endotóxico (Mozes, T., e outros Immunol. Lett. 27(2): 157- 62, 1991), ao mesmo tempo em que o níveis de IL-6 em

5

10

pacientes com choque séptico são significativamente elevados (Waage, A., e outros J. Exp. Med. 169:333-338, 1989). Os sintomas de choque endotóxico incluem, porém não estão limitados a, febre moderada, falta de fome, depressão física e mental moderada, frequência cardíaca aumentada, baixa pressão de pulso, desidratação, e diarreia.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é pancreatite. Pancreatite é inflamação do pâncreas. A pancreatite aguda é súbita ao mesmo tempo em que a pancreatite crônica é caracterizada por dor abdominal recorrente ou persistente com ou sem esteatorreia ou diabetes melitu. Há evidência considerável que as citocinas pró-inflamatórias

15

20

(por exemplo, TNF- α , IL- β) desempenham um papel central na fisiologia de pancreatite aguda e podem mediar a complicação sistêmica de pancreatite aguda atuando-se como mediadores proximais, que induzem a produção de outros mediadores incluindo IL-6 e IL-8. IL- β e TNF- α foram implicados como agentes levando à progressão de doença e IL-6 e IL-8 como

25

indicadores de gravidade (Pooran, N., e outros J. Clin. Gastroenterol. 37(3):263-266, 2003). Os sintomas pancreatite incluem, porém não estão limitados a, dor abdominal superior grave, com radiação através das costas, náuseas, vômito, flutuações na pressão sanguínea (alta ou baixa), frequência cardíaca elevada, dor abdominal, e ruídos intestinais podem ser reduzi-

30

dos.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é asma.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é doença inflamatória localizada. Estudos reportaram que IL-6 e TNF- α circulantes desempenham um importante papel na indução de uma resposta local inflamatória (Xing, Z. J. Clin, Invest 101 (2):311-320, 1998).

5 De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é doença cardiovascular aterosclerótica (aterosclerose, ASVD). ASVD é uma condição na qual uma parede da artéria se expande como o resultado de uma formação de materiais graxos, tal como colesterol. É uma síndrome afetando os vasos sanguíneos arterianos (uma resposta inflamatória crônica
10 nas paredes das artérias) parcialmente devido ao acúmulo de células sanguíneas brancas de macrófago e promovido por lipoproteínas de baixa densidade sem remoção adequada de gorduras e colesterol dos macrófagos por lipoproteínas de alta densidade funcionais. Os estudos envolveram IL-1 β como uma proteína reguladora no desenvolvimento e sequelas clínicas de
15 aterosclerose (Moyer, C.F., e outros Am. J. Pathol. 138(4):951-960, 1991). Estudos adicionais reportaram que IL-6 e TNF- α também estão associados com fatores de risco de aterosclerose (Haddy, N., e outros Aterosclerose. 70(2):277-283. 2003). Os sintomas de doença cardiovascular aterosclerótica incluem, porém não estão limitados a, ataque cardíaco, morte cardíaca súbi-
20 ta (morte e uma hora a partir do início dos sintomas), doença oclusiva arterial periférica, aterogênese (o processo desenvolvido de placas ateromatosas) e estenose.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é mal de Alzheimer. Mal de Alzheimer (AD) é uma forma de demência.
25 AD é caracterizada pela perda de neurônios e sinapses no córtex cerebral e certas regiões subcorticais. Esta perda resulta em atrofia maciça das regiões afetadas, incluindo degeneração no lobo temporal e lobo parietal, e partes do córtex frontal e giro cingulado. A causa e progressão de AD não são bem entendidos, porém geralmente acredita-se envolver novos neurofibri-
30 lares e amiloide- β . Alguns estudos sugeriram que a gênese de amiloide em AD resulta de uma reação de fase aguda mediada por IL-1 β /IL-6 no cérebro (Vandenabeele, P. e Fiers, W. Immunol. Today. 12(7):217-9. 1991). Estudos

adicionais sugeriram uma correlação entre o nível de expressão de TNF- α e IL- β e comprometimento cognitivo (Alvarez, X., e outros Mol. Chem. Neuro-pathol. 29(2- 3):237-252. 1996). Os sintomas de AD incluem, porém não estão limitados a, perda de memória, confusão, irritabilidade, agressão, alterações no humor, e morte.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é uma doença oncológica. As doenças oncológicas incluem, porém não estão limitados a, cânceres derivados do epitélio tais como, porém não limitado a, câncer de mama e câncer de próstata. De acordo com algumas modalidades, o distúrbio é câncer de mama. De acordo com algumas modalidades, o distúrbio é câncer de próstata.

Câncer de mama é um câncer que se forma em tecidos da mama, geralmente os dutos (tubos que levam o leite para o mamilo) e lóbulos (glândulas que produzem o leite). Há quatro estágios de câncer de mama, Estágio 0 (carcinoma *in situ*) inclui carcinoma lobular *in situ* ("LCIS") e carcinoma dutal *in situ* ("DCIS"), onde as células cancerosas estão presentes no revestimento de um lóbulo ou duto, respectivamente. Estágio 1 é um estágio anterior ao câncer de mama invasivo onde o tumor é não mais do que 2 cm de um lado ao outro e as células de câncer não se espalham além da mama. No Estágio II, o tumor é (i) não mais do que 2 cm em diâmetro e o câncer se espalhou para os linfonodos sob o braço; (ii) entre 2-4 cm em diâmetro e o câncer pode ter se espalhado para o linfonodo no braço; ou (iii) o câncer é maior do que 5 cm em diâmetro e o câncer não se espalhou para os linfonodos no braço. O Estágio pode ser um tumor maior, porém o câncer não se espalhou para além da mama e próximo dos linfonodos. É câncer localmente avançado. No Estágio IIIA, o tumor pode ou não ser menor do que 5 cm em diâmetro e se espalhou para o linfonodo no braço. No Estágio IIIB, o tumor cresceu na parede torácica ou na pele da mama e o câncer se espalhou para os linfonodos além do esterno. No Estágio IIIC, o tumor é qualquer tamanho esse espalhou para os linfonodos no braço, além do esterno, e abaixo ou acima da clavícula. O Estágio IV é câncer metastático distante onde o câncer se espalhou para outras partes do corpo. Estudos reportaram que os

níveis de IL-6 são elevados em pacientes com câncer de mama metastático (Zhang, GJ. , e Adachi, I. *Anticancer Res.* 19(2B):1427-1432, 1999) e que TNF- α pode potencializar a capacidade de IL-6 estimular a síntese de estrogênio em tumores de mama (Reed, MJ., e Purohit, A. *Endocrine Rev.* 18(5):701-715, 1997). Estudos adicionais reportaram que IL-1 β associado com tumor está presente no microambiente de tumor e pode desempenhar um papel pivotal na regulação do crescimento de tumor de mama e metástase (Kurtzman, S. H., e outros *Oncology Reports.* 6(l):65-70, 1998).

Câncer de próstata é um câncer que se forma nos tecidos da próstata (uma glândula no sistema reprodutor masculino encontrado abaixo da bexiga e na gente do reto). Há quatro estágios de câncer de próstata. No Estágio 1, o câncer não pode ser sentido durante um exame retal digital, e não pode ser visto em um sonograma. É encontrado por acaso quando a cirurgia é realizada por outra razão. O câncer do Estágio 1 é somente na próstata e o grau é G1 (ou o escore Gleason não é maior do que 4). No Estágio II, o tumor é mais avançado ou um grau maior do que o Estágio 1, porém o tumor não se estende além da próstata. Pode ser sentido durante um exame retal digital, ou pode ser visto em um sonograma. No Estágio III, o tumor se estende além da próstata e pode ter invadido as vesículas seminais, porém ainda não se espalhou para os linfonodos. No Estágio IV, o tumor pode ter invadido a bexiga, reto, ou estruturas próximas (além das vesículas seminais). Pode ter se espalhado para os linfonodos, ossos ou para outras partes do corpo. Estudos reportaram que os níveis de soro de IL-6 e TNF- α foram significativamente mais elevados em pacientes com doença metastática do que aqueles em pacientes com doenças localizadas, e estes níveis de ambas as citocinas foram diretamente correlacionados com a extensão da doença (Michalaki, V., e outros *Br. J. Cancer.* 90(12):2312-6, 2004). Estudos adicionais reportaram que IL-1 β é requerida para angiogênese *in vivo* e invasividade de diferentes células de tumor (Voronov, E., e outros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 100(5):2645-2650, 2003). Um homem com câncer de próstata pode não ter qualquer sintoma. Para homens que têm os sintomas, os sintomas comuns incluem, porém não estão limitados a, pro-

blemas urinários, impotência, sangue na urina ou sémen, e dor frequente nas costas, quadris ou coxas.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é isquemia. Isquemia é uma restrição no fornecimento de sangue, geralmente devido aos fatores nos vasos sanguíneos, com disfunção de tecido resultante. Estudos reportaram que os níveis de IL-6, IL-1 β e TNF- α são crescentes durante o período de recirculação inicial após isquemia (Saito, K., e outros *Neurosci. Lett.* 206(2-3): 149- 152, 1996). Os sintomas de isquemia incluem, porém não estão limitados a, uma carência de oxigênio e glicose no fornecimento de sangue. De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio é isquemia neural.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é artrite reumatoide (RA). De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é doença de Crohn. De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é doença inflamatória do intestino.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é hiperplasia íntima. Hiperplasia íntima é um engrossamento da Túnica íntima (a camada mais interna de uma artéria ou veia) de um vaso sanguíneo como uma complicação de um procedimento de reconstrução ou endarterectomia (a extração cirúrgica de um revestimento arterial grosso, encrustado de gordura, para abrir ou alargar a artéria para circulação sanguínea melhorada). Envolve a estimulação coordenada das células do músculo liso por fatores mecânicos, celulares e humorais para induzir um programa de ativação celular que leva a proliferação, migração, e deposição de matriz extracelular. A hiperplasia íntima é a resposta universal de um vaso à lesão. Estudos reportaram que a superexpressão de IL-6, quando regulada por IL-1 β e TNF- α , desempenha um importante papel nas células associadas ao ateroma (Kornman, K. e outros *J. Perio. Res.* 34(7):353-357. 2006; Libby, P., e outros *Circulation.* 86(6 Suppl):III47-52. 1992)).

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é estenose. Estenose é o estreitamento anormal em um vaso sanguíneo ou outro órgão ou estrutura tubular. A síndrome resultante depende da es-

trutura afetada. Estudos reportaram que a superexpressão de IL-6, quando regulado por IL-1 β e TNF- α , desempenha um importante papel nas células associadas ao ateroma (1d). Os sintomas de estenose podem incluir, porém não estão limitadas a, cianose (coloração azul da pele e membranas mucosas, alterações atróficas tais como perda de cabelo, e pele brilhante, temperatura corpórea diminuída, pulso diminuído, parestesia, e paralisia. De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio é reestenose (reocorrência de estenose).

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é tumores da célula do músculo liso e metástase. Vários tumores da célula do músculo liso, e a metástase do mesmo, foram estudados. Estes incluem leiomioma. Estes neoplasmos geralmente são neoplasmas benignos do músculo liso que não são pré-malignos e que podem ocorrer em qualquer órgão, tal como o útero, intestino delgado e o esôfago. Fibroides uterinos são leiomiomata do músculo liso uterino. Embora benignos, os fibroides uterinos podem levar ao sangramento menstrual excessivo, anemia e infertilidade. Leiomiomas da pele incluem leiomioma cutâneo solitário, leiomiomas cutâneo múltiplo (ou pilar) surgindo dos arredores do músculo pilorum, angioleiomiomas (leiomiomas vasculares), leiomiomas dartoicos (ou genitais) se originando nos músculos dartos das genitálias, aréolas e mamilos, e angiolipoleiomioma. Estudos reportaram que a cavidade uterina em leiomioma, adenomiose e grupo do pólipio endometrial contêm níveis elevados de citocinas, tais como IL-1 β e TNF- α (Inagaki, N., e outros Eur. J. Obst. Gyn. 11 1(2): 197-203, 2003). Estudos adicionais reportaram que IL-6 também é expresso em leiomioma (Luo, X e outros, Endocrinology. 146(3): 1097-1118, 2005).

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é espasmo do músculo liso. Um espasmo do músculo liso é a contração involuntária súbita de um músculo liso (ou grupo de músculos). Estudos reportaram que a reatividade vascular na resistência das artérias está relacionada com o equilíbrio entre IL-1 β , IL-6 e TNF- α (Vila, E. e Salaices, M. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 288:H1016-H1021, 2005).

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é angina (angina do peito). Angina é dor no peito grave devido a isquemia do miocárdio. Estudos reportaram que níveis elevados de IL-6 são comuns em angina instável e estão associados com pobre prognose (Biasucci, L., e outros *Circulation*. 94: 874-877. 1996). Adicionalmente, estudos reportaram uma associação entre o nível de expressão de IL-6 e TNF- α com mortalidade coronária (Koukkunen, H., e outros *Annals Med*. 33(l):37-47. 2001). Os sintomas de angina incluem, porém não estão limitados a, desconforto no peito, dor no peito, uma pressão, peso, aperto, compressão, queimação ou sensação de sufocamento, epigástrio, dor nas costas, dor na área da nuca, dor nos joelhos, dor nos ombros, náuseas, vômito, e palidez.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é Angina de Prinzmetal (angina variante). Angina de Prinzmetal ocorre em pacientes com artérias coronárias normais ou aterosclerose insignificante. Os sintomas incluem, porém não estão limitados àqueles de angina, e tipicamente ocorre em repouso (ao invés de durante o esforço) em ciclos.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é bradicardia (bradiarritmia). Bradicardia se refere a uma frequência cardíaca em repouso de abaixo de 60 batidas por minuto. Estudos reportaram que níveis aumentados de IL-1 β , IL-6 e TNF- α estão associados com bradicardia (Fukuhara, Y., e outros *Toxicol*. 41(l):49-55. 2003). De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é bradiarritmia,

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é hipertensão. Hipertensão se refere a pressão sanguínea elevada (pressão sanguínea alta). Estudos reportaram que níveis aumentados de IL-1 β , IL-6 e TNF- α estão associados com bradicardia (Fukuhara, Y., e outros *Toxicol*. 41(l):49-55. 2003). Sintomas de hipertensão incluem, porém não estão limitados a, dor de cabeça, sonolência, confusão, distúrbios visuais, náuseas, vômito, crises epiléticas, irritabilidade, e angústia respiratória.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é hipertrofia cardíaca (aumento do coração). A hipertrofia ventricular é o aumento dos ventrículos no coração. A hipertrofia ventricular geralmente

está associada com alterações patológicas devido à hipertensão (ou outros estados da doença). Estudos reportaram que IL-1 β e TNF- α são suficientes para estimular as respostas de crescimento hipertrófico e sugeriram que a superexpressão de IL-6 pode levar a hipertrofia cardíaca (Yokoyama, T., e outros *Circulation*. 95:1247-1252. 1997). Os sintomas de hipertrofia cardíaca podem incluir, porém não estão limitados a, dor de cabeça, sonolência, confusão, distúrbios visuais, náuseas, vômito, crises epiléticas, irritabilidade e angústia respiratória.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é insuficiência renal. Insuficiência renal (falha dos rins) resulta quando os rins não funcionam adequadamente. Estudos reportaram a associação de IL-1 β e TNF- α (Descamps-Latscha, B., e outros *J. Immunol.* 154(2):882-892. 1995) e de IL-6 aumentado (Herbelin, A., e outros *Kidney Internat'l.* 39:954-960. 1991) com insuficiência renal. Sintomas de insuficiência renal incluem, porém não estão limitados a, níveis elevados de ureia no sangue, acúmulo de fosfatos no sangue, náuseas, vômito, perda de peso, urinação noturna, prurido, ritmos cardíacos anormais, inchaço das pernas, tornozelos ou pés, e dor nas costas ou laterais.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é acidente vascular cerebral. Um acidente vascular cerebral é a perda da função cerebral devido ao distúrbio no fornecimento de sangue para o cérebro. Estudos reportaram que os níveis de soro de IL-6 e TNF- α aumentam após acidente vascular cerebral (Ferrarese, C, e outros *J. Cerebral Blood Flow Metabol.* 19: 1004-1009, 1999) e que o nível de expressão de IL-1 β é super-regulado após isquemia cerebral focal (Wang, X., e outros *Stroke.* 28:155-162, 1997). Sintomas de acidente vascular cerebral incluem, porém não estão limitados a, hemiplagia, entorpecimento, redução na sensação sensória ou vibratória, cheiro alterado, queda das pálpebras, problemas de equilíbrio, afasia, apraxia, déficits de memória e vertigem.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é hipertensão pulmonar. Hipertensão pulmonar se refere a um aumento na pressão sanguínea na artéria pulmonar, veia pulmonar, ou capilares pul-

monares. Estudos reportaram que os níveis de TNF- α são elevados, com nenhuma diferença nos níveis de soro de IL-6, em pacientes com hipertensão pulmonar (Joppa, P., e outros Chest. 130(2):326-333. 2006). Sintomas de hipertensão pulmonar incluem, porém não estão limitados a, falta de ar, tonturas, desmaios, edema periférico, e insuficiência cardíaca.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é toxemia de gravidez. Toxemia de gravidez (distúrbio hipertensivo de gravidez) coletivamente se refere à pré-eclampsia e eclampsia. De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é pré-eclampsia.

Pré-eclampsia é uma condição onde a hipertensão surge na gravidez em associação com quantidades significantes de proteína na urina. Estudos reportaram que os níveis plasmáticos de IL-6 e TNF- α foram aumentados na mulher com pré-eclampsia comparado com aquelas em gravidez no terceiro trimestre normal (Conrad, K. e outros Am. J. Repro. Immunol. 40(2): 102-111, 1998). Além disso, os níveis de IL-1 β pareceram inalterados entre os grupos objetos (Id.). Os sintomas incluem, porém não estão limitados a, pressão sanguínea elevada, dano generalizado ao endotélio maternal, rins e fígado. De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é eclampsia. Eclampsia é caracterizada pelo aparecimento de crises epiléticas tônico-clônicas (grande mal). De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é de parto prematuro.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é doença/fenômeno de Raynaud. Doença de Raynaud é um distúrbio vascular que afeta o fluxo sanguíneo para as extremidades (os dedos das mãos, dedos dos pés, nariz e orelhas) quando exposto às temperaturas frias ou em resposta a tensão psicológica. Estudos reportaram que IL-6 e TNF- α (Rychlik, W., e outros, Int. Angiol. 25(4):436. 2006) desempenham um papel na patogênese de fenômeno de Raynaud. Os sintomas de doença de Raynaud incluem, porém não estão limitados a, cianose, e palidez. A doença de Raynaud é diagnosticada se os sintomas são idiopáticos, ao mesmo tempo em que o fenômeno de Raynaud ocorre secundário a uma grande variedade de outras condições, tal como, porém não limitado a, distúrbios do tecido

conectivo, lúpus eritematoso sistêmico, artrite, e outras doenças reumáticas.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é uremia hemolítica. Estudos reportaram que TNF- α e IL-1 desempenharam papel importante na indução do mediador inflamatório verocitotoxina-1 durante a síndrome urêmica hemolítica (van de Kar, N.C., e outros Blood. 80(11):2755-2764, 1992). Estudos adicionais reportaram que os níveis de IL-6 também ficam elevados (Karpman, D., e outros Ped. Nephrol. 9(6):694-699, 1995). Uremia hemolítica é uma doença caracterizada por anemia hemolítica (rompimento anormal de células sanguíneas vermelhas), insuficiência renal aguda (uremia) e baixa contagem de plaqueta (trombocitopenia).

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é fissura anal. Uma fissura anal é uma laceração ou quebra natural na pele do canal anal. A maioria das fissuras anais é causada pelo estiramento da mucosa anal além de sua capacidade. As fissuras anais superficiais ou pouco profundas geralmente se cicatrizarão sozinhas. Algumas fissuras anais se tornam crônicas e profundas e não cicatrizarão. A causa mais comum de não cicatrização é o espasmo do músculo esfíncter anal interno que resulta no fornecimento prejudicado de sangue para a mucosa anal. Estudos reportaram que a mucosa retal IL-1 β , IL-6 e soro IL-6 e TNF- α foram maiores em pacientes com doença de Crohn perianal, do que em paciente com doença de Crohn do intestino delgado e controles de saúde (Ruffolo, C, e outros Infl. Bowel Dis. 14(10):1406- 1412, 2008).

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é acalasia. Acalasia (acalasia esofágica, *acalasia cardiae*, cardioespasmo, aperistaltismo esofágico) é um distúrbio da motilidade esofágica. A camada do músculo liso do esôfago perde o peristaltismo normal e o esfíncter esofágico inferior não relaxa apropriadamente em resposta a deglutição. Estudos reportaram que IL-6 e IL-1 β são produzidos em quantidades significativamente grandes na mucosa de pacientes de esfagite comparado com aquelas de pacientes de controle (Rieder, F., e outros Gastroenterol. 132(1):154-165, 2007). Os sintomas incluem, porém não estão limitados a, disfagia, regurgitação, perda de peso, tosse e dor no peito.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é impotência. A disfunção erétil (ED) é uma disfunção sexual caracterizada pela incapacidade de desenvolver ou manter uma ereção do pênis. Uma ereção ocorre como um efeito hidráulico devido ao sangue que entra e fica retido nos corpos similares a esponja dentro do pênis. Estudos reportaram que níveis sanguíneos aumentados de IL-6, IL-1 β e TNF- α em pacientes de ED se correlacionaram negativamente com o desempenho sexual (Vlachopoulos, C, e outros Eur. Heart. J. 27(22):2640-2648. 2006). ED pode ser um sintoma de cardiovascular doença.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é enxaqueca. Uma enxaqueca é uma síndrome neurológica caracterizada por dores de cabeça severas, náuseas e percepções corpóreas alteradas. Estudos reportaram níveis de soro aumentados de IL-6 e TNF- α durante ataques de enxaqueca (Peterlin, B., e outros, Cephalagia. 27(5);435-446. 2007). Uma cefaleia hemicrânia é unilateral e pulsante, durante de 4 horas a 72 horas; os sintomas incluem, porém não estão limitados a, náusea, vômito, fotofobia, e fonofobia.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é lesão muscular isquêmica associada com espasmo do músculo liso. Estudos reportaram que IL-1, IL-6 e TNF- α causam um efeito inotrópico negativo e induz a apoptose no miocárdio submetido a reperfusão isquêmica (Saini, H.K., e outros Exp. Clin. Cardiol. 10(4):213-222, 2005).

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é vasculopatia. Vasculopatia se refere a um grupo heterogêneo de distúrbios caracterizados pela destruição inflamatória de vasos sanguíneos. Tanto as artérias como as veias podem ser afetadas. Estudos reportaram que IL-6 é um importante fator de risco para a vasculopatia coronária relacionada com o transplante cardíaco (Densem, C, e outros J. Heart Lung Transpl, 24(5):559-565, 2005). Sintomas de vasculopatia incluem, porém não estão limitados a, febre, perda de peso, púrpura, livedo reticular, mialgia ou miosite, artralgia ou artrite, mononeurite múltipla, cefaleia, acidente vascular cerebral, tinido, acuidade visual reduzida, perda visual aguda, infarto do miocár-

dio, hipertensão, gangrena, sangramento nasal, tosse com sangue, infiltrados pulmonares, dor abdominal, fezes com sangue, e glomerulonefrite.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é insuficiência cardíaca congestiva (CHF). Insuficiência cardíaca congestiva é uma condição na qual o coração é incapaz de manter uma circulação adequada de sangue no corpo. Estudos reportaram que pacientes com CHF aumentaram os níveis de IL-6 e TNF- α quando comparado com paciente saudáveis normais (Aukrust, P. e outros Am. J. Cardiol. 83(3):376-382. 1999). Os sintomas típicos de CHF incluem, porém não estão limitados a, deficiência respiratória, tosse, inchaço dos pés e tornozelos, inchaço do abdômen, ganho de peso, pulso irregular ou rápido, fadiga, fraqueza, arritmias, anemia, e hipertiroidismo.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é miocárdio atordado ou hibernante. O termo "isquemia miocárdica crônica (CMI)" como utilizado aqui se refere a um estado subagudo ou crônico prolongado de isquemia miocárdica devido ao estreitamento de um vaso sanguíneo coronário no qual o miocárdio "hiberna", significando que o miocárdio sub-regula ou reduz sua contratilidade, e, portanto sua demanda de oxigênio miocárdico, para combinar com perfusão reduzida, desse modo preservando a viabilidade celular e prevenindo a necrose miocárdica. Este miocárdio hibernante é capaz de retornar para a função normal ou próxima do normal na restauração de um fornecimento de sangue adequado. Uma vez que o fluxo sanguíneo coronário foi restaurado para o normal ou próximo do normal e isquemia é resolvida, entretanto, o miocárdio hibernante ainda não contrai. Este desequilíbrio da função de fluxo resultando em um retorno lento da função cardíaca após a resolução de isquemia foi chamado de atordoamento. A duração de tempo para a função retornar é muito variável, variando de dias a meses, e é dependente de vários parâmetros, incluindo a duração do insulto isquêmico original, da gravidade de isquemia durante o insulto original, e a adequação do retorno do fluxo arterial. Vários estudos forneceram evidência para inflamação no miocárdio hibernante. Heusch, G. e outros, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 288: 984-99 (2005). Estudos

também reportaram que citocinas pró-inflamatórias tais como IL-6 e TNF- α são elevadas após revascularização coronária não complicada e podem contribuir com a isquemia miocárdica pós-operatória e anormalidades da parede segmentar (Rankin, J. J. Thorac. Cardiovas. Surg. 108:626-35. 1994).

5 De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é a disfunção diastólica. Disfunção diastólica se refere a uma anormalidade no preenchimento do coração (isto é, ventrículo esquerdo) durante a diástole. A diástole é aquela fase do ciclo cardíaco quando o coração (isto é, ventrículo) não está contraindo, porém está atualmente relaxado e en-
10 chendo de sangue, isto é, sendo retornado para ele, ou do corpo (no ventrículo direito) ou dos pulmões (no ventrículo esquerdo). Estudos envolveram IL-6, IL-1 β e TNF- α na mediação de depressão miocárdica em sepse sistêmica e outras formas de disfunção cardíaca (Kelly, R., e Smith, T. W. Circulation, 95:778-781, 1997). Sintomas incluem, porém não estão limitados a, e-
15 dema pulmonar, hipertensão, estenose aórtica, tecido cardíaco com cicatriz, e diabetes.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é gliose (significando uma proliferação de astrócitos, que pode incluir deposição de matriz extracelular (ECM) em áreas danificadas do sistema ner-
20 voso central). Estudos reportaram que IL-1 e IL-6 reforçaram a formação de cicatriz glial, ao mesmo tempo em que TNF- α , que não induz liberação de IL-6, não induz gliose (Woiciechowsky, C, e outros Med. Sci. Monit. 10(9):BR325-330. 2004).

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é a doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD) (significando doenças do trato respiratório caracterizadas pela limitação ou obstrução do fluxo de ar; que inclui, porém não está limitado a, bronquite crônica e enfisema). Os ní-
25 veis aumentados de IL-6, IL-1 β e TNF- α foram medidos na saliva de pacientes com COPD (Chung, K. Eur. Respir. J. 18:50s-59S, 2001).

30 De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é osteopenia. Osteopenia é uma condição onde a densidade mineral óssea (que indica o quanto denso e forte o osso é) é menor do que aquela de

um paciente saudável normal, porém não baixa o suficiente para ser classificada como osteoporose. Osteopenia pode ser definida como um escore T de densidade mineral óssea entre -1,0 e -2,5 como medido por absorciometria de raios X de energia dual (DEXA). Estudos reportaram que IL-1 β , IL-6 e

5 TNF- α desempenham um papel na indução de reabsorção óssea (Rifas, L. *Calcif. Tissue Int.* 64:1-7. 1999).

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é artrite degenerativa (osteoartrite, OA). Osteoartrite é um tipo de artrite que é causada pelo rompimento e perda eventual de cartilagem de uma ou

10 mais articulações. Osteoartrite geralmente afeta as mãos, pés, medula óssea e articulações portando peso grande tal com os quadris e os joelhos. Estudos reportaram que as alterações inflamatórias crônicas com produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α) são uma característica de membranas sinoviais de pacientes com OA precoce (Smith, M.D., e outros,

15 *J. Rheumatol.* 24(2):365-371, 1997). Sintomas de osteoartrite incluem, porém não estão limitados a, dor nas articulações afetadas após uso repetitivo, inchaço, calor, e ranger das articulações afetadas.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é espondilite ancilosante. De acordo com algumas tais modalidades, o

20 distúrbio inflamatório é doença de Sjorgen. De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é Síndrome de Guillame-Barre. De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é escleroderma.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é sepse. Sepse é uma condição caracterizada por um estado inflamatório de todo o corpo (síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS)), e a

25 presença de uma infecção conhecida ou suspeita. O corpo pode desenvolver sua resposta inflamatória aos micróbios no sangue, urina, pulmões, pele ou outros tecidos. Estudos envolveram IL-6 e TNF- α como mediadores principais na inflamação, morbidez, e mortalidade associados com sepse (Leon,

30 L, e outros *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 275:R269-R277. 1998). Os sintomas de sepse incluem, porém não estão limitados a, inflama-

ção aguda presente em todo o corpo, febre, contagem elevada de glóbulos brancos, náuseas e vômito, frequência cardíaca elevada, e frequência respiratória elevada. De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio é choque endotoxêmico. Septicemia é uma doença sistêmica com toxicidade devido a invasão da corrente sanguínea por bactérias virulentas provenientes de um foco local de infecção. Os sintomas incluem, porém não estão limitados a, calafrios, febre, e fadiga.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é psoríase.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é enterite de radiação. Enteropatia de radiação (enterite de radiação) é uma inflamação (inchaço) do revestimento do intestino delgado devido à terapia de radiação. Estudos reportaram que os níveis de mRNA de IL-1 β e TNF- α aumentam após a irradiação, e que a expressão de IL-6 se torna elevada (Linard, C, e outros *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.* 58(2):427-434. 2004). Os sintomas de enterite de radiação incluem, porém não estão limitados a, anorexia, diarreia, náuseas, vômito e perda de peso.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é cirrose. Cirrose é a formação de cicatriz no fígado e má função biliar como um resultado de doença biliar crônica (CLD). Estudos reportaram que níveis de soro de IL-1 β , TNF- α e IL-6 foram elevados em pacientes com doença biliar crônica, e que o grupo cirrótico de paciente de CLD mostrou níveis mais elevados de soro de IL-1 β , IL-6 e TNF- α do que os casos não cirróticos (Tilg, H., e outros *Gastroenterology*. 103(1):264-74. 1992). Os sintomas de cirrose incluem, porém não estão limitados a, sangramento de hemorroida, confusão, impotência, icterícia, náuseas e vômito, perda de peso, inchaço, indigestão abdominal, febre, dor abdominal, e diminuição da diurese.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é fibrose intersticial. A doença pulmonar intersticial, ou ILD, inclui mais do que 180 distúrbios pulmonares crônicos, os quais podem ser crônicos, não malignos (não cancerosos), e não infecciosos. As doenças pulmonares intersticiais são designadas para o tecido entre os sacos de ar dos pulmões

chamados interstício, que é o tecido afetado pela fibrose (formação de cicatriz). As doenças pulmonares intersticiais também podem ser chamadas de fibrose pulmonar intersticial ou fibrose pulmonar. Estudos reportaram que níveis elevados de expressão de IL-1 β são acompanhados por um aumento local de IL-6 e INF- α e uma resposta de tecido inflamatória aguda vigorosa com evidência de lesão de tecido (Kolb, M., e outros J. Clin. Invest 107(12):1529-1536, 2001). Os sintomas e curso de cada destas doenças podem variar de pessoa para pessoa, porém a ligação comum entre as muitas formas de ILD é que eles todos começam com uma inflamação, por exemplo, bronquiolite (inflamação que envolve os bronquíolos (vias aéreas pequenas)); alveolite (inflamação que envolve os alvéolos (sacos de ar)); ou vasculite (inflamação que envolve os pequenos vasos sanguíneos (capilares)). Mais do que 80 por cento das doenças pulmonares intersticiais são diagnosticadas como pneumoconiose, um doença induzida por fármaco, ou pneumonite por hipersensibilidade. Os outros tipos de são sarcoidose; fibrose pulmonar idiopática; bronquiolite obliterante; histiocitose X; pneumonia eosinofílica crônica; doença vascular de colágeno; vasculite granulomatosa; síndrome de Goodpasture, e proteinose alveolar pulmonar.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é colite. Colite é inflamação (inchaço) do intestino grosso (cólon). Colite pode ter muitas causas diferentes tais como, por exemplo, infecções crônicas e agudas, distúrbio inflamatórios (colite ulcerativa, doença de Crohn, colite linfocítica e colagenosa), carência de fluxo sanguíneo (colite isquêmica) e radiação passada do intestino grosso. Estudos reportaram que a inibição de TNF- α em modelos de animal de colite leva aos níveis reduzidos de IL-1 e IL-6 e severidade reduzida de colite (Neurath, M., e outros Eur. J. Immunol. 27(7): 1743-1750, 2005). Os sintomas de colite incluem, porém não estão limitados a, hemorragia abdominal, dor abdominal, fezes com sangue, desidratação, diarreia e gases intestinais aumentados.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é apendicite. Apendicite é inflamação do apêndice. O apêndice é uma pequena bolsa presa ao intestino grosso. Estudos reportaram que níveis

elevados de IL-6 mostram a melhor tendência na diagnose de apendicite aguda (Paajanen, H., e outros Scan. J. Clin. Lab. Invest. 62(8):579-584, 2002). Estudos adicionais reportaram que TNF- α está presente junto com níveis baixos de IL-6 no fluido peritoneal de pacientes com apendicite (Fernando, A., e outros Ann. Surg. 237(3):408-416, 2003). Os sintomas de apendicite incluem, porém não estão limitados a, dor abdominal, febre, apetite reduzido, náuseas, vômito, calafrios, e constipação.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é gastrite. Gastrite é uma inflamação do revestimento do estômago. As causas comuns de gastrite incluem, por exemplo, álcool, tabagismo, e infecção bacteriana. Estudos reportaram que a produção de TNF- α e IL-6 pela mucosa gástrica humana foi significativamente maior em pacientes infectados com *Helicobacter pylori*, todos dos quais tiveram gastrite crônica, do que em pacientes que tinham *H. pylori* negativo com mucosa gástrica histologicamente normal (Crabtree, J., e outros Gut. 32: 1473-1477, 1991). Os sintomas de gastrite incluem, porém não estão limitados a, dor abdominal, indigestão abdominal, fezes escuras, perda de apetite, náuseas, vômito, exangue no vômito ou material como café moído.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é laringite. Laringite é inflamação da laringe. Laringite geralmente está associada com rouquidão de perda da voz. A laringe está localizada na parte de cima da traqueia e contém as cordas vocais. Quando as cordas vocais ficam inflamadas ou infectadas, elas incham. Isto pode causar rouquidão, e pode algumas vezes bloquear as vias aéreas. Estudos reportaram que IL-1 β , IL-6 e TNF- α são aumentados em casos onde a laringite é induzida por intubação nasogástrica (Lima-Rodrigues, M., e outros Laryngoscope. 118(1):78-86. 2008). Sintomas de laringite incluem febre, rouquidão, e glândulos ou linfonodos inchados no pescoço.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é meningite. Meningite é inflamação das membranas cobrindo o cérebro e medula espinhal que afeta o fluido cerebrospinal. Estudos reportaram que formas recombinantes de IL-6 e TNF- α podem induzir meningite ou le-

são da barreira hematoencefálica, e sugerem que a geração *in situ* de IL-1 no fluido cerebrospinal (com ou sem TNF) é capaz de mediar tanto a inflamação meníngea quanto a lesão da barreira hematoencefálica vista em várias infecções do sistema nervoso central (Quagliarello, V., e outros J. Clin. Invest, 87(4): 1360-1366, 1991). Os sintomas de meningite incluem, porém não estão limitados a, febre, calafrios, alterações do estado mental, náuseas e vômito, fotofobia, cefaleia grave, meningismo, agitação e respiração rápida.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é otite. Otite se refere a infecção ou inflamação do ouvido. Otite pode afetar as partes internas e externas do ouvido. A condição é classificada de acordo com se ela ocorre subitamente e durante um tempo curto (aguda) ou repetidamente durante um período longo de tempo (crônica). Estudos reportaram que os níveis de IL-1 β e TNF- α ficam elevados em modelos de animal de otite média (Sato, K., e outros Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. 108(6):559-63, 1999). Estudos adicionais reportaram níveis elevados de IL-6 em paciente com otite média com efusão (Jang, C. e Kim, Y. Int. J. Ped. Otorhinol. 66(1):37, 2002). Os sintomas incluem, porém não estão limitados a, calafrios, diarreia, drenagem do ouvido, dor de ouvido, ruído ou zumbido nos ouvidos, febre, perda da audição, irritabilidade, náuseas e vômito.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é lesão por perfusão.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é lesão cerebral traumática. A lesão cerebral traumática é causada por um golpe ou choque na cabeça ou por um traumatismo craniano penetrante que rompe a função normal do cérebro. Nem todos os golpes ou choques na cabeça resultam em uma lesão cerebral traumática. A gravidade da lesão cerebral traumática pode variar de "suave" (uma breve alteração no estado mental ou consciência) para grave (um período prolongado de inconsciência ou amnésia após a lesão). Estudos reportaram que níveis tanto de IL-6 quanto de TNF- α ficam elevados em pacientes com lesão cerebral traumática grave (Csuka, E., e outros J. Neuroimmunol. 101(2):21 1-21,

1999). Os sintomas de lesão cerebral traumática incluem, porém não estão limitados a, cefaleias ou dor no pescoço, dificuldade de recordar, concentrar ou tomar decisões, fadiga, alterações no humor, náuseas, fotofobia, visão desfocada, zumbido nos ouvidos, e perda de sentido do estado ou cheiro.

5 De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é lesão da medula espinhal. A lesão ou trauma da medula espinhal é o dano à medula espinhal que pode resultar da lesão direta na medula propriamente dita ou indiretamente do dano aos ossos, tecidos ou vasos sanguíneos circundantes. Estudos reportaram que os níveis de expressão de TNF- α , IL-6 e IL-1 β ficam elevados na medula espinhal lesionada (Hayashi, M., e
10 outros J. Neurotrauma. 17(3):203-18, 2000). Os sintomas de lesão da medula espinhal incluem, porém não estão limitados a, fraqueza e perda sensória em e abaixo do ponto da lesão, dificuldades respiratórias, perda do controle da bexiga e intestino normais, entorpecimento, espasticidade, e dor.

15 De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é neuropatia periférica. O termo "neuropatia periférica" se refere ao dano ao sistema nervoso periférico. Foi reportado que IL-6 é superexpressado após axotomia experimental e que os níveis de IL-1 e TNF- α progressivamente aumentam após a lesão (esmagamento do nervo) (Creange, A., e
20 outros Eur. Citocina Network. 8(2): 145-51, 1997). Os sintomas estão relacionados com o tipo de nervo afetado e podem ser vistos durante um período de dias, semanas, ou anos. A fraqueza muscular é o sintoma mais comum de dano do nervo motor. Outros sintomas podem incluir câibras dolorosas e fasciculações (contrações musculares descontroladas visíveis na
25 pele), perda muscular, degeneração óssea, e alterações na pele, cabelo e unhas. O dano do nervo sensorio causa uma variação mais complexa de sintomas porque os nervos sensorios têm uma faixa maior, mais altamente especializada de funções. As fibras sensorias maiores inclusas na vibração de registro de mielina, toque leve, e sentido da posição. O dano às fibras
30 sensorias grandes perdem a capacidade de sentir vibrações e toques, resultando em um sentido geral de entorpecimento, especialmente nas mãos e pés. As fibras sensorias menores sem bainhas de mielina transmitem dor e

5 sensações de temperatura. Os sintomas de dano do nervo autonômico são diversos e dependem de quais órgãos ou glândulas são afetados. Sintomas comuns de dano do nervo autonômico incluem uma incapacidade de suar normalmente, que pode levar à intolerância ao calor; uma perda do controle da bexiga, que pode causar infecção ou incontinência; e uma incapacidade de controlar os músculos que se expandem ou contraem os vasos sanguíneos para manter os níveis seguros de pressão sanguínea. Uma perda de controle sobre a pressão sanguínea pode causar vertigens, tonturas, ou mesmo desmaio quando uma pessoa se move subitamente de uma posição sentada para uma posição de pé (uma condição conhecida como hipotensão postural ou ortostática). Os sintomas gastrointestinais frequentemente acompanham neuropatia autonômica. Os nervos que controlam as contrações do músculo intestinal geralmente funcionam mal, levando a diarreia, constipação ou incontinência.

15 De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é esclerose múltipla. De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é lúpus (lúpus eritematoso sistêmico).

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é síndrome cardiometabólica. Síndrome cardiometabólica (Síndrome X, CMS) é definida como a presença de quaisquer três das seguintes condições: (i) excesso de peso em torno da cintura; (ii) níveis elevados de triglicéridos; (iii) níveis baixos de HDL (colesterol bom); (iv) pressão sanguínea elevada; e (v) níveis elevados de glicose no sangue em jejum. A prevalência crescente de CMS foi relacionada com a obesidade, que aumentou entre muitos grupos de idade. Atualmente é aceito que CMS prediga a mortalidade cardiovascular e/ou o desenvolvimento de diabetes melito tipo 2. CMS é também complicado por modificações na composição corporal e redistribuição de gordura e geralmente está associado com a sensibilidade de insulina alterada. Muitas pessoas com diabetes têm várias destas condições ao mesmo tempo. De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é obesidade. Obesidade foi definida pelo Instituto Nacional de Saúde (NIH) como um índice de massa corporal (BMI) de 30 e acima. O Índice de

massa Corporal é uma relação padronizada de peso para altura, e geralmente é utilizado como um indicador geral de saúde. BMI pode ser calculado dividindo-se o peso (em quilogramas) pelo quadrado da altura (em metros). Um BMI entre 18,5 e 24,9 é considerado normal para a maioria dos adultos.

- 5 De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é diabetes melito do tipo II. A diabetes tipo 2 (diabetes melito não dependente de insulina (NIDDM), diabetes de início adulto) é um distúrbio metabólico que é principalmente caracterizado por resistência a insulina (células não respondem adequadamente quando a insulina está presente), deficiência de insulina
- 10 relativa e hiperglicemia. IL-6 não somente transmite sensibilidade à insulina, porém também é um determinante principal da produção hepática de proteína reativa a C (a fonte mais importante deste marcador inflamatório). Um estudo em pacientes de diabetes tipo 2 mostrou que níveis circulantes de IL-6 se correlacionam fortemente com a área de gordura visceral (VFA), e que o
- 15 enrijecimento da artéria carótida (um índice de aterosclerose) se correlacionou tanto com VFA quanto com os níveis de IL-6 e proteína reativa a C, sugerindo que IL-6 derivada de adipócito intra-abdominal pode estar envolvida na aterosclerose acelerada de pacientes de diabetes do tipo 2 (Despres, J, Eur. Heart J. Suppl. 8(B):B4-B12, 2006). Os sintomas de diabetes tipo 2 in-
- 20 cluem, porém não estão limitados a, poliúria e polidipsia.

De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é diabetes melito tipo I.

- De acordo com algumas tais modalidades, o distúrbio inflamatório é esteatoepatite não alcoólica (NASH). NASH é inflamação gordurosa do
- 25 fígado quando não devido ao uso de álcool excessivo. Em NASH, a gordura se forma no fígado e eventualmente causa tecido de cicatriz. NASH pode levar a cirrose. Estudos reportam que os níveis de TNF- α são aumentados em paciente com NASH (Bahceicoglu, H., e outros Hepatoenterology. 52(65): 1549-53, 2005). Estudos adicionais reportaram níveis de IL-6 eleva-
- 30 dos (Kugelmas, M., e outros Hepatology. 38(2):413-9, 2003) e níveis de IL- β (Brun, P., e outros Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 292:G518-G525, 2007) em paciente de NASH. Os sintomas de NASH incluem, porém

não estão limitados a, fadiga, mal-estar, e desconforto abdominal do quadrante superior direito do baço.

De acordo com outra modalidade, o domínio terapêutico do peptídeo inibidor terapêutico é um domínio tendo identidade substancial com a sequência de aminoácido KALNRQLGV AA [SEQ ID NO: 13].

De acordo com outra modalidade, o domínio terapêutico do peptídeo inibidor terapêutico é um domínio tendo identidade substancial com a sequência de aminoácido KALARQLGV AA [SEQ ID NO: 23].

De acordo com outra modalidade, o domínio de transdução de proteína do peptídeo inibidor terapêutico é um domínio tendo identidade substancial com a sequência de aminoácido WLRRIKA WLRRIKA [SEQ ID NO: 31].

De acordo com outra modalidade, o domínio de transdução de proteína do peptídeo inibidor terapêutico é um domínio tendo identidade substancial com a sequência de aminoácido WLRRIKA WLRR [SEQ ID NO: 34].

De acordo com outro aspecto, a invenção descrita fornece um ácido nucleico isolado que codifica um polipeptídeo tendo pelo menos 85% de identidade de sequência de aminoácido com um peptídeo inibidor terapêutico, em que o peptídeo inibidor terapêutico é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido WLRR1KAWLRRRIKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 14], em que o polipeptídeo inibe a atividade de quinase de uma enzima quinase. Em algumas tais modalidades, o ácido nucleico isolado codifica um polipeptídeo tendo pelo menos 86% de identidade de sequência de aminoácido com o peptídeo inibidor terapêutico, onde o peptídeo inibidor terapêutico é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido WLRRIKAWLRRRIKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 14], em que o polipeptídeo inibe a atividade de quinase de uma enzima quinase. Em algumas tais modalidades, o ácido nucleico isolado codifica um polipeptídeo tendo pelo menos 87% de identidade de sequência de aminoácido com o peptídeo inibidor terapêutico, onde o peptídeo inibidor terapêutico é um peptídeo tendo uma sequência de aminoácido WLRRIKAWLRRRIKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 14], onde o polipeptídeo

inibe a atividade de quinase de uma enzima quinase. Em algumas tais modalidades, o ácido nucleico isolado codifica um polipeptídeo tendo pelo menos 88% de identidade de sequência de aminoácido com o peptídeo inibidor terapêutico, onde o peptídeo inibidor terapêutico é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido WLRRIKAWLRRRIKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 14], onde o polipeptídeo inibe a atividade de quinase de uma enzima quinase. Em algumas tais modalidades, o ácido nucleico isolado codifica um polipeptídeo tendo pelo menos 89% de identidade de sequência de aminoácido com o peptídeo inibidor terapêutico, onde o peptídeo inibidor terapêutico é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido WLRRIKAWLRRRIKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 14], onde o polipeptídeo inibe a atividade de quinase de uma enzima quinase. Em algumas tais modalidades, o ácido nucleico isolado codifica um polipeptídeo tendo pelo menos 90% de identidade de sequência de aminoácido com o peptídeo inibidor terapêutico, onde o peptídeo inibidor terapêutico é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido WLRRIKAWLRRRIKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 14], onde o polipeptídeo inibe a atividade de quinase de uma enzima quinase. Em algumas tais modalidades, o ácido nucleico isolado codifica um polipeptídeo tendo pelo menos 91% de identidade de sequência de aminoácido com o peptídeo inibidor terapêutico, em que o peptídeo inibidor terapêutico é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido WLRRIKAWLRRRIKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 14], em que o polipeptídeo inibe a atividade de quinase de uma enzima quinase. Em algumas tais modalidades, o ácido nucleico isolado codifica um polipeptídeo tendo pelo menos 92% de identidade de sequência de aminoácido com o peptídeo inibidor terapêutico, onde o peptídeo inibidor terapêutico é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido WLRRIKAWLRRRIKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 14], em que o polipeptídeo inibe a atividade de quinase de uma enzima quinase. Em algumas tais modalidades, o ácido nucleico isolado codifica um polipeptídeo tendo pelo menos 93% de identidade de sequência de aminoácido com o peptídeo inibidor terapêutico, em que o peptídeo inibidor terapêutico é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido WLRRIKAWLRRRIKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 14], em que o polipeptídeo

inibe a atividade de quinase de uma enzima quinase. Em algumas tais modalidades, o ácido nucleico isolado codifica um polipeptídeo tendo pelo menos 94% de identidade de sequência de aminoácido com o peptídeo inibidor terapêutico, onde o peptídeo inibidor terapêutico é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido WLRRIKAWLRRRIKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 14], onde o polipeptídeo inibe a atividade de quinase de uma enzima quinase. Em algumas tais modalidades, o ácido nucleico isolado codifica um polipeptídeo tendo pelo menos 95% de identidade de sequência de aminoácido com o peptídeo inibidor terapêutico, em que o peptídeo inibidor terapêutico é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido WLRRIKAWLRRRIKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 14], em que o polipeptídeo inibe a atividade de quinase de uma enzima quinase. Em algumas tais modalidades, o ácido nucleico isolado codifica um polipeptídeo tendo pelo menos 96% de identidade de sequência de aminoácido com o peptídeo inibidor terapêutico, onde o peptídeo inibidor terapêutico é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido WLRRIKAWLRRRIKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 14], em que o polipeptídeo inibe a atividade de quinase de uma enzima quinase. Em algumas tais modalidades, o ácido nucleico isolado codifica um polipeptídeo tendo pelo menos 97% de identidade de sequência de aminoácido com o peptídeo inibidor terapêutico, em que o peptídeo inibidor terapêutico é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido WLRRIKAWLRRRIKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 14], em que o polipeptídeo inibe a atividade de quinase de uma enzima quinase. Em algumas tais modalidades, o ácido nucleico isolado codifica um polipeptídeo tendo pelo menos 98% de identidade de sequência de aminoácido com o peptídeo inibidor terapêutico, em que o peptídeo inibidor terapêutico é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido WLRRIKAWLRRRIKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 14], em que o polipeptídeo inibe a atividade de quinase de uma enzima quinase. Em algumas tais modalidades, o ácido nucleico isolado codifica um polipeptídeo tendo pelo menos 99% de identidade de sequência de aminoácido com o peptídeo inibidor terapêutico, onde o peptídeo inibidor terapêutico é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido WLRRIKAWLRRRIKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 14], em que o polipeptídeo inibe

a atividade de quinase de uma enzima quinase. Em algumas tais modalidades, o peptídeo inibidor terapêutico tendo a sequência de aminoácido WLRRIKAWLRRRIKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 14] é operavelmente ligado a um elemento regulador controlável. De acordo com outra modalidade, o peptídeo inibidor terapêutico é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido WLRRIKAWLRRRIKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 14]. De acordo com outra modalidade, o peptídeo inibidor terapêutico é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido FAKLAARL YRKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 12]. De acordo com outra modalidade, o peptídeo inibidor terapêutico é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido KAF AKLAARL YRKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 15]. De acordo com outra modalidade, o peptídeo inibidor terapêutico é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido YARAAARQARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 11]. De acordo com outra modalidade, o peptídeo inibidor terapêutico é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido YARAAARQ ARAKALNRQLGV AA [SEQ ID NO: 16]. De acordo com outra modalidade, o peptídeo inibidor terapêutico é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido YARAAARGQRAKALARQLAVA [SEQ ID NO: 17]. De acordo com outra modalidade, o peptídeo inibidor terapêutico é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido YARAAARGQRAKALARQLGVA [SEQ ID NO: 18]. De acordo com outra modalidade, o peptídeo inibidor terapêutico é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido YARAAARGQRAKALNRQLAVA [SEQ ID NO: 19]. De acordo com outra modalidade, o peptídeo inibidor terapêutico é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido YARAAARGQRAKALNRQLGVA [SEQ ID NO: 20]. De acordo com outra modalidade, o peptídeo inibidor terapêutico é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido YARAAARGQRAKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 21].

De acordo com outra modalidade, a composição de inibição de quinase, em que é desejável liberar a composição localmente, pode ser formulada para administração parenteral por injeção, por exemplo, por injeção de bolo ou infusão contínua. As formulações para injeção podem ser apresentadas na forma de dosagem de unidade, por exemplo, em ampolas ou em recipientes de multidose, com um conservante adicionado. As composi-

ções podem adotar tais formas como suspensões, soluções ou emulsões em veículos oleosos ou aquosos, e podem conter agentes formuladores tais como agentes de suspensão, estabilizante e/ou dispersante. As formulações farmacêuticas para administração parenteral incluem soluções aquosas dos compostos ativos na forma solúvel em água. Adicionalmente, as suspensões dos compostos ativos podem ser preparadas como suspensões de injeção oleosa apropriadas. Os veículos ou solventes lipofílicos adequados incluem óleos graxos tais como óleo de gergelim, ou ésteres de ácido graxo sintéticos, tais como oleato de etila ou triglicerídeos, ou lipossomas. As suspensões de injeção aquosa podem conter substâncias que aumentam a viscosidade da suspensão, tal como carboximetilcelulose de sódio, sorbitol, ou dextrana. Opcionalmente, a suspensão pode também conter estabilizantes adequados ou agentes que aumentem a solubilidade dos compostos para permitir a preparação de soluções altamente concentradas. Alternativamente, os compostos ativos podem estar na forma de pó para constituição com um veículo adequado, por exemplo, água livre de pirogênio estéril, antes do uso.

As composições farmacêuticas (isto é, composições de inibição de quinase) também podem compreender excipientes ou veículos de fase de gel ou sólida adequados. Os exemplos de tais veículos ou excipientes incluem, porém não estão limitados a, carbonato de cálcio, fosfato de cálcio, vários açúcares, amidos, derivados de celulose, gelatina, e polímeros tais como polietileno glicóis.

As formas de preparação farmacêutica líquida e sólida adequadas são, por exemplo, microencapsuladas, e se apropriado, com um ou mais excipientes, encocleados, revestidos em partículas de ouro microscópicas, contidas nos lipossomas, péletes para implantação no tecido, ou secas sobre um objeto a ser esfregado no tecido. Tais composições farmacêuticas também podem estar na forma de grânulos, contas, pós, comprimidos, comprimidos revestidos, (micro)cápsulas, supositórios, xaropes, emulsões, suspensões, cremes, gotas ou preparações com liberação prolongada de compostos ativos, em cujos excipientes de preparação e aditivos e/ou auxiliares

tais como desintegrantes, aglutinantes, agentes de revestimento, agentes umectantes, lubrificantes, ou solubilizantes são geralmente utilizados como descrito acima. As composições farmacêuticas são adequadas para uso em uma variedade de sistemas de liberação de fármaco. Para uma breve revisão de métodos para liberação de fármaco, vide Langer 1990 Science 249, 1527-1533, que está incorporado aqui por referência.

A composição de inibição de quinase, e opcionalmente outros terapêuticos, podem ser administrados *per se* (líquido) ou na forma de um sal farmaceuticamente aceitável. Quando utilizado em remédios os sais devem ser farmaceuticamente aceitáveis, porém os sais não farmaceuticamente aceitáveis podem convenientemente ser utilizados para preparar sais farmaceuticamente aceitáveis dos mesmos. Tais sais incluem, porém não estão limitados àqueles preparados dos seguintes ácidos: clorídrico, bromídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílicos, p-tolueno sulfônico, tartárico, cítrico, metano sulfônico, fórmico, malônico, sucínico, naftaleno-2-sulfônico, e benzeno sulfônico. Além disso, tais sais podem ser preparados como sais de metal alcalino ou alcalinoterrosos, tais como sais de sódio, potássio, ou cálcio do grupo de ácido carboxílico. Por "sal farmaceuticamente aceitável" é entendido aqueles sais que estão no escopo do diagnóstico médico seguro, adequado para uso em contato com os tecidos de humanos e animais menores sem toxicidade, irritação, resposta alérgica indevida e outros e são comensurados com uma relação de risco/benefício razoável. Sais farmaceuticamente aceitáveis são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, P, H. Stahl, e outros descrevem sais farmaceuticamente aceitáveis em detalhes em "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use" (Wiley VCH, Zurich, Alemanha: 2002). Os sais podem ser preparados *in situ* durante o isolamento final e purificação dos compostos descritos na presente invenção ou separadamente reagindo-se uma função de base livre com um ácido orgânico adequado. Os sais de adição de ácido representativos incluem, porém não estão limitados a, acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, benzenossulfonato, bissulfato, butirato, canforato, canforsulfonato, digliconato, glicerofosfato, hemissulfato, heptanoato, hexanoato, fuma-

rato, cloridrato, hidrobrometo, hidriodeto, 2- hidroxietanossulfonato(isetionato), lactato, maleato, metanossulfonato, nicotinato, 2-naftalenossulfonato, oxalato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionate, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, 5 fosfato, glutamato, bicarbonato, p-toluenossulfonato e undecanoato. Além disso, os grupos contendo nitrogênio básico podem ser quaternizados com tais agentes como haletos de alquila inferior tal como cloretos, brometos e iodetos de metila, etila propila, e butila; sulfatos de dialquila como sulfatos dimetila, dietila, dibutila e diamila; haletos de cadeia longa tais como cloretos, brometos e iodetos de decila, laurila, miristila e estearila; haletos de ari- 10 lalquila como brometos de benzila e fenetila e similares. Os produtos dispersíveis ou solúveis em água ou óleo são desse modo obtidos. Os exemplos de ácidos que podem ser empregados para formar sais de adição de ácidos farmacologicamente aceitáveis incluem tais ácidos inorgânicos como ácido 15 clorídrico, ácido bromídrico, ácido sulfúrico, e ácido fosfórico e tais ácidos orgânicos como ácido oxálico, ácido maleico, ácido succínico, e ácido cítrico. Os sais de adição básicos podem ser preparados *in situ* durante isolamento e purificação final de compostos descritos na invenção reagindo-se uma fra- 20 ção contendo ácido carboxílico com uma base adequada tal como o hidróxido, carbonato ou bicarbonato de um cátion de metal farmacologicamente aceitável ou com amônia ou uma amina orgânica primária, secundária, ou terciária. Os sais farmacologicamente aceitáveis incluem, porém não estão limitados a, cátions com base em metais alcalinos ou metais alcalinoterrosos tais como sais de lítio, sódio, potássio, cálcio, magnésio e alumínio e simila- 25 res e cátions de amina e amônia quaternária não tóxica incluindo amônio, tetrametilamônio, tetraetilamônio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, dietilamina, etilamina e similares. Outras aminas orgânicas representativas úteis para a formação de sais de adição de base incluem etilenodiamina, etanolamina, dietanolamina, piperidina, piperazina e similares. 30 Sais farmacologicamente aceitáveis também podem ser obtidos utilizando procedimentos padrões bem conhecidos na técnica, por exemplo, reagindo-se um composto suficientemente básico tal como uma amina com um ácido

adequado proporcionando um ânion fisiologicamente aceitável. Os sais de metal de álcali (por exemplo, sódio, potássio ou lítio) ou metal alcalinoterroso (por exemplo, cálcio ou magnésio) de ácidos carboxílicos também podem ser feitos.

5 As formulações podem ser apresentadas convenientemente em forma de dosagem de unidade e podem ser preparadas por quaisquer dos métodos bem conhecidos na técnica de farmácia. Todos os métodos incluem a etapa de trazer em associação um peptídeo de inibição de quinase, ou um éster, sal, hidrato, solvato ou profármaco farmaceuticamente aceitável do mesmo ("composto ativo") com o veículo que constitui um ou mais agentes acessórios. Em geral, as formulações são preparadas uniformemente e intimamente levando-se em associação o agente ativo com veículos líquidos ou veículos sólidos finamente divididos ou ambos e em seguida, se necessário, formando o produto na formulação desejada.

15 O agente farmacêutico ou um éster, sal, hidrato, solvato, ou profármaco farmaceuticamente aceitável do mesmo pode ser misturado com outros materiais ativos que não transmitem a ação desejada, ou com materiais que suplementam a ação desejada. As soluções ou suspensões utilizadas para aplicação parenteral, intradérmica, subcutânea, intratecal, ou tópica podem incluir, porém não estão limitadas, por exemplo, aos seguintes componentes; um diluente estéril tal como água para injeção, solução salina, óleos fixos, polietileno glicóis, glicerina, propileno glicol ou outros solventes sintéticos; agentes antibacterianos tais como álcool benzílico ou metil parabens; antioxidantes tais como ácido ascórbico ou bissulfeto de sódio; agentes de quelação tais como ácido etilenodiaminatetra-acético; tampões tais como acetatos, citratos ou fosfatos e agentes para o ajuste de tonicidade tal como dextrose ou cloreto de sódio. A preparação parental pode ser incluída em ampolas, seringas descartáveis ou frascos de doses múltiplas feitos de vidro ou plástico. Os veículos particulares administrados intravenosamente são salina fisiológica ou salina tamponada por fosfato (PBS).

As composições farmacêuticas para injeção parenteral compreendem soluções, dispersões, suspensões ou emulsões farmaceuticamente

aceitáveis estéreis aquosas ou não aquosas e pós estéreis para reconstituição em dispersões ou soluções injetáveis estéreis. Uma "solução" geralmente é considerada como uma mistura homogênea de duas ou mais substâncias. É frequentemente, embora não necessariamente, um líquido. Em

5 uma solução, as moléculas do soluto (ou substância dissolvida) são uniformemente distribuídas entre aquelas do solvente. Como utilizado aqui, "sistema disperso" ou "dispersão" se refere a um sistema de duas fases no qual uma fase é distribuída como partículas ou gotículas no segundo, ou fase contínua. O termo "suspensão" como utilizado aqui se refere às prepara-

10 ções de substâncias finamente divididas, não dissolvidas dispersas em veículos líquidos. O material particulado de uma suspensão pode sedimentar lentamente do veículo líquido no qual ele é disperso; portanto, as suspensões devem ser bem agitadas antes do uso para garantir distribuição uniforme de sólido no veículo e desse modo dosagem uniforme e apropriada.

15 Como utilizado aqui "emulsão" se refere a um sistema coloide no qual tanto a fase dispersa quanto o meio de dispersão são líquidos imiscíveis onde o líquido disperso é distribuído em pequenos glóbulos em todo o corpo do líquido de meio de dispersão. Uma emulsão básica estável contém pelo menos os dois líquidos e um agente emulsificante. Os tipos comuns de emul-

20 sões são de óleo em água, onde o óleo é o líquido disperso e uma solução aquosa, tal com água, é o meio de dispersão, e água em óleo, onde, inversamente, uma solução aquosa é a fase dispersa. Também é possível preparar emulsões que são não aquosas.

Os exemplos de portadores, diluentes, solventes ou veículos a-

25 quosos e não aquosos adequados incluem água, etanol, polióis (propileno glicol, polietileno glicol, glicerol, e similares), misturas adequadas dos mesmos, óleos vegetais (tal como, óleo de oliva) e ésteres orgânicos injetáveis tal com oleato de etila. A fluidez apropriada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento tal como licitina, pela conservação do tamanho

30 de partícula requerido no caso de dispersões, e pelo uso de tensoativos.

Estas composições podem também conter adjuvantes incluindo agentes conservantes, agentes umectantes, agentes emulsificantes, e agen-

tes dispersantes. A prevenção da ação de micro-organismos pode ser garantida por vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, e similares. Pode também ser desejável incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares, cloreto de sódio e similares. A absorção prolongada da forma farmacêutica injetável pode ser realizada pelo uso de agentes de retardamento de absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina.

As suspensões, além dos compostos ativos, podem conter agentes de suspensão, como, por exemplo, alcoóis de isostearila etoxilados, sorbitol de polioxietileno e ésteres de sorbitan, celulose microcristalina, metahidróxido de alumínio, bentonita, agar-agar, tragacanto, e misturas dos mesmos.

As formas de depósito injetáveis são feitas formando-se matrizes microencapsuladas do fármaco em polímeros biodegradáveis tais como polilactídeo-poliglicolida. Dependendo da relação de fármaco para polímero e da natureza do polímero particular empregado, a taxa de liberação de fármaco pode ser controlada. Tais formulações de ação longa podem ser formuladas com materiais hidrofóbicos ou poliméricos adequados (por exemplo, como uma emulsão em um óleo aceitável) ou resinas de permuta de íon, ou como derivados frugalmente solúveis, por exemplo, como um sal frugalmente solúvel. Os exemplos de outros polímeros biodegradáveis incluem poli(ortoésteres) e poli(anidridos). As formulações injetáveis de depósito são também preparadas capturando-se o fármaco em lipossomas ou microemulsões que são compatíveis com os tecidos corpóreos.

As formulações localmente injetáveis podem ser esterilizadas, por exemplo, por filtração através de um filtro de retenção de bactérias ou por incorporação de agentes esterilizantes na forma de composições sólidas estéreis que podem ser dissolvidas ou dispersas em água estéril ou outro meio injetável estéril exatamente antes do uso. As preparações injetáveis, por exemplo, suspensões oleaginosas ou aquosas injetáveis estéreis podem ser formuladas de acordo com a técnica conhecida utilizando agentes de dispersão e umectação adequados e agentes de suspensão. A preparação

injetável estéril também pode ser uma solução, suspensão ou emulsão injetável estéril em um diluente não tóxico, parenteralmente aceitável ou solvente tal como uma solução em 1,3-butanodiol. Entre os veículos e solventes aceitáveis que podem ser empregados estão água, solução de Ringer, U. S. P. e solução de cloreto de sódio isotônica. Além disso, os óleos estéreis, fixos convencionalmente são empregados ou como um meio solvente ou de suspensão. Para este propósito qualquer óleo fixo suave pode ser empregado incluindo mono- ou diglicerídeos sintéticos. Além disso, os ácidos graxos tais como ácido oleico são utilizados na preparação de injetáveis.

As formulações para administração parenteral (incluindo, porém não limitado a, subcutânea, intradérmica, intramuscular, intravenosa, intratecal e intra-articular) incluem soluções de injeção estéril aquosas e não aquosas que podem conter antioxidantes, tampões, bacteriostatos e solutos, que tornam a formulação isotônica com o sangue do recipiente pretendido; e suspensões estéreis aquosas e não aquosas, que podem incluir agentes de suspensão e agentes espessantes. As formulações podem ser apresentadas em recipientes de dose de unidade ou de multidose, por exemplo, frascos e ampolas seladas, e podem ser armazenadas em uma condição liofilizada requerendo a adição do veículo líquido estéril, por exemplo, salina, água par injeção, imediatamente antes do uso. As soluções e suspensões de injeção extemporâneas podem ser preparadas de pós estéreis, grânulos e comprimidos do tipo previamente descrito.

Outro método de formulação das composições descritas aqui envolve conjugar os compostos descritos aqui para um polímero que realça a solubilidade aquosa. Os exemplos de polímeros adequados incluem, porém não estão limitados a um polietileno glicol, ácido poli-(d-glutâmico), ácido poli-(l-glutâmico), ácido poli-(l-glutâmico), ácido poli-(d-aspártico), ácido poli-(l-aspártico), ácido poli-(l-aspártico) e copolímeros dos mesmos. Os poliácidos glutâmicos tendo pesos moleculares entre cerca de 5.000 a cerca de 100.000, com pesos moleculares entre cerca de 20.000 e cerca de 80.000 podem ser utilizados e com pesos moleculares entre cerca de 30.000 e cerca de 60.000 também podem ser utilizados. O polímero é conjugado

através de uma ligação de éster a uma ou mais hidroxilas de um peptídeo inibidor terapêutico inventivo utilizando um protocolo como essencialmente descrito pela Patente dos Estados Unidos Nº 5.977.163, que está incorporado aqui por referência.

5 Os agentes de tamponamento adequados incluem: ácido acético e um sal (1-2% em peso/volume); ácido cítrico e um sal (1-3% em peso/volume); ácido bórico e um sal (0,5-2,5% em peso/volume); e ácido fosfórico e um sal (0,8-2% em peso/volume). Conservantes adequados incluem cloreto de benzalcônio (0,003-0,03% em peso/volume); clorobutanol (0,3-
10 0,9% em peso/volume); parabenos (0,01-0,25% em peso/volume) e timero-sal (0,004- 0,02% em peso/volume).

Em algumas modalidades, a composição de inibição de quinase é uma composição farmacêutica. As composições farmacêuticas descritas com a presente invenção contêm uma quantidade terapeuticamente eficaz
15 de uma composição de inibição de quinase e opcionalmente outros agentes terapêuticos incluídos em um veículo farmaceuticamente aceitável. O ingrediente ativo pode ser uma composição de inibição de quinase, um peptídeo inibidor terapêutico, um PTD, ou um domínio terapêutico, ou combinações dos mesmos. Os componentes das composições farmacêuticas também
20 são capazes de ser misturada de uma maneira tal que não haja nenhuma interação que substancialmente transmita a eficiência farmacêutica desejada.

O agente terapêutico(s), incluindo a composição de inibição de quinase, pode ser fornecido em partículas. As partículas podem conter o a-
25 gente terapêutico(s) em um núcleo cercado por um revestimento. O agente terapêutico(s) também pode ser disperso em todas as partículas. O agente terapêutico(s) também pode ser absorvido em pelo menos uma superfície das partículas. As partículas podem ser de qualquer ordem de liberação de cinéticos, incluindo liberação de ordem zero, liberação de primeira ordem,
30 liberação de segunda ordem, liberação retardada, liberação prolongada, liberação imediata, etc., e qualquer combinação dos mesmos. A partícula pode incluir, além do agente terapêutico(s), quaisquer destes materiais rotineira-

mente utilizados na técnica de farmácia e medicina, incluindo, porém não limitado ao material erosível, não erosível, biodegradável, ou não biodegradável ou combinações dos mesmos. As partículas podem ser microcápsulas que contêm a composição de inibição de quinase em uma solução ou em um estado semissólido. As partículas podem ser de virtualmente qualquer forma.

Ambos os materiais poliméricos não biodegradáveis e biodegradáveis podem ser utilizados na fabricação de partículas para a liberação do agente terapêutico(s). Tais polímeros podem ser polímeros naturais ou sintéticos. O polímero é selecionado com base no período de tempo durante o qual a liberação é desejada. Os polímeros de bioadesivos de interesse particular incluem hidrogéis bioerosíveis como descrito por Sawhney e outros em *Macromolecules* (1993) 26, 581-587, os ensinamentos do qual estão incorporados aqui. Estes incluem ácidos poli-ialurônicos, caseína, gelatina, glutina, polianidretos, ácido poliacrílico, alginato, quitosana, poli(metil metacrilatos), poli(etilmetacrilatos), poli(butilmetacrilato), poli(isobutilmetacrilato), poli(hexilmetacrilato), poli(isodecilmetacrilato), poli(lauril metacrilato), poli(fenilmetacrilato), poli(metilacrilato), poli(isopropilacrilato), poli(isobutilacrilato), e poli(octadecilacrilato).

O agente(s) terapêutico pode estar contido em sistemas de liberação controlada. Para prolongar o efeito de um fármaco, geralmente é desejável retardar a absorção do fármaco de injeção subcutânea, intratecal, ou intramuscular. Isto pode ser realizado pelo uso de uma suspensão líquida de material cristalino ou amorfo com fraca solubilidade em água. A taxa de absorção do fármaco desse modo depende de sua taxa de dissolução que, sucessivamente, pode depender do tamanho do cristal e da forma cristalina. Alternativamente, a absorção retardada de uma forma de fármaco parenteralmente administrado é realizada dissolvendo-se ou suspendendo-se o fármaco em um veículo de óleo.

O uso de um implante de liberação prolongada em longo prazo pode ser particularmente adequado para o tratamento de condições crônicas. Os implantes de liberação prolongada em longo prazo são bem conhe-

cidos por aqueles comumente versados na técnica e incluem alguns dos sistemas de liberação descritos aqui.

Em outra modalidade, a composição de inibição de quinase também compreende um gel, composto sólido ou semissólido de liberação
5 lenta, onde o gel, composto sólido ou semissólido de liberação lenta compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz de um peptídeo inibidor terapêutico e um revestimento. O revestimento pode ser de qualquer material desejado, preferivelmente um polímero ou mistura de diferentes polímeros. Opcionalmente, o polímero pode ser utilizado durante o estágio de granulação para formar uma matriz com o ingrediente ativo para obter um padrão de liberação desejado do ingrediente ativo. O gel, composto sólido ou semissólido de liberação lenta é capaz de liberar o agente ativo durante um período desejado de tempo. O gel, composto sólido ou semissólido de liberação lenta pode ser implantado em proximidade junto a um local desejado,
10 por meio do qual a liberação do agente ativo produz um efeito farmacológico localizado.

Em outra modalidade, a composição de inibição de quinase também compreende um sistema de liberação de semissólido que utiliza um sistema de liberação semissólido, biodegradável, biocompatível ou um multi-
20 particulado biodegradável, biocompatível disperso e suspenso em um sistema de liberação de semissólido, biodegradável, biocompatível biodegradável para injeção, deposição, ou implantação em ou sob o corpo para facilitar os efeitos terapêuticos locais. Em algumas tais modalidades, o agente terapêutico é uma composição de inibição de quinase, um peptídeo inibidor terapêutico, um PTD, um domínio terapêutico, ou sais farmaceuticamente aceitáveis dos mesmos.

Em outra modalidade, o sistema de liberação de semissólido compreende parcialmente ou no total um semissólido biocompatível, biodegradável, viscoso onde o semissólido compreende um hidrogel. Em uma
30 modalidade, mono-oleato de glicerila, a seguir referido como GMO, é o sistema de liberação de semissólido ou hidrogel pretendido. Entretanto, muitos hidrogéis, polímeros, composições de hidrocarboneto e derivados de ácido

graxo tendo propriedades físicas/químicas similares com respeito a viscosidade/rigidez podem funcionar como um sistema de liberação de semissólido. Por exemplo, polissacarídeos sulfatados, tal como, porém não limitado a, heparina, podem ser utilizados.

- 5 Em uma modalidade, o sistema de gel é produzido aquecendo-se GMO acima de seu ponto de fusão (40-50°C) e adicionando-se um tampão de base aquosa quente ou solução de eletrólito, tal como, por exemplo, tampão de fosfato ou salina normal, que desse modo produz uma estrutura tridimensional. O tampão de base aquosa pode ser compreendido de outras
- 10 soluções aquosas ou combinações contendo os solventes semipolares.

GMO fornece um hidrogel predominantemente com base em lipídeo, o qual tem a capacidade de incorporar materiais lipofílicos. GMO também fornece canais aquosos internos que incorporam e liberam compostos hidrofílicos. É reconhecido que em temperatura ambiente (aproximada-

15 mente 25°C), o sistema de gel pode exibir diferenciamento de fases que compreende uma grande faixa de medições de viscosidade.

Em uma modalidade, duas fases de sistema de gel são utilizadas devido a suas propriedades em temperatura ambiente e temperatura fisiológica (cerca de 37°C) e pH (cerca de 7,4). Na duas fases de sistema de

20 gel, a primeira fase é uma fase lamelar de aproximadamente 5% a aproximadamente 15% de teor de H₂O e aproximadamente 95% a aproximadamente 85% de teor de GMO. A fase lamelar é um fluido moderadamente viscoso, que pode ser facilmente manipulado, derramado e injetado. A segunda fase é uma fase cúbica consistindo em aproximadamente 15% a a-

25 proximadamente 40% de teor de H₂O e aproximadamente 85%-60% de teor de GMO. Tem um teor de água em equilíbrio em aproximadamente 35% em peso a aproximadamente 40% em peso. O termo "teor de água em equilíbrio" como utilizado aqui se refere ao teor de água máximo na presença de água em excesso. Desse modo a fase cúbica incorpora água em aproxima-

30 damente 35% em peso a aproximadamente 40% em peso. A fase cúbica é altamente viscosa. A viscosidade pode ser medida, por exemplo, através de um viscosímetro de Brookfield. A viscosidade excede 1,2 milhão de centipoise

(cp); onde 1,2 milhão cp é a medida máxima de viscosidade obtenível através da configuração de xícara e peso de pêndulo do viscosímetro de Brookfield. Em algumas tais modalidades, um agente terapêutico pode ser incorporado no semissólido para fornecer um sistema para liberação prolongada, contínua do mesmo. Em algumas tais modalidades, o agente terapêutico é um peptídeo inibidor terapêutico. Em algumas tais modalidades, o agente terapêutico é um PTD. Em algumas tais modalidades, o agente terapêutico é um domínio terapêutico. Em algumas tais modalidades, outros agentes terapêuticos, agentes biologicamente ativos, fármacos, medicamentos e inativos podem ser incorporados no semissólido para fornecer um efeito local biológico, fisiológico ou terapêutico no corpo em várias taxas de liberação.

Em algumas modalidades, formulações alternativas semissólidas, modificadas e métodos de produção são utilizado tal que a natureza lipofílica do semissólido seja alterada, ou alternativamente, os canais aquosos contidos no semissólido são alterados. Desse modo, vários agentes terapêuticos em concentrações variantes podem difundir do semissólido em diferentes taxas, ou ser liberado dos mesmos com o passar do tempo através dos canais aquosos do semissólido. As substâncias hidrofílicas podem ser utilizadas para alterar a consistência do semissólido ou liberação de agente terapêutico por alteração de viscosidade, fluidez, tensão de superfície, ou a polaridade do componente aquoso. Por exemplo, monoestearato de glicerila (GMS), que é estruturalmente idêntico a GMO com a exceção de uma ligação dupla no Carbono 9 e Carbono 10 da fração de ácido graxo em vez de uma ligação única, não gelifica sob aquecimento e adição de um componente aquoso, como GMO. Entretanto, porque GMS é um tensoativo, GMS é miscível em H₂O até aproximadamente 20% em peso/peso. O termo "tensoativo" como utilizado aqui se refere a um agente ativo de superfície, desse modo sendo miscível em H₂O em concentrações limitadas bem como substâncias polares. Ao aquecer e agitar, a combinação de 80% de H₂O/20% de GMS produz uma pasta dispersível tendo uma consistência assemelhando-se a loção para as mãos. A pasta então é combinada com GMO fundido para formar o gel de fase cúbica possuindo uma viscosidade

elevada com declarado até agora. Em algumas tais modalidades, o agente terapêutico é um peptídeo inibidor terapêutico. Em algumas tais modalidades, o agente terapêutico é um PTD. Em algumas tais modalidades, o agente terapêutico é um domínio terapêutico.

5 Em outra modalidade, a gelatina hidrolizada, tal como comercialmente disponível Gelfoam®, é utilizada para alterar o componente aquoso. Aproximadamente 6,25% a 12,50% de concentração de Gelfoam® em peso pode ser colocado em aproximadamente 93,75% a 87,50% de concentração de H₂O respectivamente em peso ou outro tampão de base aquosa. Ao aquecer e agitar, a combinação de H₂O (ou outro tampão aquoso)/Gelfoam®
10 produz uma substância gelatinosa espessa. A substância resultante é combinada com GMO, por meio da qual um produto então formado dilata-se e forma um gel translúcido altamente viscoso, sendo menos maleável em comparação com o gel de GMO líquido sozinho.

15 Em outra modalidade, polietileno glicóis (PEG's) podem ser utilizados para alterar o componente aquoso para ajudar na solubilização de fármaco. Aproximadamente 0,5% a 40% de concentração de PEG's (dependendo do peso molecular de PEG) em peso colocou-se em aproximadamente 99,5% a 60% de concentração de H₂O respectivamente em peso ou
20 outro tampão de base aquosa. Ao aquecer e agitar, a combinação de H₂O (ou outro tampão aquoso)/PEG produz um líquido viscoso para uma substância semissólida. A substância resultante é combinada com GMO, por meio do qual um produto então formado se dilata e forma um gel altamente viscoso.

25 Sem estar preso a teoria, é postulado que o agente terapêutico se libera do semissólido até difusão, concebivelmente de uma maneira bifásica. Uma primeira fase envolve, por exemplo, um fármaco lipofílico contido na membrana lipofílica difunde dele no canal aquoso. A segunda fase envolve a difusão do fármaco do canal aquoso no ambiente externo. Sendo
30 lipofílico, o fármaco pode se orientar dentro do gel de GMO em uma estrutura de bi-camada de lipídeo proposta. Desse modo, a incorporação de mais do que aproximadamente 7,5% do fármaco, por exemplo, uma composição

de inibição de quinase, em peso em GMO causa uma perda da integridade da estrutura tridimensional por meio da qual o sistema de gel não mais mantém a fase cúbica semissólida, e reverte para o líquido de fase lamelar viscosa. Em algumas tais modalidades, o agente terapêutico é um peptídeo inibidor terapêutico. Em algumas tais modalidades, o agente terapêutico é um PTD. Em algumas tais modalidades, o agente terapêutico é um domínio terapêutico. Em outra modalidade, cerca de 1 a cerca de 45% de agente terapêutico é incorporado em peso em um gel de GMO em temperatura fisiológica sem rompimento da estrutura tri-dimensional normal. Como um resultado, este sistema permite a capacidade de flexibilidade significativamente aumentada com dosagens de fármaco. Uma vez que o sistema de liberação é maleável, pode ser liberado e manipulado em um sítio de implante, como para aderir e conformar para contornar as paredes, espaços ou outras lacunas vazias no corpo bem como completamente preencher todas as lacunas vazias existentes. O sistema de liberação garante a distribuição de fármaco e liberação de fármaco uniforme em todo o sítio de implante. A facilidade de liberação e manipulação do sistema de liberação em um espaço é facilitada através de um aparato de liberação de semissólido. Um aparato de liberação de semissólido facilita a liberação alvejada e controlada do sistema de liberação.

Em uma modalidade, o componente multiparticulado é compreendido de sistemas biocompatíveis, biodegradáveis, poliméricos ou não poliméricos utilizados para produzir estruturas sólidas incluindo, porém não limitadas com incomparáveis, péletes, cristais, aglomerados, microesferas, ou nanopartículas.

Em outra modalidade, o componente multiparticulado compreende poli(láctico-co-glicolida) (PLGA's). PLGA's são materiais de polímero biodegradável utilizados para liberação de agente terapêutico controlada e prolongada no corpo. Tais sistemas de liberação oferecem eficácia terapêutica realçada e toxicidade total reduzida quando comparados com dosagem frequente periódica, sistêmica. Sem estar preso à teoria, é postulado que o sistema de PLGA's consistindo em diferentes relações molares das subuni-

dades monoméricas facilitarão maior flexibilidade na construção de perfis de liberação exatos para acomodar a liberação de agente terapêutico alvejado através de alterações na taxa de degradação de polímero.

Em uma modalidade, a composição de PLGA é suficientemente pura para ser biocompatível e continuar biocompatível sob biodegradação. Em uma modalidade, o polímero de PLGA é designado e configurado em microesferas tendo um agente terapêutico ou fármaco capturado nele, por meio do qual o agente terapêutico é subsequentemente liberado dele. Em algumas tais modalidades, o agente terapêutico é um agente de inibição de quinase. Em algumas tais modalidades, o agente terapêutico é um peptídeo inibidor terapêutico. Em algumas tais modalidades, o agente terapêutico é um PTD. Em algumas tais modalidades, o agente terapêutico é um domínio terapêutico.

Em outra modalidade, o componente multiparticulado é compreendido de poli d,l(lactic-co-caprolactona). Isto fornece um material de polímero biodegradável utilizado para liberação controlada e prolongada de agente terapêutico no corpo com um mecanismo de liberação de fármaco similar àquele dos polímeros de PLGA. Em uma modalidade, as microesferas multiparticuladas também são produzidas utilizando materiais não poliméricos biodegradáveis e/ou biocompatíveis tais como GMS.

Em outra modalidade, o componente multiparticulado é também modificado por métodos utilizados para encapsular ou revestir os componentes multiparticulados utilizando polímeros da mesma composição com a mesma ou diferente substância de fármaco, diferentes polímeros com a mesma ou diferente substância de fármaco, ou com múltiplos processos em camada contendo nenhum fármaco, o mesmo fármaco, um fármaco diferente, ou múltiplas substâncias de fármaco. Isto permite a produção de um sistema de multicamada (encapsulado) multiparticulado com uma grande faixa de perfis de liberação de fármaco para agentes de fármaco únicos ou múltiplos simultaneamente. Em outra modalidade, os materiais de revestimento que controlam a taxa de difusão física de fármaco do multiparticulado podem ser utilizados sozinhos ou junto com as modalidades acima mencionadas e

modalidades imaginadas.

Em outra modalidade, a composição de inibição de quinase também compreende um sistema de liberação que utiliza PLGA. O polímero de PLGA contém ligações de éster, que são lábeis a hidrólise. Quando H₂O
5 penetra o polímero e PLGA, as ligações de éster, portanto são hidrolisadas, e os monômeros, sendo solúveis em água, são removidos do polímero de PLGA, desse modo facilitando liberação física do fármaco capturado, por exemplo, porém não limitado a, uma composição de inibição de quinase, com o passar do tempo. Em algumas tais modalidades, outras classes de
10 polímeros sintéticos biodegradáveis, biocompatíveis podem ser utilizadas para a liberação controlada e prolongada de agente terapêutico no corpo, incluindo polianidridos, polifosfatos, polidioxanona, celulósicos e acrílicos que estendidos como exemplos não limitantes. Em algumas tais modalidades, os materiais não poliméricos podem ser utilizados para liberação de
15 agente terapêutico controlada e prolongada no corpo, incluindo, porém não limitado a esteróis, ésteres de ácido graxo de sacarose, ácidos graxos, e ésteres de colesterila, que são estendidos como exemplos não limitantes.

Em outro aspecto, a composição de inibição de quinase também compreende um sistema de liberação de semissólido, que age como um veí-
20 culo para liberação local de agentes terapêuticos, compreendendo uma substância sólida ou semissólida lipofílica, hidrofílica, ou anfofílica, aquecida acima de seu ponto de fusão e, por conseguinte, seguido por inclusão de um componente aquoso quente para produzir uma composição gelatinosa de viscosidade variável com base no teor de água. O agente terapêutico é in-
25 corporado e disperso no componente lipofílico fundido ou o componente de tampão aquoso antes de mistura e formação do sistema semissólido. A composição gelatinosa é colocada no aparato de liberação de semissólido para colocação subsequente, ou deposição. Sendo maleável, o sistema de gel é facilmente liberado e manipulado através do aparato de liberação de
30 semissólido em um sítio de implante, onde ele adere e se conforma ao contorno do sítio de implantação, espaços ou outros espaços vazios no corpo bem como completamente enchendo todos os espaços vazios existentes.

Alternativamente, um componente multiparticulado, compreendido de um sistema polimérico ou não polimérico biocompatível, é utilizado para produzir microesferas tendo um agente terapêutico capturado nela. Em seguida aos métodos de processamento finais, as microesferas são incorporadas no sistema semissólido e subsequentemente colocadas no aparato de liberação de semissólido para ser facilmente liberada dele em um sítio de implante ou espaço comparável, por meio do qual o agente terapêutico é subsequentemente liberado dele por (a) mecanismo de liberação de fármaco.

Em outro aspecto, a presente invenção também fornece um dispositivo biomédico compreendendo pelo menos um peptídeo inibidor terapêutico isolado, em que o um ou mais peptídeo inibidor terapêutico isolado está/estão dispostos sobre ou dentro do dispositivo. Em algumas tais modalidades, o pelo menos um peptídeo inibidor terapêutico é pelo menos um peptídeo tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo em peptídeos tendo uma sequência de aminoácido de WLRRIKA WLRRIKALNRQLGV AA [SEQ ID NO: 14], FAKLAARLYRKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 12], KAFKLAARLYRKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 15], YARAAARQARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 11], YARAAARQARAKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 16], YARAAARGQRAKALARQLAVA [SEQ ID NO: 17], YARAAARGQRAKALARQLGVA [SEQ ID NO: 18], YARAAARGQRAKALNRQLAVA [SEQ ID NO: 19], YARAAARGQRAKALNRQLGVA [SEQ ID NO: 20] and YARAAARGQRAKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 21].

De acordo com outro aspecto, a invenção descrita fornece um ácido nucleico isolado que especificamente hibridiza para mRNA codificando um peptídeo compreendendo uma sequência de aminoácido de PTD. O termo "especificamente hibridiza" como utilizado aqui se refere ao processo por meio do qual um ácido nucleico distintivamente ou definidamente forma pares de base com regiões complementares de pelo menos um filamento de DNA que foi não originalmente pareado com o ácido nucleico. Por exemplo, um ácido nucleico que pode ligar ou hibridizar com pelo menos uma porção de um mRNA de uma célula codificando um peptídeo compreendendo uma sequência de CPP pode ser considerado um ácido nucleico que especifica-

mente hibridiza. Um ácido nucleico que seletivamente hibridiza sofre hibridização, em condições de hibridização severas, da sequência de ácido nucleico para uma sequência-alvo de ácido nucleico especificada a um grau detectavelmente maior (por exemplo, pelo menos 2 vezes além da base) do que sua hibridização para sequências de ácido nucleico não alvo e para a exclusão substancial de ácidos nucleicos não alvos. Seletivamente a hibridização de sequências tipicamente tem cerca de pelo menos 80% de identidade de sequência, pelo menos 90% de identidade de sequência, ou pelo menos 100% de identidade de sequência (isto é, complementariedade) com cada outra. De acordo com outra modalidade, a presente invenção fornece um ácido nucleico isolado que especificamente hibridiza para mRNA codificando um peptídeo compreendendo uma sequência de aminoácido de peptídeo inibidor terapêutico.

Os métodos de extração de RNA são bem conhecidos na técnica e são descritos, por exemplo, em J. Sambrook e outros, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1989), vol. 1, ch. 7, "Extraction, Purification, and Analysis of Messenger RNA from Eukaryotic Cells," incorporados aqui por sua referência. Outros métodos de isolamento e extração são também bem conhecidos, por exemplo, em F. Ausubel e outros, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, 2007). Tipicamente, o isolamento é realizado na presença de agentes caotrópicos, tais como cloreto de guanidíneo ou tiocianato de guanidíneo, embora outros detergentes e agentes de extração alternativamente possam ser utilizados. Tipicamente, o mRNA é isolado do RNA extraído por cromatografia em oligo(dT)-celulose ou outro meio cromatográfico que tenha a capacidade de ligar a porção 3' poliadenilada de moléculas de mRNA. Alternativamente, porém menos preferivelmente, o RNA total pode ser utilizado. Entretanto, é geralmente preferido isolar poli(A)+RNA de fontes de mamífero.

30 **Métodos: Métodos de Inibição de Quinases que Ativam Citocinas**

De acordo com outro aspecto, a presente invenção fornece um método para tratar um distúrbio inflamatório cuja patofisiologia compreende

expressão de citocina inflamatória, o método compreendendo as etapas de:

(a) fornecer uma composição de inibição de quinase, onde a quantidade terapêuticamente eficaz do peptídeo inibidor terapêutico inibe pelo menos uma enzima quinase, onde a composição de inibição de quinase compreende

5 uma quantidade terapêuticamente eficaz de um peptídeo inibidor terapêutico, onde o peptídeo inibidor terapêutico compreende um primeiro domínio e um segundo domínio, onde o primeiro domínio compreende um domínio de transdução de proteína (PTD) localizado próximo ao segundo domínio, onde o segundo domínio compreende um domínio terapêutico localizado próximo

10 do primeiro domínio; (b) administrar a composição de inibição de quinase a um paciente em necessidade da mesma, desse modo inibindo pelo menos uma enzima quinase; e (c) reduzir a expressão de pelo menos uma citocina inflamatória, desse modo tratando o distúrbio inflamatório.

De acordo com uma modalidade, o distúrbio inflamatório cuja patofisiologia compreende expressão de citocina inflamatória é pelo menos um

15 distúrbio selecionado do grupo consistindo em asma, espondilite ancilosante, Diabetes Tipo I, Síndrome de Guillame-Barre , lúpus, psoríase, escleroderma, Doença de Sjorgen, prostatite crônica, glomerulonefrite, doença inflamatória do intestino, doença inflamatória pélvica, lesão de reperfusão, artrite reumatoide, vasculite, vasculite por hipersensibilidade, choque endotóxico, pancreatite, doença inflamatória localizada, aterosclerose, mal de alzheimer, isquemia, hiperplasia íntima, estenose, restenose, leiomioma, espasmos do músculo liso, angina, angina de Prinzmetal, braquicardia, hipertensão, hipertrofia cardíaca, insuficiência renal, acidente vascular cerebral, hipertensão

25 pulmonar, toxemia de gravidez, doença de Raynaud, uremia hemolítica, fissura anal, acalasia, impotência, enxaqueca, vasculopatia, insuficiência cardíaca congestiva, miocárdio atordado, disfunção diastólica, gliose, doença pulmonar obstrutiva crônica, osteopenia, artrite degenerativa, sepse, cirrose, fibrose intersticial, colite, apendicite, gastrite, laringite, meningite, otite, lesão

30 cerebral traumática, lesão da medula espinhal, neuropatia periférica, esclerose múltipla, síndrome cardiometabólica, esteatoepatite não alcoólica, fibrose cística do pâncreas e pulmões, fibrose de injeção, fibrose endomiocárdia-

na, fibrose pulmonar idiopática do pulmão, fibrose mediastinal, mielofibrose, fibrose retroperitoneal, fibrose sistêmica nefrogênica, câncer de mama, câncer de próstata, e disfunção da célula endotelial.

De acordo com outra modalidade, o primeiro domínio está localizado 5' ao segundo domínio. De acordo com outra modalidade, o segundo domínio está localizado 3' ao primeiro domínio. De acordo com outra modalidade, o primeiro domínio está operavelmente ligado ao segundo domínio. De acordo com outra modalidade, o segundo domínio é operavelmente ligado ao primeiro domínio.

De acordo com outra modalidade, a enzima quinase é proteína quinase ativada por proteína quinase ativada por mitógeno. De acordo com algumas tais modalidades, a enzima quinase é MK2. De acordo com algumas tais modalidades, a enzima quinase é MK3. De acordo com outra modalidade, a enzima quinase é CaMK.

De acordo com outra modalidade, o domínio terapêutico do peptídeo inibidor terapêutico é um domínio tendo identidade substancial com a sequência de aminoácido KALNRQLGV AA [SEQ ID NO: 13].

De acordo com outra modalidade, o domínio terapêutico do peptídeo inibidor terapêutico é um domínio tendo identidade substancial com a sequência de aminoácido KALARQLGV AA [SEQ ID NO: 23].

De acordo com outra modalidade, a sequência de aminoácido do domínio terapêutico do peptídeo inibidor terapêutico é KAANRQLGV A A [SEQ ID NO: 22]. De acordo com outra modalidade, o domínio terapêutico do peptídeo inibidor terapêutico é um domínio tendo a sequência de aminoácido KALARQLGV AA [SEQ ID NO: 23]. De acordo com outra modalidade, o domínio terapêutico do peptídeo inibidor terapêutico é um domínio tendo a sequência de aminoácido KALNAQLGVAA [SEQ ID NO: 24]. De acordo com outra modalidade, o domínio terapêutico do peptídeo inibidor terapêutico é um domínio tendo a sequência de aminoácido KALNRALGV AA [SEQ ID NO: 25].

De acordo com outra modalidade, o domínio terapêutico do peptídeo inibidor terapêutico é um domínio tendo a sequência de aminoácido KALNRQAGV AA [SEQ ID NO: 26]. De acordo com outra modalidade, o domínio terapêutico do

peptídeo inibidor terapêutico é um domínio tendo a sequência de aminoácido KALNRQLA VAA [SEQ ID NO: 27]. De acordo com outra modalidade, o domínio terapêutico do peptídeo inibidor terapêutico é um domínio tendo a sequência de aminoácido KALNRQLGA AA [SEQ ID NO: 28]. De acordo com

5 outra modalidade, o domínio terapêutico do peptídeo inibidor terapêutico é um domínio tendo a sequência de aminoácido KALNRQLGV A [SEQ ID NO: 29]. De acordo com outra modalidade, o domínio terapêutico do peptídeo inibidor terapêutico é um domínio tendo a sequência de aminoácido KKKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 30]. De acordo com outra modalidade, o domínio terapêutico do peptídeo inibidor terapêutico é um domínio tendo a sequência de aminoácido KA ANRQLG V AA [SEQ ID NO: 22]. De acordo com outra modalidade, o domínio terapêutico do peptídeo inibidor terapêutico é um domínio tendo a sequência de aminoácido KALNAQLGV AA [SEQ ID NO: 24]. De acordo com outra modalidade, o domínio terapêutico do peptídeo inibidor terapêutico

10 é um domínio tendo a sequência de aminoácido KALNRQAGV AA [SEQ ID NO: 26]. De acordo com outra modalidade, o domínio terapêutico do peptídeo inibidor terapêutico é um domínio tendo a sequência de aminoácido KALNRQLG AAA [SEQ ID NO: 28]. De acordo com outra modalidade, o domínio terapêutico do peptídeo inibidor terapêutico é um domínio tendo a sequência de aminoácido KALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 13]. De acordo com outra modalidade, o domínio terapêutico do peptídeo inibidor terapêutico é um domínio tendo a sequência de aminoácido KALARQLGV AA [SEQ ID NO: 23]. De acordo com outra modalidade, o domínio terapêutico do peptídeo inibidor terapêutico é um domínio tendo a sequência de aminoácido KALNRALGV AA [SEQ ID NO: 25]. De acordo com outra modalidade, o domínio terapêutico do peptídeo inibidor terapêutico é um domínio tendo a sequência de aminoácido KALNRQLA VAA [SEQ ID NO: 27].

20

25

De acordo com outra modalidade, o domínio de transdução de proteína do inibidor de peptídeo quinase terapêutico é um domínio tendo

30 identidade substancial com a sequência de aminoácido WLRRIKA WLRRIKA [SEQ ID NO: 31].

De acordo com outra modalidade, o domínio de transdução de

proteína do inibidor de peptídeo quinase terapêutico é um domínio tendo identidade substancial com a sequência de aminoácido WLRIKA WLRI [SEQ ID NO: 34].

De acordo com outra modalidade, o PTD do inibidor de peptídeo
5 quinase terapêutico é um domínio tendo a sequência de aminoácido WLRIKA WLRIK A [SEQ ID NO: 31]. De acordo com outra modalidade, PTD do inibidor de peptídeo quinase terapêutico é um domínio tendo a sequência de aminoácido WLRIKA [SEQ ID NO: 32]. De acordo com outra modalidade, o PTD do inibidor de peptídeo quinase terapêutico é um domínio tendo a
10 sequência de aminoácido YARAAARQARA [SEQ ID NO: 5]. De acordo com outra modalidade, o PTD do inibidor de peptídeo quinase terapêutico é um domínio tendo a sequência de aminoácido YGRKKRRQRRR [SEQ ID NO: 33]. De acordo com outra modalidade, o PTD do inibidor de peptídeo quinase terapêutico é um domínio tendo a sequência de aminoácido WLRIKA
15 WLRI [SEQ ID NO: 34]. De acordo com outra modalidade, o PTD do inibidor de peptídeo quinase terapêutico é um domínio tendo a sequência de aminoácido FAKLAARL YR [SEQ ID NO: 35]. De acordo com outra modalidade, o PTD do inibidor de peptídeo quinase terapêutico é um domínio tendo a sequência de aminoácido KAF AKLAARL YR [SEQ ID NO: 36]. De acordo
20 com outra modalidade, o PTD do inibidor de peptídeo quinase terapêutico é um domínio tendo a sequência de aminoácido YARAAARQARA [SEQ ID NO: 5]. De acordo com outra modalidade, o PTD do inibidor de peptídeo quinase terapêutico é um domínio tendo a sequência de aminoácido FAKLAARL YRKA [SEQ ID NO: 43]. De acordo com outra modalidade, o PTD
25 do inibidor de peptídeo quinase terapêutico é um domínio tendo a sequência de aminoácido KAFAKLAARLYRKA [SEQ ID NO: 44].

De acordo com outra modalidade, o peptídeo inibidor terapêutico é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido WLRIKAWLRIKALNR-QLGVAA [SEQ ID NO: 14]. De acordo com outra modalidade, o peptídeo
30 inibidor terapêutico é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido FAKLAARL YRKALARQLGV AA [SEQ ID NO: 12]. De acordo com outra modalidade, o peptídeo inibidor terapêutico é um peptídeo tendo a sequência de

aminoácido KAF AKLAARL YRKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 15]. De acordo com outra modalidade, o peptídeo inibidor terapêutico é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido Y ARAA ARQ ARAKAL ARQL GVAA [SEQ ID NO: 11]. De acordo com outra modalidade, o peptídeo inibidor terapêutico é

5 um peptídeo tendo a sequência de aminoácido YARAAARQARAKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 16]. De acordo com outra modalidade, o peptídeo inibidor terapêutico é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido YARA-AARGQRAKALARQLAVA [SEQ ID NO: 17]. De acordo com outra modalidade, o peptídeo inibidor terapêutico é um peptídeo tendo a sequência de

10 aminoácido YARAAARGQRAKALARQLGVA [SEQ ID NO: 18]. De acordo com outra modalidade, o peptídeo inibidor terapêutico é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido YARAAARGQRAKALNRQLAVA [SEQ ID NO: 19]. De acordo com outra modalidade, o peptídeo inibidor terapêutico é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido YARAAARGQRAKALNRQLGVA

15 [SEQ ID NO: 20]. De acordo com outra modalidade, o peptídeo inibidor terapêutico é um peptídeo tendo a sequência de aminoácido de YARAAARGQRAKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 21].

De acordo com outra modalidade, a composição de inibição de quinase também compreende um veículo farmaceuticamente aceitável.

20 De acordo com outra modalidade, a composição de inibição de quinase é administrada parenteralmente. De acordo com outra modalidade, a composição de inibição de quinase é administrada através de um dispositivo biomédico compreendendo pelo menos um peptídeo inibidor terapêutico isolado, onde o um ou mais peptídeos inibidores terapêuticos isolados são

25 dispostos sobre ou dentro do dispositivo. Em algumas tais modalidades, o pelo menos um peptídeo inibidor terapêutico é pelo menos um peptídeo tendo uma sequência de aminoácido selecionada do grupo consistindo em

WLRIKA WLRIKALNRQLGV AA

[SEQ ID NO: 14], FAKLAARLYRKALARQLGVAA

30 [SEQ ID NO: 12], KAFKLAARLYRKALARQLGVAA

[SEQ ID NO: 15], YARAAARQARAKALARQLGVAA

[SEQ ID NO: 11], YARAAARQARAKALNRQLGVAA

[SEQ ID NO: 16], YARAAARGQRAKALARQLAVA
 [SEQ ID NO: 17], YARAAARGQRAKALARQLGVA
 [SEQ ID NO: 18], YARAAARGQRAKALNRQLAVA
 [SEQ ID NO: 19], YARAAARGQRAKALNRQLGVA
 5 [SEQ ID NO: 20] e YARAAARGQRAKALNRQLGVAA
 [SEQ ID NO: 21].

Os métodos gerais em genéticos moleculares engenharia genética úteis na presente invenção são descritos nas edições atuais de Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Sambrook, e outros, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press), Gene Expression Technology (Methods in Enzymology, Vol. 185, editado por D. Goeddel, 1991. Academic Press, San Diego, CA), "Guide to Proteína Purification" in Methods in Enzymology (M.P. Deutshcer, ed., (1990) Academic Press, Inc.); PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis, e outros 1990. Academic Press, San Diego, CA), Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique, 2nd Ed, (R.I. Freshney. 1987. Liss, Inc. New York, NY), e Gene Transfer and Expression Protocols, pp. 109-128, ed. E.J. Murray, The Humana Press Inc., Clifton, N.J.). Reagentes, vetores de clonagem, e kits para manipulação genética estão disponíveis a partir de vendedores comerciais tais como BioRad, Stratagene, Invitrogen, ClonTech and Sigma-Aldrich Co.

Onde um valor de faixas é fornecido, é entendido que cada valor intermediário, para o décimo da unidade do limite inferior a menos que o contexto claramente dite de outro modo, entre o limite superior e inferior de tal faixa e qualquer outro estado ou valor intermediário em tal faixa declarada é abrangido na invenção. Os limites superior e inferior destas faixas menores que podem independente ser incluídos nas faixas menores são também abrangidos na invenção, são submetidos a qualquer limite especificamente excluído na faixa declarada. Onde a faixa declarada inclui um ou ambos dos limites, faixas excluindo ambos destes limites incluídos são também incluídas na invenção.

A menos que definido de outro modo, os termos técnicos e científicos utilizados aqui têm os mesmos significados como geralmente entendido

por alguém comumente versado na técnica a qual esta invenção pertence. Embora qualquer método e materiais similares ou equivalentes àqueles descritos aqui possa ser utilizado na prática ou teste da presente invenção, métodos e materiais preferidos são agora descritos. Todas as publicações mencionadas aqui são incorporadas aqui por referência para divulgar e descrever os métodos e/ou materiais junto com os quais as publicações são citadas.

Deve ser notado que como utilizado aqui e nas reivindicações anexas, as formas singulares "um, uma ", "um, uma ", "e" e "o, a", incluem referências plurais a menos que o contexto claramente dite de outro modo.

10 Todos os termos técnicos e científicos utilizados aqui têm o mesmo significado.

As publicações descritas aqui são fornecidas somente para sua descrição antes da data de depósito da presente invenção. Nada aqui é para ser considerado como uma admissão que a presente invenção não é intitulada para preceder tal publicação em virtude da invenção anterior. Além disso, as datas de publicação fornecidas podem ser diferentes das datas de publicação atuais que podem precisar ser confirmadas independentemente.

EXEMPLOS

Os seguintes exemplos são apresentados para fornecer aqueles de experiência ordinária na técnica com uma descrição completa de como fazer e utilizar a presente invenção, e não é pretendido limitar o escopo do que os inventores consideram como sua invenção nem eles pretendem representar que os experimentos abaixo são todos ou os experimentos somente realizados. Esforços foram feitos para garantir a precisão com respeito aos números utilizados (por exemplo, quantidades, temperatura, etc.), porém alguns erros e desvios experimentais devem ser considerados. A menos que indicado de outro modo, partes são partes em peso, peso molecular é peso molecular médio ponderado, temperatura é em graus Centígrados, e pressão é em ou próxima da atmosférica.

Métodos

Síntese e Purificação de Peptídeo

Os peptídeos foram sintetizados em resina Rink-amida ou Knorr-

amida (Synbiosci Corp.) utilizando química FMOC padrão em um Sintetizador de Peptídeo Symphony® (Protein Technologies, Inc.). O reagente de acoplamento para os aminoácidos (Synbiosci Corp.) foi hexafluorofosfato de 2-1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio/maleimida de N-metila (HBTU/NMM). Em seguida a síntese, o peptídeo foi clivado da resina com um coquetel com base em ácido trifluoroacético, precipitado em éter, e recuperado por centrifugação. O peptídeo recuperado foi secado em vácuo, ressuspenso em água purificada de MilliQ, e purificado utilizando uma cromatografia líquida de proteína rápida (FPLC)(AKTA Explorer, GE Healthcare) equipado com uma coluna prep.-escala 22/250 CI 8 (Grace Davidson). Um gradiente de acetonitrila com uma concentração constante de 0,1% de ácido trifluoroacético ou 0,1% de ácido acético foi utilizado para obter purificação. O peso molecular desejado foi confirmado por espectrometria de massa de desabsorção / ionização a laser assistida por matriz de tempo de trajetória utilizando um Analisador de MALDI TOF/TOFTM 4800 Plus (Applied Biosystems).

Exemplo 1. Determinação de Aminoácidos Essenciais de Peptídeos Inibidores Terapêuticos de MK2

Os aminoácidos essenciais de peptídeos inibidores terapêuticos de MK2 foram identificados utilizando substituições de aminoácido Ala e D. 100 µM de KALNRQLGV AA [SEQ ID NO: 13] inibiu 73% de atividade de MK2. Primeiro, cada aminoácido no domínio terapêutico (KALNRQLGV AA) [SEQ ID NO: 13] independentemente foi substituído com Ala. Em seguida, cada aminoácido no domínio terapêutico do peptídeo independentemente foi substituído com seu D-aminoácido.

Ensaio da Atividade de Quinase com Base em Fluorescência

O ensaio de quinase de Omnia® para o kit MAPKAP-K2 (Invitrogen, Carlsbad, CA), foi utilizado para determinar a velocidade da reação para MK2 na presença e ausência de cada dos peptídeos listados na tabela 1. O kit contém um tampão de reação proprietário aos quais os seguintes foram adicionados (concentrações finais são determinadas): ATP a 1 mM, DTT a 0,2 mM, peptídeo substrato modificado por MAPKAP-K2 Sox a 10 µM, 5 ng de MK2, e o peptídeo inibidor de interesse (volume final de 50 µL). MK2

humano foi adquirido de Invitrogen. As reações foram realizadas a 30 °C nos poços de uma placa de 96 poços de baixa ligação de proteína fornecida com o kit, e leituras de fluorescência (excitação = 360 nm, emissão = 485 nm) foram tomadas a cada 30 segundos durante 20 minutos utilizando um

5 Espectrofotômetro SpectraMax M5 (Molecular Devices). A velocidade da reação foi determinada para cada cavidade de reação da declividade de um plot de unidades de fluorescência relativa *versus* tempo. Cada peptídeo inibidor foi testado pelo menos em quatro concentrações, 12,5, 25, 50 e 100 µmol, em triplicada.

10 Na **Tabela 1**, "a" representa que os resultados mostrados são para 100 µM para todos os peptídeos; "b" representa o percentual de alteração em MK2 na velocidade de reação *versus* o peptídeo não substituído (KALNRQLGV AA) [SEQ ID NO: 13] em uma concentração de 100 µM; "c" representa o erro reportado como o desvio-padrão entre as três amostras.

15 **Tabela 1.** Peptídeos testados em ensaio de atividade de quinase com base em fluorescência

Peptídeo Inibidor Testado ^a	% of KALNRQLGVAA ^b [SEQ ID NO: 13] Velocidade de Reação (+VoSD) ^c	SEQ ID NO:
substituições de alanina		
KAANRQLGVAA	+52(6)	22
KALARQLGVAA	-61(2)	23
KALNAQLGVAA	+258(14)	24
KALNRQLGVAA	+258(26)	13
KALNRQAGVAA	+18(7)	26
KALNRQLAVAA	-28(5)	27
KALNRQLGAAA	+273(22)	28
substituições de p-aminoácido		
KAdLNRQLGVAA	46(7)	***
KALdNRQLGVAA	-5(10)	***
KALNdRQLGVAA	+206(7)	***
KALNRdQLGVAA	+176(5)	***
KALNRQdLGVAA	+257(17)	***
KALNRQLGdVAA	+160(23)	***
outras modificações		
KALNRQLGVA	0(5)	29
KKKALNRQLGVAA	-9(8)	30
WLRRIKAWLRRIKALNRQLGV	-132(10)	47
domínio de peptídeo de penetração de célula		
WLRRIKA (não funcional)	4306(21)	32
WLRRIKAWLRRIKA	-83(4)	31
YGRKKRRQRRR	+44(17)	33
YARAAARQARA	+149(13)	5

As varreduras de D-aminoácido e Ala mostraram que o Asn não foi essencial para inibição de MK2 (vide, tabela 1, figura 3 e figura 4).

Figura 3 mostra um plot de velocidade de reação (unidade/segundo de fluorescência) (RFLVs)) *versus* concentração de peptídeo inibidor MK2 (μM) onde os peptídeos inibidores incorporam as substituições de alanina. A substituição do Asp e Ala realçou a inibição de MK2. A substituição de Ala para Gly levemente aumentou a inibição. A varredura de Ala também mostrou que Arg, Gln ed Val foram essenciais para a inibição de MK2. Embora os dois Leu tenham sido aminoácidos menos essenciais, sua remoção diminuiu a eficácia do peptídeo inibidor terapêutico.

Figura 4 mostra um plot de velocidade de reação (RFU/s) *versus* concentração de peptídeo inibidor MK2 (μM) onde os peptídeos inibidores incorporam as substituições de aminoácido D. Nenhuma substituição de aminoácido D substancialmente realçou a inibição de MK2; a maioria das substituições de aminoácido D substancialmente diminuiu a eficácia do peptídeo inibidor MK2.

Figura 5 mostra um plot de velocidade de reação (RFU/s) *versus* concentração de peptídeo inibidor MK2 (μM) onde o peptídeo inibidor foi modificado. Tabela 1 e figura 5 mostram que a inibição de MK2 não foi realçada pelo Ala de terminal de C (100 μM) e a inibição foi levemente aumentada por dois Lys adicionais no peptídeo inibidor. Entretanto, a inibição de MK2 é diminuída, em concentrações menores de peptídeo inibidor, sob remoção do Ala de terminal de C ou adição de dois Lys de terminal de N.

Exemplo 2. Inibição por PTD de MK2

A inibição de MK2 por PTDs foi demonstrada utilizar três PTDs :
1) WLRRIKAWLRRIKA [SEQ ID NO: 31]; 2) YGRKKRRQRRR [SEQ ID NO: 33]; e 3) YARAAARQARA [SEQ ID NO: 5].

Figura 6 mostra um plot de velocidade de reação (RFU/s) *versus* concentração de inibidor de MK2 (μM) onde o peptídeo inibidor é um domínio de transdução de proteína. A tabela 1 e figura 4 mostram que a inibição de MK2 foi menos afetada por peptídeo de PTD YARAAARQARA [SEQ ID NO: 5] independente da concentração de peptídeo de PTD. A atividade de

MK2 foi inibida por peptídeo de PTD YGRKKRRQRRR [SEQ ID NO: 33] através de uma ampla faixa de concentração de peptídeo de PTD (de 61% de inibição em 100 μ M de PTD a 48% de inibição em PTD a 25 μ M). MK2 foi potencialmente inibido pelo peptídeo de PTD WLRRKAWLRRRIKA [SEQ ID NO: 31]; este peptídeo de PTD forneceu inibição mais elevada de MK2 do que os peptídeos de domínio terapêuticos. Tabela 1 também mostra a combinação do peptídeo de PTD WLRRKAWLRRRIKA [SEQ ID NO: 31] e o domínio terapêutico KALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 13] fornece um efeito inibidor sinérgico.

10 **Exemplo 3. Modificações para o Domínio Terapêutico afeta IC₅₀**

O domínio terapêutico dos peptídeos inibidores terapêuticos foi modificado para afetar o valor de IC₅₀. Os peptídeos inibidores terapêuticos modificados então foram analisados com ensaios radiométricos.

Determinação de Atividade de Quinase e IC₅₀ Radiométrico

15 Um serviço de ensaio radiométrico comercial (Millipore, Billerica, MA) foi utilizado para testar a especificidade e potência de peptídeos contendo um domínio de transdução acoplado e domínio terapêutico, a seguir "peptídeos completos". Nestes ensaios, se a quinase não é inibida por um peptídeo inibidor, um substrato positivamente carregado é fosforilado com
20 um grupo de fosfato radiorrotulado de um ATP. O substrato positivamente carregado é preso a uma membrana de filtro negativamente carregada, quantificado com um contador de cintilação, e comparado com um controle de atividade de 100%. As concentrações de ATP em 15 μ M do K_m evidente para ATP foram escolhidas uma vez que uma concentração de ATP próxima
25 de K_m pode permitir que as quinases tenham a mesma quantidade relativa de atividade de fosforilação.

Tabela 2. Mostra as composições de tampão para as quinases incluídas na tela; (h) = humano, (m) = camundongo, (r) = rato, e (y) = levedura.

Composição de tampão	Quinase(s)
180 mM HEPES, 3.6 mM DTT, 0.07% Brij-35	AMPK (r)
20 mM HEPES, 0.03% Triton X-100	PKC β I (h), PKC δ (h)
20 mM MOPS, 1 mM EDTA, 0.01% Brij-35, 5% Glicerol, 0.1% de β -mercaptoetanol, 1 mg/mL BSA	Abl (h), Aurora-A (h), BTK (h), CaMKI (h), CDK1/cyclinB (h), CHK1 (h), CHK2 (h), CK1 δ (h), c-Kit (h), DYRK2 (h), EGFR (h), EphA2 (h), FGFR1 (h), GSK3 β (h), IRAK4 (h), JAK3 (h), KDR (h), Lck (h), LIMK1 (h), Met (h), MLCK (h), PDGFR β (h), PhK γ 2 (h), Pim-1 (h), PKA (h), PKB β (h), PKG1 α (h), PKG1 β (h), Ret (h), ROCK-I (h), Rsk2 (h), Src (1-530) (h), Tie2 (h), TrkA (h),
25 mM TRIS, 0.1 mM EGTA, 0.1% β -mercaptoetanol, 1 mg/mL BSA	MEK1 (h)
50 mM Na- β -glicerofosfato, 0.1 mM EGTA, 0.1% de β -mercaptoetanol, 1 mg/mL BSA	PRAK (h)
50 mM TRIS, 0.1 mM EGTA, 0.1 mM Na ₃ VO ₄ , 0.1% de β -mercaptoetanol, 1 mg/mL BSA	IGF-1R (h), MAPK1 (h), SAPK2a (h), Syk (h)

Os protocolos para cada ensaio quinase são com segue:

5 (1) Abl (h)

Em um volume de reação final de 25 μ L, Abl (h) (5-10 mU) é incubado com MOPS a 8 mM pH 7,0, EDTA a 0,2 mM, EAIYAAPF AKKK (SEQ ID NO: 48) a 50 μ M, Acetato de Mg a 10 mM e [γ -³³P-ATP] (atividade específica aproximadamente 500 cpm/pmol, concentração como requerido).

- 10 A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Pós a incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 μ L de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 μ L da reação são em seguida manchados em um esteira de filtroP30 e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 75 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.
- 15

(2) AMPK (r)

Em um volume de reação final de 25 μ L, AMPK (r) (5- 10 mU) é incubado com HEPES a 32 mM pH 7,4, DTT a 0,65 mM, 0,012% de Brij-35, AMP a 200 μ M, AMARAASAAALARRR (SEQ ID NO: 49) a 200 μ M, Acetato de Mg a 10 mM e [γ -³³P-ATP] (atividade específica aproximada 500 cpm/pmol, concentração como requerido). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após a incubação durante 40 minutos em temperatura

20

ambiente, a reação é parada pela adição de 5 µL de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 µL da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro P30 e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 75 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.

5 **(3) Aurora-A (h)**

Em um volume de reação final de 25 µL, Aurora-A (h) (5-10 mU) é incubado com MOPS 8 mM pH 7,0, EDTA a 0,2 mM, LRRASLG (SEQ ID NO: 50) a 200 µM (Kemptide), Acetato de Mg a 10 mM e [γ -³³P~ATP] (atividade específica aproximada 500 cpm/ pmol, concentração quando requeri-
da). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 µL de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 µL da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro P30 e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 50 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.

(4) BTK (h)

Em um volume de reação final de 25 µL, BTK (h) (5-10 mU) é incubado com MOPS a 8 mM pH 7,0, EDTA a 0,2 mM, KVEKIGEGTYGVVYK (SEQ ID NO: 51) a 250 µM (Cdc2 peptídeo), Acetato de Mg a 10 mM ed
[γ -³³P-ATP] (atividade específica aproximada 500 cpm/pmol, concentração quando requerida). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 µL de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 µL da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro P30 e lava-
dos três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 75 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.

(5) CaMKI (h)

Em um volume de reação final de 25 µL, CaMKI (h) (5-10 mU) é incubado com MOPS a 8 mM pH 7,0, EDTA a 0,2 mM, CaCl₂ a 0,5 mM, 16 µg/mL de calmodulina, KKLNRTLSFAEPG (SEQ ID NO: 52) a 250 µM, Ace-
tato de Mg a 10 mM e [γ -³³P-ATP] (atividade específica aproximada 500 cpm/pmol, concentração quando requerida). A reação é iniciada pela adição

da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 µL de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 µL da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro P30 e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 75 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.

(6) CDKI/ciclinB (h)

Em um volume de reação final de 25 µL, CDKI/ciclinB (h) (5-10 mU) é incubado com MOPS a 8 mM pH 7,0, EDTA a 0,2 mM, 0,1 mg/mL de histona H1, Acetato de Mg a 10 mM e [γ -³³P-ATP] (atividade específica aproximada 500 cpm/ pmol, concentração quando requerida). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 µL de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 µL da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro P30 e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 75 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.

(7) CHKI (h)

Em um volume de reação final de 25 µL, CHKI (h) (5-10 mU) é incubado com MOPS a 8 mM pH 7,0, EDTA a 0,2 mM, KKKVSRSGLYRSPSPENLNRP (SEQ ID NO: 53) a 200 µM, Acetato de Mg a 10 mM e [γ -³³P-ATP] (atividade específica aproximada, 500 cpm/pmol, concentração quando requerida). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 µL de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 µL da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro P30 e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 75 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.

(8) CK 1δ (h)

Em um volume de reação final de 25 µL, CK1 δ (h) (5-10 mU) é incubado com MOPS a 8 mM pH 7,0, EDTA a 0,2 mM, KRR-RALS(p)VASLPGL (SEQ ID NO: 54) a 200 µM, Acetato de Mg a 10 mM e [γ -³³P-ATP] (atividade específica aproximada 500 cpm/pmol, concentração

quando requerida). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 µL de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 µL da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro P30 e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 75 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.

(9) CK2 (h)

Em um volume de reação final de 25 µL, CK2 (h) (5-10 mU) é incubado com HEPES a 20 mM pH 7,6, NaCl a 0,15 M, EDTA a 0,1 mM, DTT a 5 mM, 0,1% de Triton X-100, RRRDDDSDDD (SEQ ID NO: 55) a 165 µM, Acetato de Mg a 10 mM e [γ-³³P-ATP] (atividade específica aproximada 500 cpm/pmol, concentração quando requerida). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 µL de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 µL da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro P30 e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 75 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.

(10) c-Kit (h)

Em um volume de reação final de 25 µL, c-Kit (h) (5-10 mU) é incubado com MOPS a 8 mM pH 7,0, EDTA a 0,2 mM, MnCl₂ a 10 mM, 0,1 mg/mL de poli(Glu, Tyr) 4: 1, Acetato de Mg a 10 mM e [γ-³³P-ATP] (atividade específica aproximada 500 cpm/pmol, concentração quando requerida). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 µL de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 µL da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro A e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 75 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.

(11) DYRK2 (h)

Em um volume de reação final de 25 µL, DYRK2 (h) (5-10 mU) é incubado com MOPS a 8 mM pH 7,0, EDTA a 0,2 mM, 2 mg/mL de caseína, Acetato de Mg a 10 mM e [γ-³³P-ATP] (atividade específica aproximada 500

cpm/ pmol, concentração quando requerida). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 µL de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 µL da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro P30 e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 75 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.

(12) EGFR (h)

Em um volume de reação final de 25 µL, EGFR (h) (5-10 mU) é incubado com MOPS a 8 mM pH 7,0, EDTA a 0,2 mM, MnCl₂ a 10 mM, 0,1 mg/mL de poli(Glu, Tyr) 4:1, Acetato de Mg a 10 mM e [γ-³³P-ATP] (atividade específica aproximada 500 cpm/pmol, concentração quando requerida). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 µL de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 µL da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro A e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 75 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.

(13) EphA2 (h)

Em um volume de reação final d 25 µL, EphA2 (h) (5-10 mU) é incubado com MOPS a 8 mM pH 7,0, EDTA a 0,2 mM, 0,1 mg/mL poli(Glu, Tyr) 4:1, Acetato de Mg a 10 mM e [γ-³³P-ATP] (atividade específica aproximada, 500 cpm/ pmol, concentração quando requerida). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 µL de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 µL da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro A e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 75 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.

(14) FGFR1 (h)

Em um volume de reação final de 25 µL, FGFR1 (h) (5-10 mU) é incubado com MOPS a 8 mM pH 7,0, EDTA a 0,2 mM, KKKSPGEYVNIEFG (SEQ ID NO: 56) a 250 µM, Acetato de Mg a 10 mM e [γ-³³P-ATP] (atividade específica aproximada 500 cpm/pmol, concentração quando requerida). A

reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 µL de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 µL da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro P30 e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 75 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.

(15) Flt3 (h)

Em um volume de reação final de 25 µL, Flt3 (h) (5-10 mU) é incubado com MOPS a 8 mM pH 7,0, EDTA a 0,2 mM, EAIYAAPFAKKK (SEQ ID NO: 48) a 50 µM, Acetato de Mg a 10 mM e [γ -³³P-ATP] (atividade específica aproximada 500 cpm/ pmol, concentração quando requerida). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 µL de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 µL da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro P30 e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 75 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.

(16) GSK3β (h)

Em um volume de reação final de 25 µL, GSK3β (h) (5-10 mU) é incubado com MOPS a 8 mM pH 7,0, EDTA a 0,2 mM, YRRAAVPPSPSLS-RHSSPHQS(p)EDEEE (SEQ ID NO: 57) a 20 µM (peptídeo fosfo GS2), Acetato de Mg a 10 mM e [γ -³³P-ATP] (atividade específica aproximada 500 cpm/pmol, concentração quando requerida). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 µL de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 µL da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro P30 e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 50 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.

(17) IGF-IR (h)

Em um volume de reação final de 25 µL, IGF-I R (h) (5-10 mU) é incubado com Tris a 50 mM pH 7,5, EGTA a 0,1 mM, Na₃VO₄ a 0,1 mM, 0,1% de β-mercaptoetanol, KKKSPGEYVNIEFG (SEQ ID NO: 56) a 250 µM,

MnCl₂ a 10 mM, Acetato de Mg a 10 mM e [γ -³³P-ATP] (atividade específica aproximada 500 cpm/ pmol, concentração quando requerida). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 μ L de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 μ L da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro P30 e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 75 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.

(18) IRAK4 (h)

Em um volume de reação final de 25 μ L, IRAK4 (h) (5-10 mU) é incubado com MOPS a 8 mM pH 7,0, EDTA a 0,2 mM, 0,33 mg/mL de proteína básica de mielina, Acetato de Mg a 10 mM e [γ -³³P-ATP] (atividade específica aproximada 500 cpm/ pmol, concentração quando requerida). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 μ L de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 μ L da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro P30 e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 75 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação,

(19) JAK3 (h)

Em um volume de reação final de 25 μ L, JAK3 (h) (5-10 mU) é incubado com MOPS a 8 mM pH 7,0, EDTA a 0,2 mM, GGEEBEY-FELVKKKK (SEQ ID NO: 58) a 500 μ M, Acetato de Mg a 10 mM e [γ -³³P-ATP] (atividade específica aproximada 500 cpm/pmol, concentração quando requerida). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 μ L de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 μ L da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro P30 e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 75 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.

(20) KDR (h)

Em um volume de reação final de 25 μ L, KDR (h) (5-10 mU) é

incubado com MOPS a 8 mM pH 7,0, EDTA a 0,2 mM, 0,33 mg/mL de proteína básica de mielina, Acetato de Mg a 10 mM e [γ - ^{33} P-ATP] (atividade específica aproximada 500 cpm/ pmol, concentração quando requerida). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 μ L de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 μ L da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro P30 e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 75 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.

10 **(21) Lck (h)**

Em um volume de reação final de 25 μ L, Lck (h) (5-10 mU) é incubado com Tris a 50 mM pH 7,5, EGTA a 0,1 mM, Na_3VO_4 a 0,1 mM, KVE-KIGEGTYGVVYK (SEQ ID NO: 51) a 250 μ M (Cdc2 peptídeo), Acetato de Mg a 10 mM e [γ - ^{33} P-ATP] (atividade específica aproximada 500 cpm/pmol, concentração quando requerida). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 μ L de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 μ L da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro P30 e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 75 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.

20 **(22) LIMKI (h)**

Em um volume de reação final de 25 μ L, LIMKI (h) (5-10 mU) é incubado com MOPS a 8 mM pH 7,0, EDTA a 0,2 mM, 0,6 mg/mL de cofilina, Acetato de Mg a 10 mM e [γ - ^{33} P-ATP] (atividade específica aproximada 500 cpm/ pmol, concentração quando requerida). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 μ L de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 μ L da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro P30 e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 75 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.

30 **(23) MAPKI (h)**

Em um volume de reação final de 25 μ L, MAPKI (h) (5-10 mU) é

incubado com Tris a 25 mM pH 7,5, EGTA a 0,02 mM, peptídeo de 250 μ M, Acetato de Mg a 10 mM e [γ - ^{33} P-ATP] (atividade específica aproximada 500 cpm/ pmol, concentração quando requerida). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 μ L de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 μ L da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro P30 e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 75 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação,

(24) MEKI (h)

10 Em um volume de reação final de 25 μ L, MEKI (h) (1-5 mU) é incubado com Tris a 50 mM pH 7,5, EGTA a 0,2 mM, 0,1% de β -mercaptoetanol, 0,01% de Brij-35, 1 μ M de MAPK2 inativo (m), Acetato de Mg a 10 mM e ATP frio (concentração quando requerida). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, 5 μ L desta mistura de incubação é utilizado para iniciar um ensaio de MAPK2 (m).

(25) Met (h)

20 Em um volume de reação final de 25 μ L, Met (h) (5- 10 mU) é incubado com MOPS a 8 mM pH 7,0, EDTA a 0,2 mM, KKKSPGEYVNIEFG (SEQ ID NO: 56) a 250 μ M, Acetato de Mg a 10 mM e [γ - P-ATP] (atividade específica aproximada 500 cpm/pmol, concentração quando requerida). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 μ L de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 μ L da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro P30 e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 75 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.

(26) MLCK (h)

30 Em um volume de reação final de 25 μ L, MLCK (h) (5-10 mU) é incubado com MOPS a 8 mM pH 7,0, EDTA a 0,2 mM, CaCl_2 a 0,5 mM, 16 μ g/mL de calmodulina, 250 μ M de KKLNRTLSFAEPG (SEQ ID NO: 52), Acetato de Mg a 10 mM e [γ - ^{33} P-ATP] (atividade específica aproximada, 500

cpm/pmol, concentração quando requerida). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 µL de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 µL da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro P30 e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 75 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.

(27) PDGFRβ (h)

Em um volume de reação final de 25 µL, PDGFRβ (h) (5-10 mU) é incubado com MOPS a 8 mM pH 7,0, EDTA a 0,2 mM, 0,1 mg/mL de poli(Glu, Tyr) 4:1, MnCl₂ 10 mM, Acetato de Mg a 10 mM e [γ-³³P-ATP] (atividade específica aproximada 500 cpm/pmol, concentração quando requerida). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 µL de uma solução de ácido fosfórico a 3%, 10 µL da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro A e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 75 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.

(28) PhKy2 (h)

Em um volume de reação final de 25 µL, PhKy2 (h) (5-10 mU) é incubado com MOPS a 8 mM pH 7,0, EDTA a 0,2 mM, 250 µM KKLNRSLTSLFAEPG (SEQ ID NO: 52), Acetato de Mg a 10 mM e [γ-³³P-ATP] (atividade específica aproximada 500 cpm/pmol, concentração quando requerida). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 µL de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 µL da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro P30 e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 75 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.

(29) Pim-1 (h)

Em um volume de reação final de 25 µL, Pim-1 (h) (5-10 mU) é incubado com MOPS a 8 mM pH 7,0, EDTA a 0,2 mM, KKRNRSLTV (SEQ ID NO: 59) a 100 µM, Acetato de Mg a 10 mM e [γ-³³P-ATP] (atividade espe-

cífica aproximada 500 cpm/pmol, concentração quando requerida). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 µL de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 µL da reação são em seguida
 5 manchado sem uma esteira de filtro P30 e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 75 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.

(30) PKA (h)

Em um volume de reação final de 25 µL, PKA (h) (5-10 mU) é in-
 10 cubado com MOPS a 8 mM pH 7,0, EDTA a 0,2 mM, LRRASLG (SEQ ID NO: 50) a 30 µM (Kemptide), Acetato de Mg a 10 mM e [γ- P-ATP] (atividade específica aproximada, 500 cpm/pmol, concentração quando requerida). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5
 15 µL de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 µL da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro P30 e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 50 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.

(31) PKBβ (h)

Em um volume de reação final de 25 µL, PKBβ (h) (5-10 mU) é
 20 incubado com MOPS a 8 mM pH 7,0, EDTA a 0,2 mM, GRPRTSSFAEGKK (SEQ ID NO: 60) a 30 µM, Acetato de Mg a 10 mM e [γ-³³P-ATP] (atividade específica aproximada, 500 cpm/pmol, concentração quando requerida). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante
 25 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 µL de uma solução de ácido fosfórico a 3%, 10 µL da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro P30 e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 75 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.

(32) PKCβI (h)

Em um volume de reação final de 25 µL, PKCβI (h) (5-10 mU) é
 30 incubado com HEPES a 20 mM pH 7.4, 0,03% de Triton X-100, CaCl₂ a 0,1

mM, 0,1 mg/mL de fosfatidilserina, 10 µg/mL de diacilglicerol, 0,1 mg/mL de histona H1, Acetato de Mg a 10 mM e [γ -P-ATP] (atividade específica aproximada 500 cpm/pmol, concentração quando requerida). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 µL de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 µL da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro P30 e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 75 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.

10 **(33) PKC δ (h)**

Em um volume de reação final de 25 µL, PKC δ (h) (5- 10 mU) é incubado com HEPES a 20 mM pH 7,4, 0,03% de Triton X-100, 0,1 mg/mL de fosfatidilserina, 10 µg/mL de diacilglicerol, ERMRPRKRQGSVRRRV (SEQ ID NO: 61) a 50 µM, Acetato de Mg a 10 mM e [γ -³³P-ATP] (atividade específica aproximada 500 cpm/pmol, concentração quando requerida). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 µL de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 µL da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro P30 e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 75 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação,

(34) PKG1 α (h)

Em um volume de reação final de 25 µL, PKG 1 α (h) (5- 10 mU) é incubado com MOPS a 8 mM pH 7,0, EDTA a 0,2 mM, cGMP a 10 µM, RRRLSFAEPG (SEQ ID NO: 62) a 200 µM, Acetato de Mg a 10 mM e [γ -³³P-ATP] (atividade específica aproximada 500 cpm/ pmol, concentração quando requerida). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 µL de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 µL da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro P30 e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 75 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.

(35) PKGI β (h)

Em um volume de reação final de 25 μ L, PKGI β (h) (5-10 mU) é incubado com MOPS a 8 mM pH 7,0, EDTA a 0,2 mM, cGMP a 10 μ M, RRRLSFAEPG (SEQ ID NO: 62) a 200 μ M, Acetato de Mg a 10 mM e [γ -³³P-ATP] (atividade específica aproximada 500 cpm/ pmol, concentração quando requerida). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 μ L de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 μ L da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro P30 e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 75 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.

(36) Ret (h)

Em um volume de reação final de 25 μ L, Ret (h) (5-10 mU) é incubado com MOPS a 8 mM pH 7,0, EDTA a 0,2 mM, KKKSPGEYVNIEFG (SEQ ID NO: 56) a 250 μ M, Acetato de Mg a 10 mM e [γ -³³P-ATP] (atividade específica aproximada 500 cpm/pmol, concentração quando requerida). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 μ L de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 μ L da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro P30 e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 75 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.

(37) ROCK-I (h)

Em um volume de reação final de 25 μ L, ROCK-I (h) (5-10 mU) é incubado com MOPS a 8 mM pH 7,0, EDTA a 0,2 mM, KEAKEKRQEQIA-KRRRLSSLRASTSKSGGSQK (SEQ ID NO: 63) a 30 μ M, Acetato de Mg a 10 mM e [γ -³³P-ATP] (atividade específica aproximada 500 cpm/pmol, concentração quando requerida). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 μ L de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 μ L da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro P30 e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 75 mM e

uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação,

(38) Rsk2 (h)

Em um volume de reação final de 25 µL, Rsk2 (h) (5-10 mU) é incubado com MOPS a 8 mM pH 7,0, EDTA a 0,2 mM, KKKNRTLSPA (SEQ ID NO: 64) a 30 µM, Acetato de Mg a 10 mM e [γ -³³P-ATP] (atividade específica aproximada 500 cpm/pmol, concentração quando requerida). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 µL de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 µL da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro P30 e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 75 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.

(39) SAPKa (h)

Em um volume de reação final de 25 µL, SAPK2a (h) (5-10 mU) é incubado com Tris a 25 mM pH 7,5, EGTA a 0,02 mM, 0,33 mg/mL de proteína básica de mielina, Acetato de Mg a 10 mM e [γ -³³P-ATP] (atividade específica aproximada 500 cpm/ pmol, concentração quando requerida). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 µL de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 µL da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro P30 e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 75 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.

(40) SRC (1-530) (h)

Em um volume de reação final de 25 µL, SRC (1-530) (h) (5-10 mU) é incubado com MOPS a 8 mM pH 7,0, EDTA a 0,2 mM, GGEEEEY-FELVKKKK (SEQ ID NO: 58) a 500 mM, Acetato de Mg a 10 mM e [γ -³³P-ATP] (atividade específica aproximada 500 cpm/ pmol, concentração quando requerida). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 µL de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 µL da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro P30 e lavados três

vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 75 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.

(41) Syk (h)

Em um volume de reação final de 25 μ L, Syk (h) (5-10 mU) é incubado com Tris a 50 mM pH 7,5, EGTA a 0,1 mM, Na_3VO_4 a 0,1 mM, 0,1% de β - mercaptoetanol, 0,1 mg/ mL de poli(Glu, Tyr) 4:1, Acetato de Mg a 10 mM e [γ - ^{33}P ATP] (atividade específica aproximada 500 cpm/pmol, concentração quando requerida). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 μ L de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 μ L da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro A e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 75 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.

(42) Tie2 (a)

Em um volume de reação final de 25 μ L, Tie2 (h) (5-10 mU) é incubado com MOPS a 8 mM pH 7,0, EDTA a 0,2 mM, MnCl_2 a 0,5 mM, 0,1 mg/mL de poli(Glu, Tyr) 4:1, Acetato de Mg a 10 mM e [γ - ^{33}P -ATP] (atividade específica aproximada 500 cpm/pmol, concentração quando requerida). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 μ L de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 μ L da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro A e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 75 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.

(43) TrkA (h)

Em um volume de reação final de 25 μ L, TrkA (h) (5-10 mU) é incubado com MOPS a 8 mM pH 7,0, EDTA a 0,2 mM, KKKSPGEYVMEFG (SEQ ID NO: 56) 250 μ M, Acetato de Mg a 10 mM e [γ - ^{33}P -ATP] (atividade específica aproximada 500 cpm/pmol, concentração quando requerida). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP. Após incubação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 μ L de uma solução de ácido fosfórico a 3%. 10 μ L da reação são em segui-

da manchados em uma esteira de filtro P30 e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 75 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.

(44) PRAK (h)

5 Em um volume de reação final de 25 μ L, PRAK (h) (5- 10 mU) é incubado com Na β -glicerofosfato a 50 mM pH 7,5, EGTA a 0,1 mM, KKLR-RTLSVA (SEQ ID NO: 65) Aa 30 μ M, Acetato de Mg a 10 mM e [γ - ^{33} P-ATP] (atividade específica aproximada 500 cpm/pmol, concentração quando re-

10 bação durante 40 minutos em temperatura ambiente, a reação é parada pela adição de 5 μ L de uma solução de ácido fosfórico a 3%, 10 μ L da reação são em seguida manchados em uma esteira de filtro P30 e lavados três vezes durante 5 minutos em ácido fosfórico a 50 mM e uma vez em metanol antes da secagem e contagem de cintilação.

15 Os valores de IC₅₀ para inibidores de peptídeo foram determinados utilizando o serviço Millipore's IC β oProfiler Express. O valor de IC₅₀ foi estimado de uma curva de 10 pontos de diluições de meio log. Para peptídeos testados para especificidade, a concentração dos peptídeos que inibiram aproximadamente 95% da atividade de MK2 foi escolhido para perfil

20 contra uma bateria de quinases relacionadas com MK2, viabilidade de célula, ou doença humana de serviço de Milliporequinase/Vo/z/er. Em ambos os ensaios, os compostos foram fornecidos em sulfóxido de dimetila (DMSO). A cada atividade de quinase a medição foi conduzida em duplicata.

A figura 1 mostra curvas e valores de IC₅₀ para variantes de peptídeo inibidor terapêutico com o mesmo PTD (Y ARAAARGQ ARA) [SEQ ID NO: 37] comparado com o Peptídeo de PTD independente YARAAARGQ ARA [SEQ ID NO: 37] e o peptídeo de domínio terapêutico independente KKKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 30]. Todas as variantes de peptídeo inibidor terapêutico demonstraram os valores de IC₅₀ menores do que o peptídeo

30 de domínio terapêutico KKKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 30]. A substituição de Asn para Ala e/ou substituição de Gly para Ala produziu alterações menores nos valores de IC₅₀ para o peptídeo inibidor terapêutico. Remoção do Ala

Tabela 4. Efeito de Peptídeos Permeantes de célula em 43 quinases diferentes.

Sequência de Peptídeo	WLRRKAWLRRI- SEQ ID NO: 30	WLRRKAWLRRI- SEQ ID NO: 30	KAFAKLAARL SEQ ID NO: 66
Concentração:	30	100	100
Quinase	Atividade de quinase (%) (+SD%)		
Abi	24(5)	41(2)	55(0)
AMPK ^c	36(4)	101(6)	118(7)
Aurora-A	46(1)	65(5)	60(1)
BTk	5(0)	19(1)	16(3)
CaMK1	9(1)	0(2)	0(2)
CDK1/ciclin B	17(0)	36(2)	55(3)
CHK 1	31(5)	54(6)	68(0)
CK1 δ	52(1)	99(3)	97(2)
CK2	114(4)	80(14)	79(12)
cKit	23(2)	42(3)	31(6)
DYRK2	93(8)	-11(1)	-10(0)
EGFR	10(4)	18(2)	16(1)
EphA2	38(4)	32(2)	22(7)
FGFR1	27(1)	22(1)	35(1)
F1t3	38(1)	14(0)	20(3)
GSK3 β	129(2)	188(4)	184(1)
JGF-1R	227(12)	69(4)	76(12)
IRAK4	12(1)	13(4)	16(2)
JAK3	85(5)	102(2)	91(8)
KDR	27(0)	78(6)	56(4)
Lck	130(1)	493(7)	847(29)
LIMK1	89(3)	92(2)	93(3)
MAPK1	121(5)	104(3)	108(1)
MEK1	14(2)	68(2)	66(0)
Met	30(1)	17(3)	22(3)
MLCK	4(1)	1(1)	2(0)
PDGFR β	42(4)	92(4)	66(8)
PhK γ 2	15(0)	20(0)	27(3)
Pim-1	5(1)	1(0)	1(2)
PKA	80(1)	76(8)	103(1)
PKB β	18(2)	16(5)	28(4)
PKC β 1	8(4)	73(0)	23(3)
PKC δ	11(0)	40(2)	24(3)
PKG1 α	16(1)	12(2)	25(2)
PKG1 β	15(4)	15(1)	24(5)
Ret	117(2)	89(0)	107(9)
ROCK-1	0(1)	25(2)	29(0)
Rsk2	14(5)	-1(1)	6(1)
SAPK2a	61(7)	30(6)	59(8)
Src (resíduos 1-530)	6(1)	5(1)	3(0)
Syk	19(3)	38(9)	4(4)
Tie2	17(1)	0(0)	8(4)
TrkA	6(1)	17(2)	16(2)

Variantes de peptídeo inibidor terapêutico adicionais foram ensaiados para atividade contra várias quinases humanas representativas de várias famílias de quinase. Estas quinases incluem: MK2; MK3; CaMKI (proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina-); PRAK (p38 proteína quinase regulada/ativada, tam-

bém conhecido como proteína quinase ativada por proteína quinase ativada por mitógeno 5 (MAPKAPK5)); SAPK2a (p38 α); quinase associada com IRAK4 (IL-1 receptor (IL-1R)); MLCK (quinase de cadeia leve de miosina); PKB β (proteína quinase B); PCK δ (proteína quinase C); e ROCK-1 (serina/treonina quinase associada a Rho). A concentração selecionada produziu entre 0-10% de atividade de MK2 com base nos dados de IC₅₀; YARAAARQ ARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 11] pode estar em uma concentração levemente mais elevada, e toda a inibição de quinase pode ser maior do que o esperado para a concentração listada; erro é reportado como o desvio-padrão entre 2 amostras.

10 Tabela 5 mostra diferenças na especificidade entre os peptídeos inibidores terapêuticos, AU do peptídeo inibidor terapêutico inibiu ambos MK2, MK3 e CaMKI. Variantes de peptídeo inibidor terapêutico com Ala substituída para Asn demonstrou maior inibição de CaMKI do que MK2. O peptídeo inibidor terapêutico demonstrou efeito mínimo sobre a atividade de

15 PRAK. Peptídeo FAKLAARL YRKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 12] inibiu a atividade de SAPK2a. O peptídeo inibidor terapêutico WLRRIKAWLRRRIKALNRQLGVAA [SEQ ID NO: 14] demonstrou menos especificidade.

Tabela 5. Efeito de 5 Variantes de Peptídeo Inibidor Completos em 10 Quinases Humanas

seqüência de peptídeo	WLRRIKA WLRRIKAL NRQLGVAA	FAKLAARLY RLARQLGVA A	KFAKLAA RLYRLARQ LGVAA	YARAAARQ ARALARQL GVAA	YARAAA QARALN QLGVAA
SEQ ID NO:	14	39	40	41	42
Concentração de inibidor peptídeo (μ M)	30	100	100	300	300
quinase humana	atividade de quinase				
MK2	2(1)	5(2)	8(1)	-7(0)	10(3)
MK3	16(2)	10(1)	17(1)	5(1)	19(3)
CaMK1	9(1)	0(2)	0(2)	2(0)	8(1)
PRAK	67(9)	131(4)	148(4)	86(2)	81(3)
SAPK2a (p38 α)	61(7)	30(6)	59(8)	66(3)	100(6)
IRAK4	12(1)	13(4)	16(2)	239(2)	68(3)
MLCK	4(1)	1(1)	2(0)	9(0)	66(9)
PKB β	18(2)	16(5)	28(4)	17(2)	96(1)
PKC δ	11(0)	40(2)	24(3)	101(3)	105(2)
ROCK-1	0(1)	25(2)	29(0)	27(4)	95(7)

Os variantes de peptídeo inibidor terapêutico incorporando o peptídeo de PTD YARAAARQARA [SEQ ID NO: 5], porém diferindo em ter Ala substituída para Asn no domínio terapêutico, forneceu maior inibição das quinases IRAK4, PKB β , MLCK, ROCK-I e p38 α do que o variante com a substituição de Asn.

Exemplo 6. Atividade de peptídeo inibidor terapêutico contra interleucina-6 e fator de necrose de tumor- α

A atividade de inibição de peptídeo inibidor terapêutico contra as citocinas Interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose de tumor- α (TNF- α) foi determinada.

6.1. Síntese de Peptídeo

Peptídeos foram sintetizado em resina Rink-amida ou Knorr-amida (Synbiosci Corp., Livermore, CA) utilizando química FMOC padrão em um Symphony® Peptide Synthesizer (Protein Technologies, Inc., Tuscon, AZ). O reagente de acoplamento para os aminoácidos (Synbiosci Corp.) foi HBTU/NMM (Anaspec, Freemont, CA/Sigma, St. Louis, MO). Em seguida à síntese, o peptídeo foi clivado da resina com um coquetel com base em ácido trifluoroacético (95% de ácido trifluoroacético, 2,5% de água, 1,25% de triisopropilsilano, e 1,25% de etanodiol), precipitado em éter, e recuperado por centrifugação. O peptídeo recuperado foi seco em vácuo, ressuspenso em água purificada MilliQ, e purificado utilizando um FPLC (AKTA Explorer, GE Healthcare, Piscataway, NJ) equipado com uma coluna prep.-escala 22/250 CI 8 (Grace Davidson, Columbia, MD). Um ácido acético foi utilizado para obter purificação. O peso molecular desejado foi confirmado pela espectrometria de massa MALDI de tempo de trajetória utilizando um Analisador 4800 Plus MALDI TOF/TOF® (Applied Biosystems, Foster City, CA).

6.2. Tratamento e Cultura de Célula Mesotelial

Uma linhagem celular de células mesoteliais pleurais (CRL-9444) foi adquirida de American Type Culture Collection. As células foram mantidas e semeadas em Meio 199 com Earle's BSS e L-glutamina a 0,75 mM (Mediatech, Inc., Manassa, VA), 1,25 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma, St. Louis, MO), fator de crescimento epidérmico a 3,3 nM (MBL Interna-

tional, Woburn, MA), hidrocortisona a 40 nM (Sigma), insulina a 870 nM (M-BL International), HEPES a 20 mM (Sigma), mistura B de elementos traço (Mediatech, Inc.), 10% de soro bovino fetal (FBS) (Hyclone, Waltham, MA) e 1% de penicilina/estreptomicina (Mediatech, Inc.). Antes do tratamento das

5 células com peptídeo inibidor terapêutico, as células foram permitidas se aclimatar em meios livres de soro consistindo em somente Meio 199 com BSS de Earle. L-glutamina, bicarbonato de sódio, HEPES, mistura de elementos traço B, e penicilina/estreptomicina (concentrações e fornecedores como acima) durante 24 horas antes do tratamento com inibidores de citoci-

10 na e/ou peptídeo. As citocinas com ou sem peptídeo inibidor ou o inibidor de proteína quinase comercialmente disponível Roterlina ($IC_{50}=5 \mu M$) (Tocris Bioscience, Ellisville, MO)) também sempre foram adicionados simultaneamente neste meio de formulação. Para todos os experimentos de cultura de célula, a sequência de peptídeo inibidor MK2 de penetração de célula YA-

15 RAAARQ ARAKALARQLGV AA [SEQ ID NO: 11] foi utilizada.

6.3. Análise de Interleucina-6

Geralmente acredita-se que citocinas proinflamatórias tais como interleucina (IL)-1, IL-6 e fator de necrose de tumor- α (TNF- α) são liberados na cavidade abdominal após cirurgia abdominal. Estas citocinas podem de-

20 sempenhar um papel na formação/reformação de adesão. Estudos reportaram que IL-1 e TNF- α são ambas citocinas pró-inflamatórias importantes na fase inicial de cura de ferida e são produzidos por macrófagos ativados no fluido peritoneal, ao mesmo tempo em que IL-6 é expresso por macrófagos ativados e sua produção é superregulada por IL-1 durante o processo infla-

25 matório. Além disso, estudos reportaram que ambos IL-1 e TNF- α são indutores potentes de IL-6. Estas citocinas são consideradas serem importantes uma vez que elas interagem extensivamente com a série de reação fibrinolítica e pode contribuir diretamente ou indiretamente com a remodelagem da matriz extracelular. Estudos reportaram que ambos IL-1 β e TNF- α super-

30 regulam o nível de expressão de IL-6 e IL-8 em células mesoteliais. Adicionalmente, IL-1 β foi mostrado superregular o nível de expressão de TNF- α , IL-6 e IL-8 em macrófagos. Consequentemente, a quantificação do nível de

expressão de IL-6 induzida por IL-1 β ou TNF- α em células mesoteliais ou macrófagos é utilizada como um sistema de ensaio modelo para determinar a atividade de peptídeo inibidor terapêutico.

- A análise de IL-6 foi realizada com um kit IL-6 ELISA (PeproTech, Inc., Rocky Hill, NJ). Resumidamente, a placa foi preparada como segue. O anticorpo de captura (anti-hIL-6 de cabra purificado por afinidade de antígeno + 2,5 mg de D-manitol) foi diluído com salina tamponada de fosfato (PBS) para uma concentração de 1 μ g/ml e adicionada a cada poço da placa. A placa foi selada e incubada em temperatura ambiente durante a noite.
- Os poços em seguida foram aspirados para remover o líquido, e lavados 4 vezes utilizando tampão de lavagem (300 μ l por poço de 0,05% de Tween-20 em PBS). Após a última lavagem, a placa foi invertida para remover o tampão residual, e secas em uma toalha de papel. O tampão de bloqueio (300 μ l por poço de 1% de BSA em PBS) foi adicionado, a placa incubada durante pelo menos 1 hora em temperatura ambiente, aspirado e lavado 4 vezes.

- Padrões (de 2 ng/ml a zero) e amostras foram preparados em diluente, imediatamente adicionados a cada poço em triplicata, e incubados em temperatura ambiente durante pelo menos 2 horas em um agitador de placa ajustado para 300 rpm. Os poços em seguida foram aspirados, lavados 4 vezes, anticorpo de detecção (anti-hIL-6 de cabra purificada por afinidade de antígeno biotinilado + 2,5 mg de D-manitol; 0,25 μ g/ml) adicionado (100 μ l) a cada poço, e a placa incubada em temperatura ambiente durante 2 horas em um agitador de placa ajustado para 300 rpm. Em seguida a incubação, a placa foi aspirada, lavada 4 vezes, conjugado de rábano picante peroxidase (HRP) adicionado ((5,5 μ l:10994,5 μ l de diluente) (100 μ l) a cada poço, incubado durante 30 minutos em temperatura ambiente em um agitador de placa ajustado para 300 rpm, aspirado, e lavado 4 vezes. A cada poço em seguida foi adicionada Solução de Substrato Líquido ABTS (Sigma) (100 μ l). A placa foi incubada em temperatura ambiente para o desenvolvimento de cor em um agitador de placa ajustado para 300 rpm. A absorção foi medida em 405 nm e 650 nm (650 nm foi a correção de comprimento de

onda subtraído de cada 405 nm de medição) utilizando um Leitor de Microplaca Spectramax M5 (Dispositivo Molecular) a cada 5 minutos durante 50 minutos. A mancha nuclear Hoeschst 33342 (Invitrogen) foi utilizada para quantificar o número de célula na base de quantidade de DNA. Todos os resultados foram executados em triplicata e normalizados para o número de célula.

Resultados são apresentados como média $\pm$ desvio-padrão. As análises de unilaterais ANOVA foram utilizadas para determinar aumentos ou diminuições estatisticamente significantes em parâmetros de interesse. Diferenças significantes foram analisadas com comparações *post hoc* de Tukey HSD. Um nível significance de $\alpha = 0,05$ foi utilizado em análises de citocina.

6.4. Regulação de Expressão de IL-6 com Indução por IL- β

As células mesoteliais foram incubadas com IL- β (1 ng/ml) (para induzir expressão de IL-6) e/ou concentrações diferentes de peptídeo inibidor terapêutico. O Rottlerin inibidor de proteína quinase comercialmente disponível foi introduzido como um inibidor de ambos MK2 e PRAK.

A figura 7 mostra um plot da concentração média de IL-6 (pg/ml/ 10^5 células) contra o tempo. Estes resultados mostram que peptídeo inibidor terapêutico YARAAARQARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 11] inibiu a expressão de IL-6 induzida por IL- β em células mesoteliais. Estes resultados também mostram que a concentração superior do peptídeo inibidor terapêutico YARAAARQ ARAKALARQLGV AA [SEQ ID NO: 11] (3 mM) e Rottlerin (1 μ M) significativamente reduziram a expressão de IL-6 induzida por IL- β . Os resultados também mostram que uma redução significativa de expressão de IL-6 induzida por IL- β pelo peptídeo inibidor terapêutico YARAAARQ ARAKALARQLGV AA [SEQ ID NO: 11] (3 mM) ocorre antes (em 6 horas) do que aqueles provocados por Rottlerin (12 horas).

6.5. Regulação de Expressão de IL-6 com Indução por TNF- α

As células mesoteliais foram incubadas com TNF- α (para induzir expressão de IL-6) e/ou concentrações diferentes de um peptídeo inibidor terapêutico (YARAAARQARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 11] ou FAKLA-

ARLYRKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 12]). O inibidor de proteína quinase comercialmente disponível Rottlerin foi utilizada como um inibidor de MK2.

5 A figura 8 mostra um plot da concentração média de IL-6 (pg/ml/10⁵ células) contra o tempo. Estes resultados mostram que ambos os peptídeos inibidores terapêuticos reduziram o nível de expressão de IL-6 induzida por TNF- α (1 ng/ml) e também sugerem que o efeito dos peptídeos inibidores terapêuticos pode ser dependente da dose. Os resultados também mostram que o inibidor de proteína quinase foi ineficaz na redução do nível de expressão de IL-6 induzida por TNF- α (1 ng/ml),

10 A figura 9 mostra um plot da concentração média de IL-6 (pg/ml/10⁵ células) contra o tempo. Estes resultados mostram que ambos os peptídeos inibidores terapêuticos reduziram o nível de expressão de IL-6 induzida por TNF- α (10 ng/ml) e também sugerem que o efeito dos peptídeos inibidores terapêuticos pode ser dependente da dose. Os resultados
15 também mostram que o inibidor de proteína quinase Rottlerin inicialmente (de 6-12 horas) afetou a redução mínima do nível de expressão de IL-6 induzida por TNF- α (10 ng/ml).

Exemplo 7. Efeito de MK2i na Produção de IL-1 β

O efeito inibidor de proteína inibidora terapêutica tendo a sequência de aminoácido YARAAARQ ARAKALARQLGV AA [SEQ ID NO: 11] na produção de IL-1 β foi estudado em células neurais.

As culturas primárias de astrócito cortical foram estabelecidas. Os astrócitos de rato primários foram isolados de córtices de rato Sprague Dawley embriônico de 18 dias. As células foram isoladas seguindo-se o protocolo de Traumatismo Crâniano sugerido e cresceram para confluência em
25 pratos petro de poli-lisina (PDL) de 100 mm. Resumidamente, os córtex de rato foram triturados com auxílio de uma pipeta de 1 ml até que a maioria dos pedaços de córtex grandes fosse dispersa. Após os fragmentos de tecido maiores terem sido permitidos sedimentar, o sobrenadante foi coletado,
30 em um tubo cônico de 15 ml, e peletizado por centrifugação em 1100 rpm durante 1 minuto. O sobrenadante resultante foi descartado e o pélete res-suspenso em meio neurobasal (10% de soro de cavalo, glutamina a 3 mM).

Os astrócitos em seguida foram semeados nas placas de petri e crescidos até que ficassem confluentes (80-95%) após o que foram passados. Os astrócitos foram passados 1:4, cresceram para 80-95% de confluência, em seguida enxaguados duas vezes com PBS. Os tipos de tratamento diferentes foram aplicados a cada placa de petri correspondente durante 18-22 horas. Houve um total de 1 ml de meios (meio neurobasal com 10% de soro de cavalo, glutamina a 3 mM) mais tratamento em cada placa de petri. O controle positivo compreendeu tratar as células com TNF- α (ou 5 ng/ml ou 10 ng/ml); como um controle negativo, as células foram expostas ao meio celular sem qualquer tratamento. Os grupos de tratamento consistiram em (i) MK2i a 1 mM (peptídeo inibidor terapêutico YARAAARQ ARAKALARQLGV AA [SEQ ID NO: 11]) com TNF- α (5 ng/ml); (ii) MK2i a 3 mM com TNF- α (5 ng/ml); (iii) MK2i a 1 mM com TNF- α (10 ng/ml TNF- α); e (iv) MK2i a 3 mM com TNF- α (10 ng/ml). As citocinas com ou sem peptídeo inibidor terapêutico foram sempre adicionadas simultaneamente nesta formulação de meio.

Após 18-22 horas, as células foram enxaguadas com PBS, raspadas em um pequeno tubo centrífugo utilizando um tampão de lise (ureia a 8 M ea, 4% de CHAPS, DTT a 10 mM), e rompidas utilizando-se um Disruptor Genie® (Scientific Industries, Bohemia, NY) durante 2 horas. As células foram peletizadas por centrifugação em 17 krpm durante 15 minutos, o sobrenadante (lisado celular) coletado e a concentração de proteína total quantificada (Pierce BCA Protein Assay kit, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL).

A figura 10 mostra um gráfico da concentração de IL-1 β média (pg/ml) de cada grupo de tratamento (i) MK2i 1 mM (peptídeo inibidor terapêutico YARAAARQARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO: H]) com TNF- α (5 ng/ml); (ii) MK2i a 3 mM com TNF- α (5 ng/ml); (iii) MK2i a 1 mM com TNF- α (10 ng/ml); e (iv) MK2i a 3 mM com TNF- α (10 ng/ml). Estes resultados mostram que TNF- α aumentou a concentração de IL-1 β , como esperado, e o peptídeo inibidor terapêutico foi capaz de inibir o nível de expressão de IL-1 β em culturas de astrócito cortical primário de uma maneira dependente da dose. Os resultados sugerem que o peptídeo inibidor terapêutico ativamente

limitará a cicatrização glial que é devido a expressão de citocina inflamatória induzida.

Exemplo 8. Efeito de Inibição de MAPKAP QUINASE 2 (MK2i) na Produção de IL-6

5 O efeito inibidor de proteína inibidora terapêutica tendo sequência de aminoácido YARAAARQARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 11] na produção de IL-6 foi estudado em uma cultura tripla consistindo em neurônios, astrócitos, e microglia. O meio celular foi preparado como segue. Resumidamente, o Meio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) (6,68 g) e
10 bicarbonato de sódio (1,85 g) foram adicionados a água desionizada destilada (DDi) (500 ml); a suspensão foi esterilizada por filtro e, em seguida suplementada com penicilina/estreptomicina (500 µl), soro bovino fetal (FBS) (50 ml), e soro humano (HS) (50 ml). O meio preparado foi adicionado (1 ml) ao tecido, e o tecido triturado 10 vezes durante 30 segundos através de uma
15 ponta de pipeta estéril. A suspensão celular foi filtrada através de um filtro de náilon e coletado. A suspensão foi filtrada foi centrifugada em 1100 rpm durante 1 minuto e o pélete ressuspenso. As células EI 8 foram semeadas (1×10^6 células/ml) para suportar a diferenciação em neurônios, astrócitos, e microglia. Após uma semana na cultura, algumas células foram fixadas e
20 sondadas para β -3 tubulina (um biomarcador para neurônios), proteína ácida fibrilar glial (GFAP, um biomarcador para astrócitos) e molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizado 1 (Ibal, um biomarcador para microglia) para validar a presença de todos os três tipos de célula. Os anticorpos primários utilizados incluíram anti-Ibal de coelho(1:200; Wako Chemicals USA, Inc.,
25 Richmond, VA), anti-GFAP de galinha (1:200; Millipore Corp., Billerica, MA), e anti- β -3-tubulina de camundongo conjugado para Alexa Fluor 488 (1:200; Millipore Corp., Billerica, MA). Os anticorpos secundários incluíram anti-coelho de cabra Alexa Fluor 633 (1:200; Invitrogen, Carlsbad, CA), e antiga-linha de cabra Alexa Fluor 555 (1:200; Invitrogen, Carlsbad, CA). Os nú-
30 cleos foram rotulados com Hoescht 33342 (Invitrogen, Carlsbad, CA). O controle positivo compreendeu tratar as células com TNF- α (ou 5 ng/ml ou 10 ng/ml); como um controle negativo, as células foram expostas ao meio

celular sem qualquer tratamento. Os grupos de tratamento consistiram em (i) MK2i a 1 mM (peptídeo inibidor terapêutico YARAAARQ ARAKALARQLGV AA [SEQ ID NO: 11]) com TNF- α (5 ng/ml); (ii) MK2i a 3 mM com TNF- α (5 ng/ml); (iii) MK2i a 1 mM com TNF- α (10 ng/ml TNF- α); e (iv) MK2i a 3 mM com TNF- α (10 ng/ml). Citocinas com ou sem peptídeo inibidor terapêutico foram sempre adicionadas simultaneamente nesta formulação de meio.

A figura 11 mostra um gráfico da concentração média de IL-6 (pg/ml) de cada grupo de tratamento (i) controle negativo (somente o meio); (ii) TNF- α (5 ng/ml); (iii) TNF- α (10 ng/ml); (iv) TNF- α (5 ng/1) e MK2i (peptídeo inibidor terapêutico a 1 mM YARAAARQARAKALARQLGVAA [SEQ ID NO: 1 1]); (v) TNF- α (10 ng/ml) e MK2i (1 mM); (vi) TNF- α (5 ng/ml) e MK2i (3 mM); e (vii) TNF- α (10 ng/ml) e MK2i (3 mM). Estes resultados mostram que TNF- α (5 ng/ml) aumentou o nível de expressão de IL-6 ns culturas celulares e que todas as culturas celulares tratadas com o peptídeo inibidor terapêutico tiveram níveis reduzidos de expressão de IL-6.

Ao mesmo tempo em que a presente invenção foi descrita com referência às modalidades específicas da mesma deve ser entendido por aqueles versados na técnica que várias alterações podem ser feitas e equivalentes podem ser substituídos sem afastar-se do espírito e escopo da invenção. Além disso, muitas modificações podem ser feitas para adotar uma situação particular, material, composição de material, processo, etapa ou etapas do processo, para o espírito e escopo objetivo da presente invenção. Todas tais modificações são pretendidas estarem no escopo das reivindicações anexas a esta.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição de inibição de quinase para tratar um distúrbio inflamatório cuja patofisiologia compreende expressão de citocina inflamatória, caracterizada pelo fato de que compreende:

5 (a) uma quantidade terapeuticamente eficaz de um peptídeo inibidor terapêutico, em que a quantidade terapeuticamente eficaz do peptídeo inibidor terapêutico inibe pelo menos uma enzima quinase,

em que o peptídeo inibidor terapêutico compreende um primeiro domínio e um segundo domínio,

10 em que o primeiro domínio compreende um domínio de transdução de proteína e está localizado próximo ao segundo domínio,

em que o segundo domínio compreende um domínio terapêutico e está localizado próximo ao primeiro domínio, e

15 (b) um veículo farmacêuticamente aceitável compreendendo uma solução aquosa estéril,

em que a composição reduz direta ou indiretamente a expressão de pelo menos uma citocina inflamatória selecionada do grupo consistindo em IL-6, TNF- α , e IL-1 β ; e

20 (c) um recipiente de multidose ou dose única para a composição.

2. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o peptídeo inibidor terapêutico é um peptídeo com uma sequência de aminoácido que apresenta identidade substancial à sequência de aminoácido YARAAARQARAKALARQLGVAA.

25 3. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o domínio terapêutico do peptídeo inibidor terapêutico apresenta identidade substancial à sequência de aminoácido KALARQLGVAA.

30 4. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o domínio de transdução do peptídeo inibidor terapêutico apresenta identidade substancial à sequência de aminoácido WLRRIKA-WLRRIKA.

5. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o domínio de transdução de proteína do peptídeo inibidor

terapêutico apresenta identidade substancial à sequência de aminoácido YARAAARQARA.

5 6. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o domínio de transdução de proteína do peptídeo inibidor terapêutico apresenta identidade substancial à sequência de aminoácido FAKLAARLYR.

7. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o peptídeo inibidor terapêutico apresenta identidade substancial à sequência de aminoácido FAKLAARLYRKALARQLGVAA.

10 8. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o domínio de transdução de proteína do peptídeo inibidor terapêutico apresenta identidade substancial à sequência de aminoácido KAFAKLAARLYR.

15 9. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o peptídeo inibidor terapêutico é um peptídeo com uma sequência de aminoácido que apresenta identidade substancial à sequência de aminoácido KAFAKLAARLYRKALARQLGVAA.

20 10. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o peptídeo compreende pelo menos um variante que é pelo menos 90% idêntico a pelo menos uma das SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO: 15.

FIG. 1

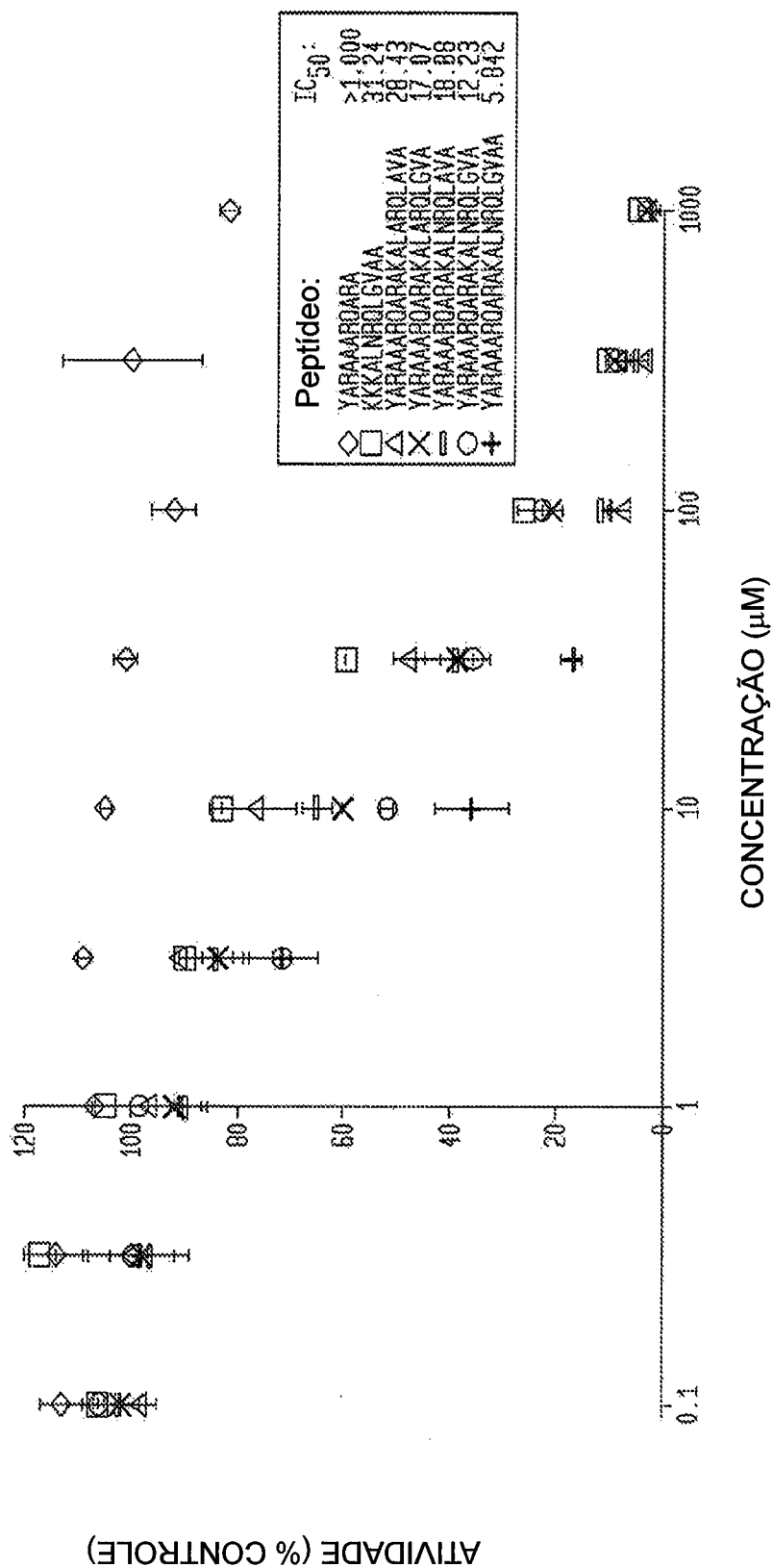


FIG. 2

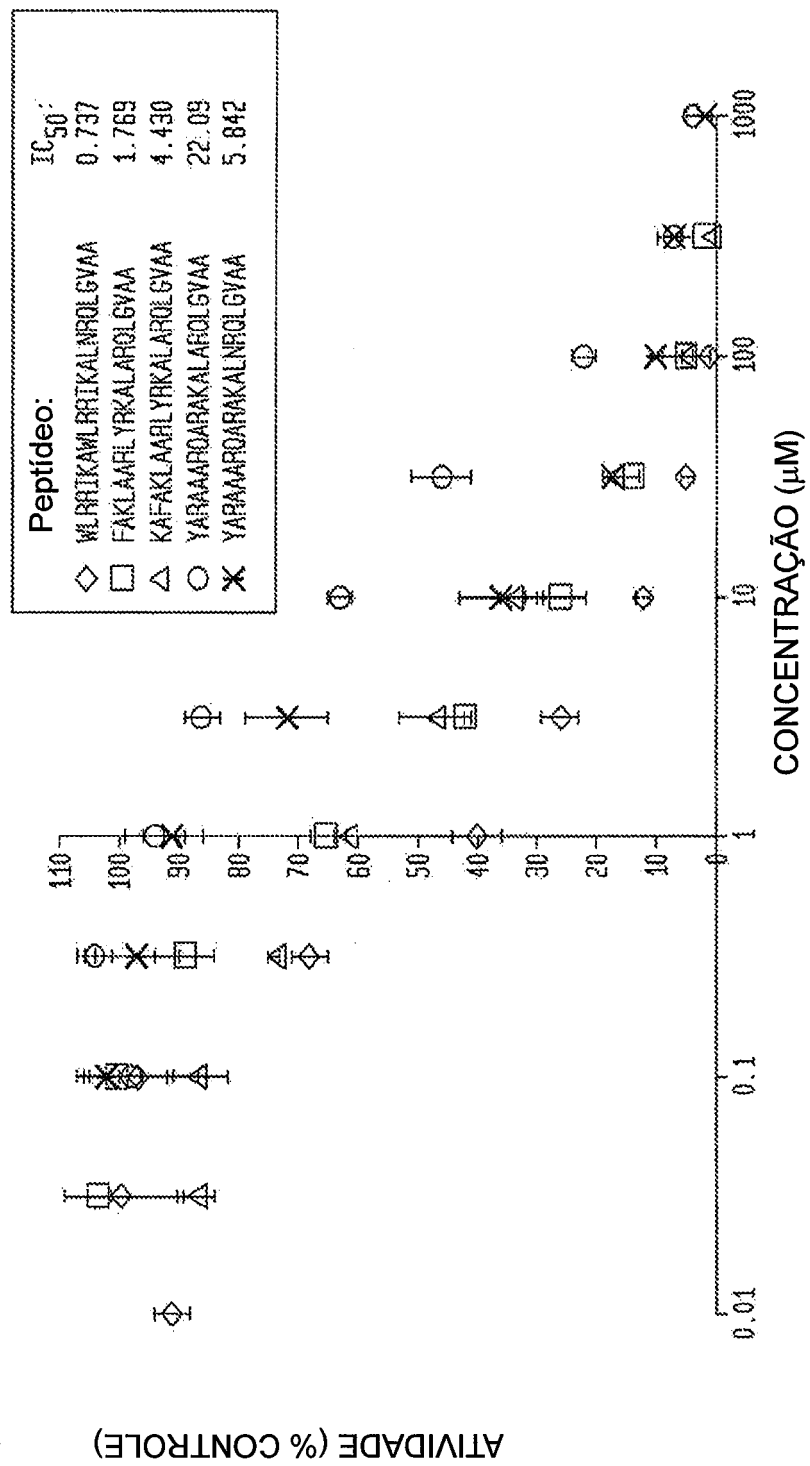


FIG. 3

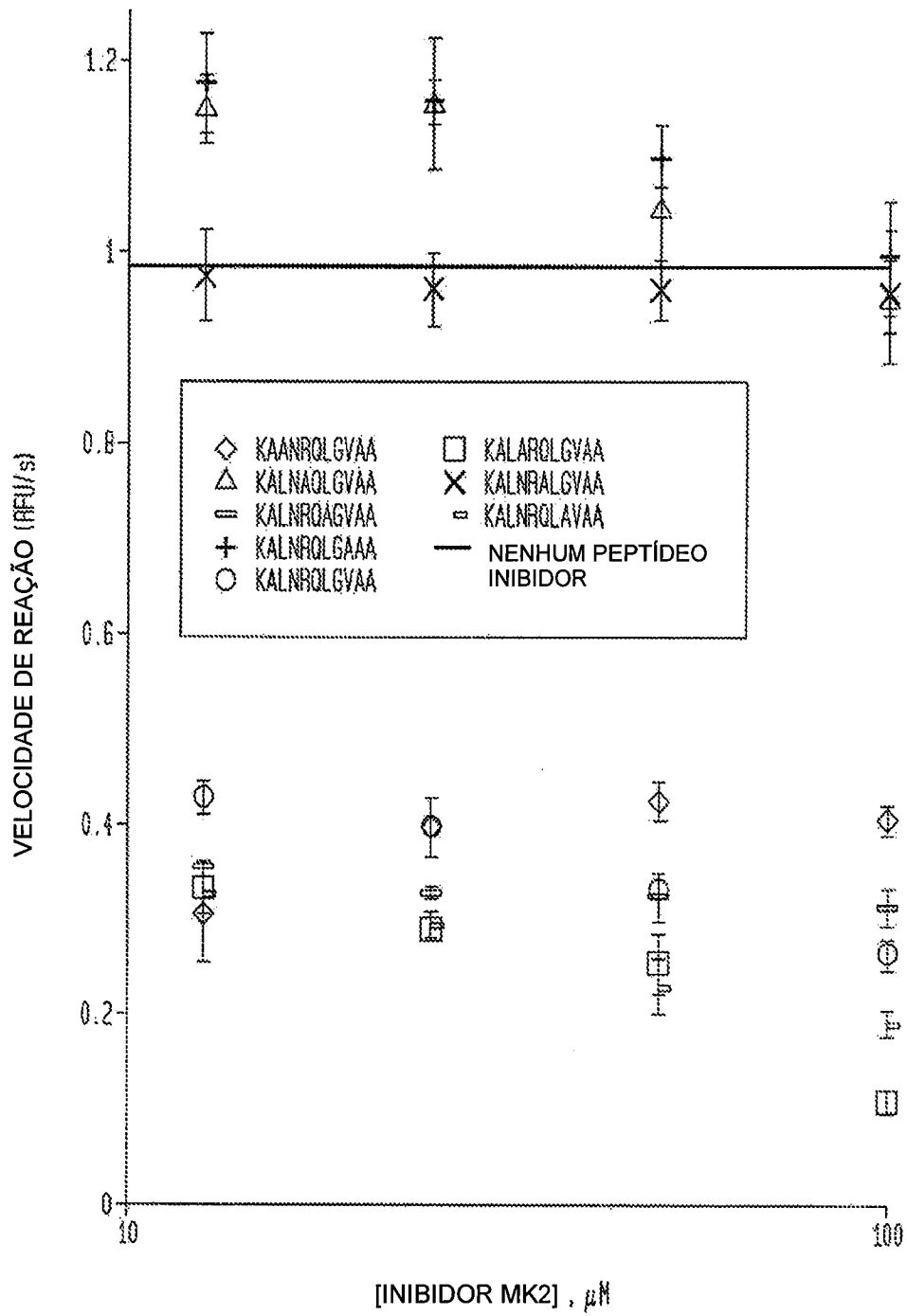


FIG. 4

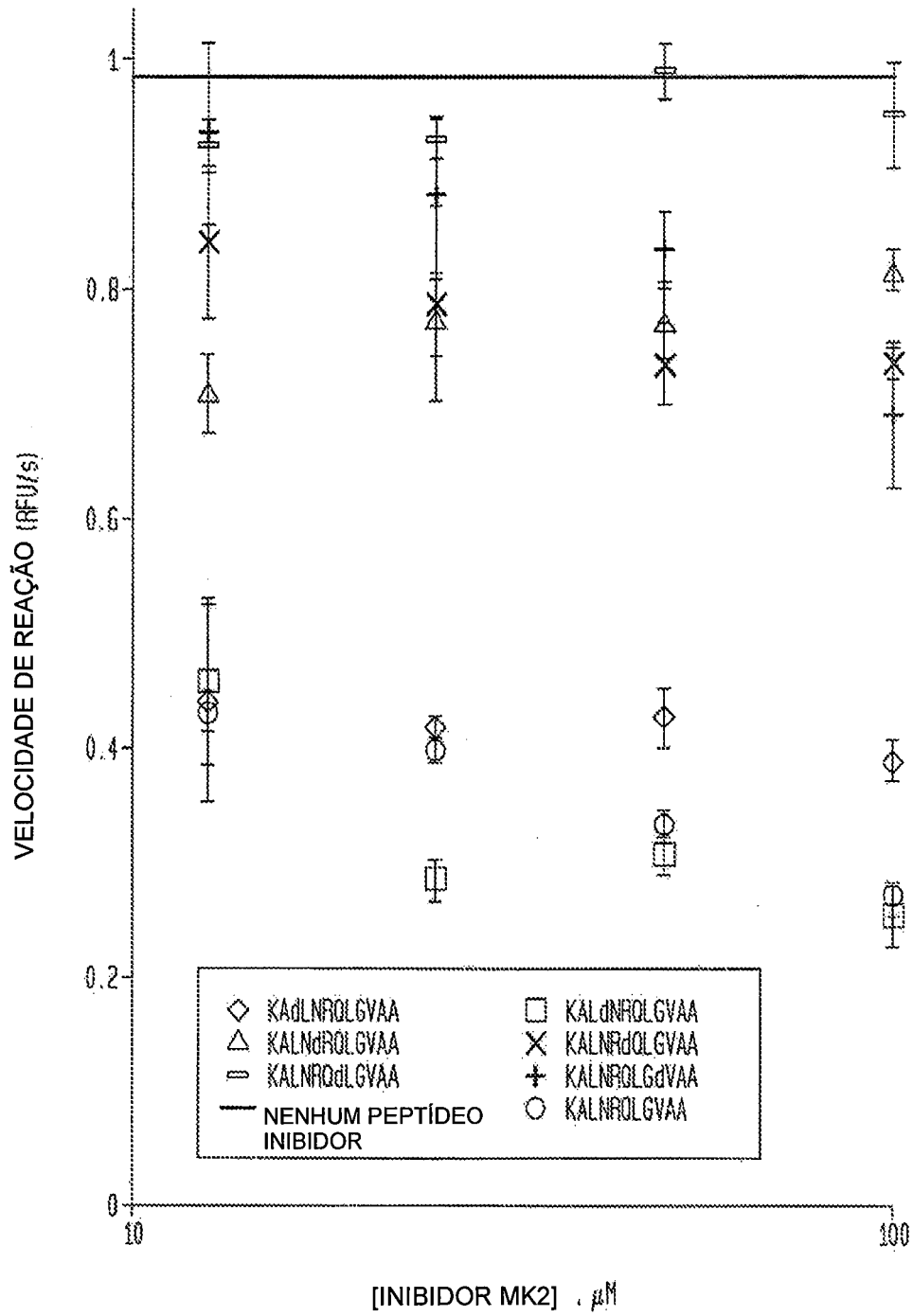


FIG. 5

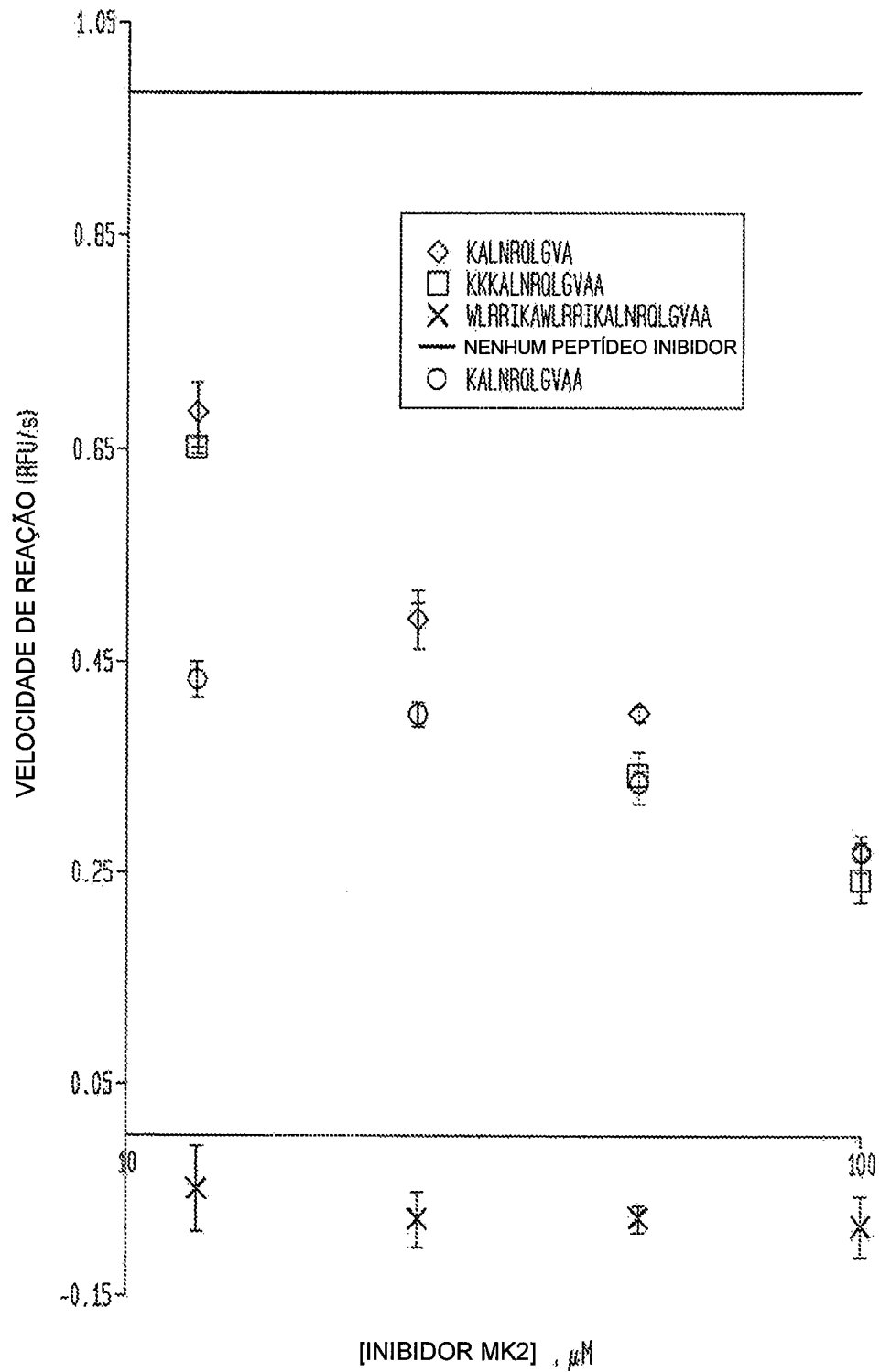


FIG. 6

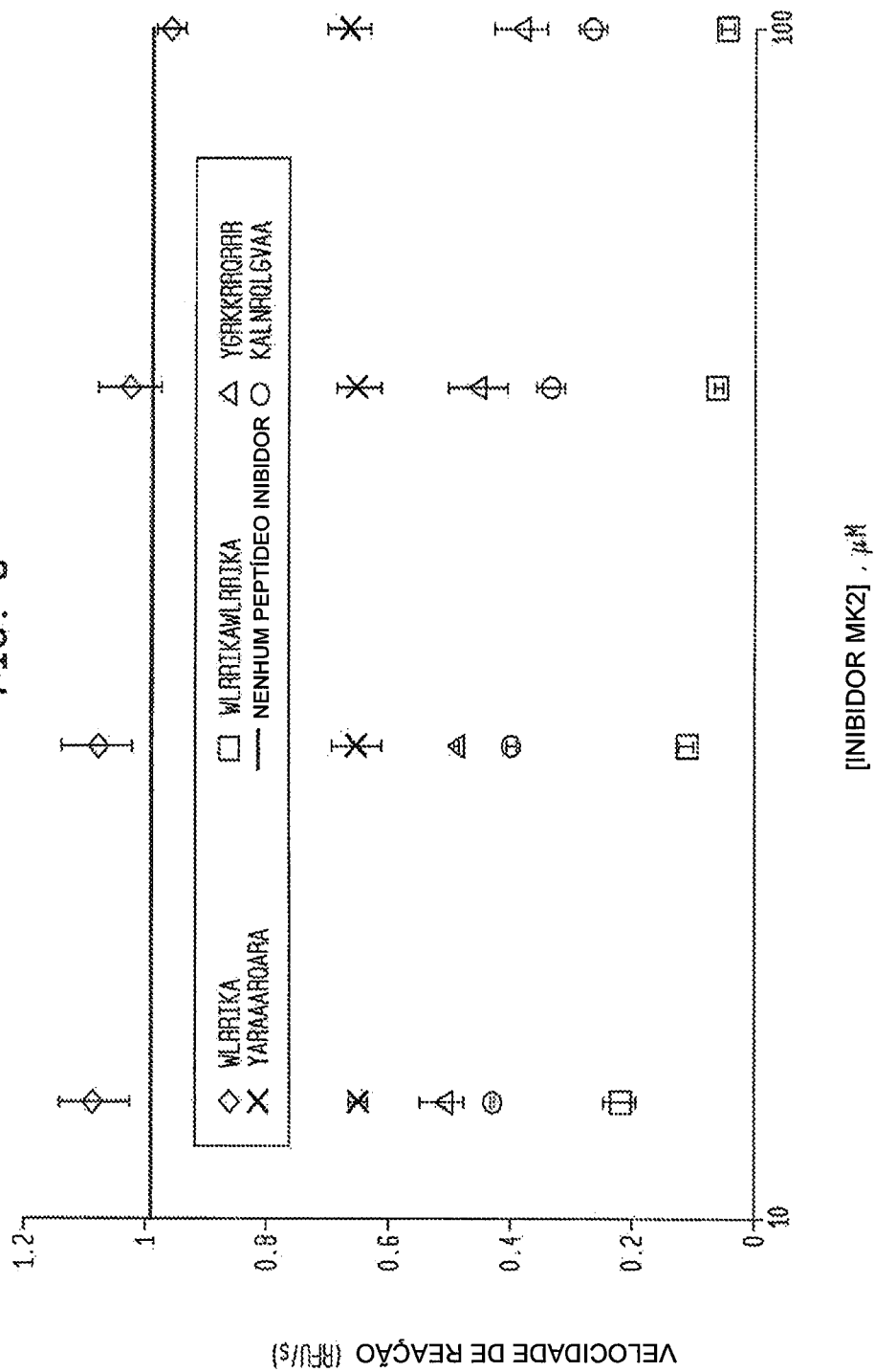


FIG. 7

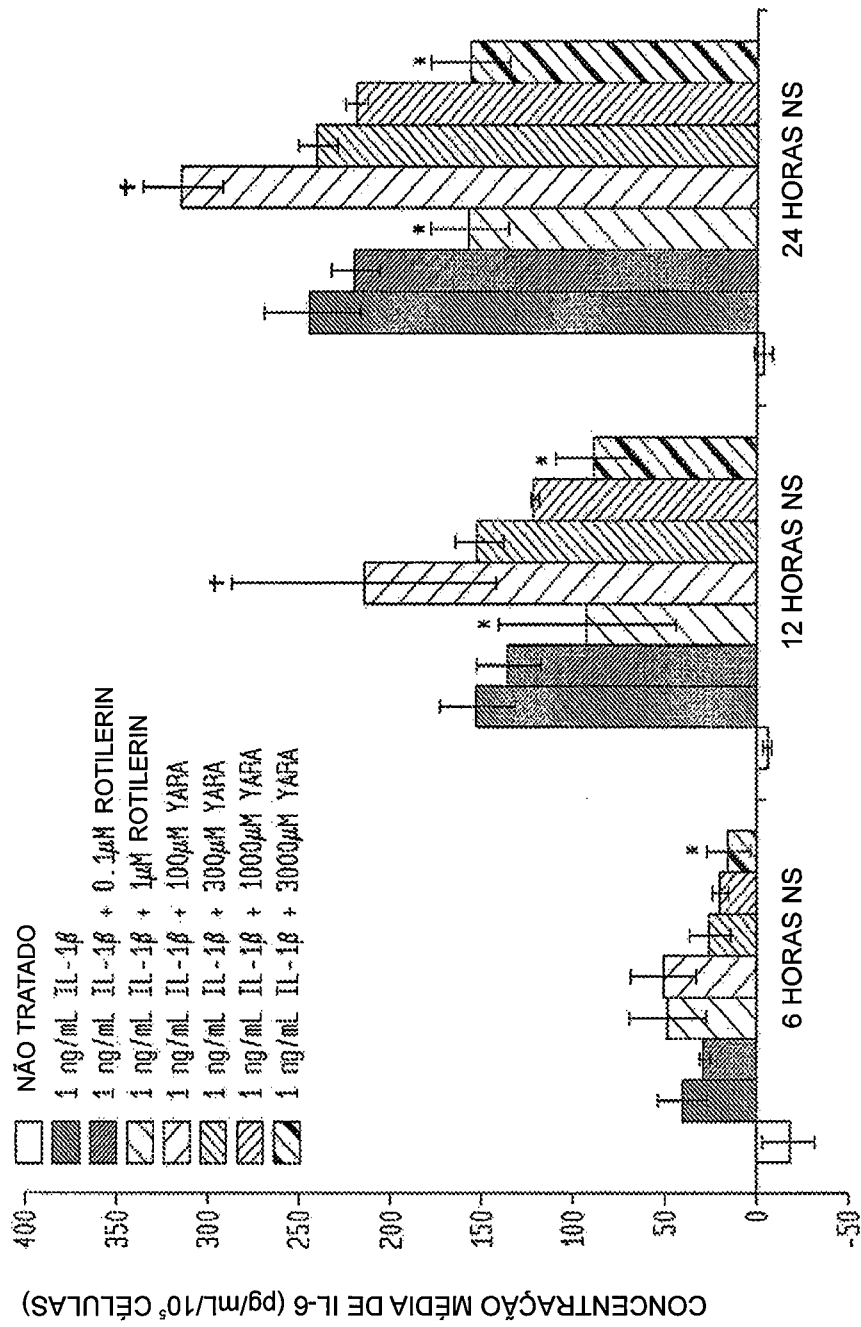


FIG. 8

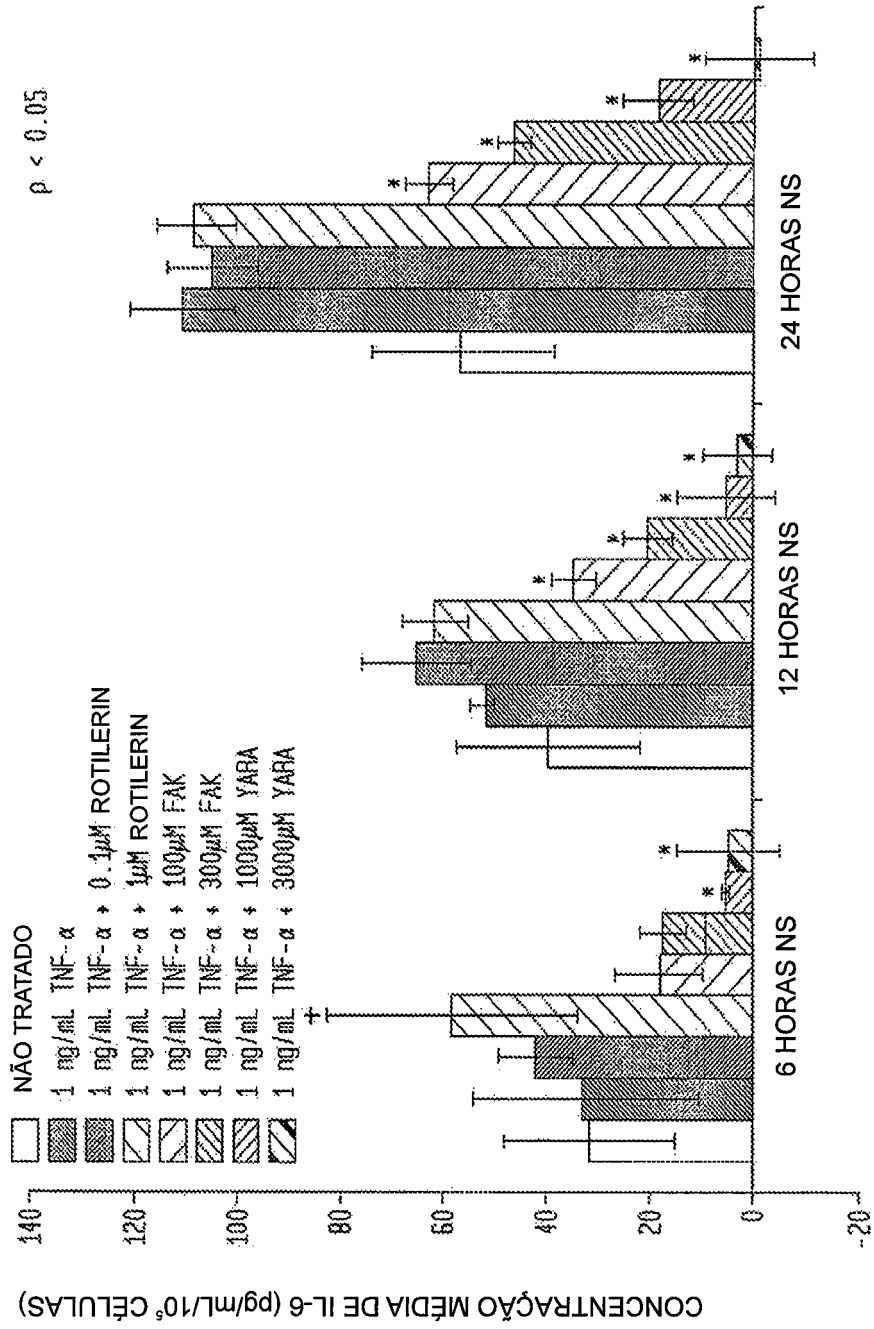


FIG. 9

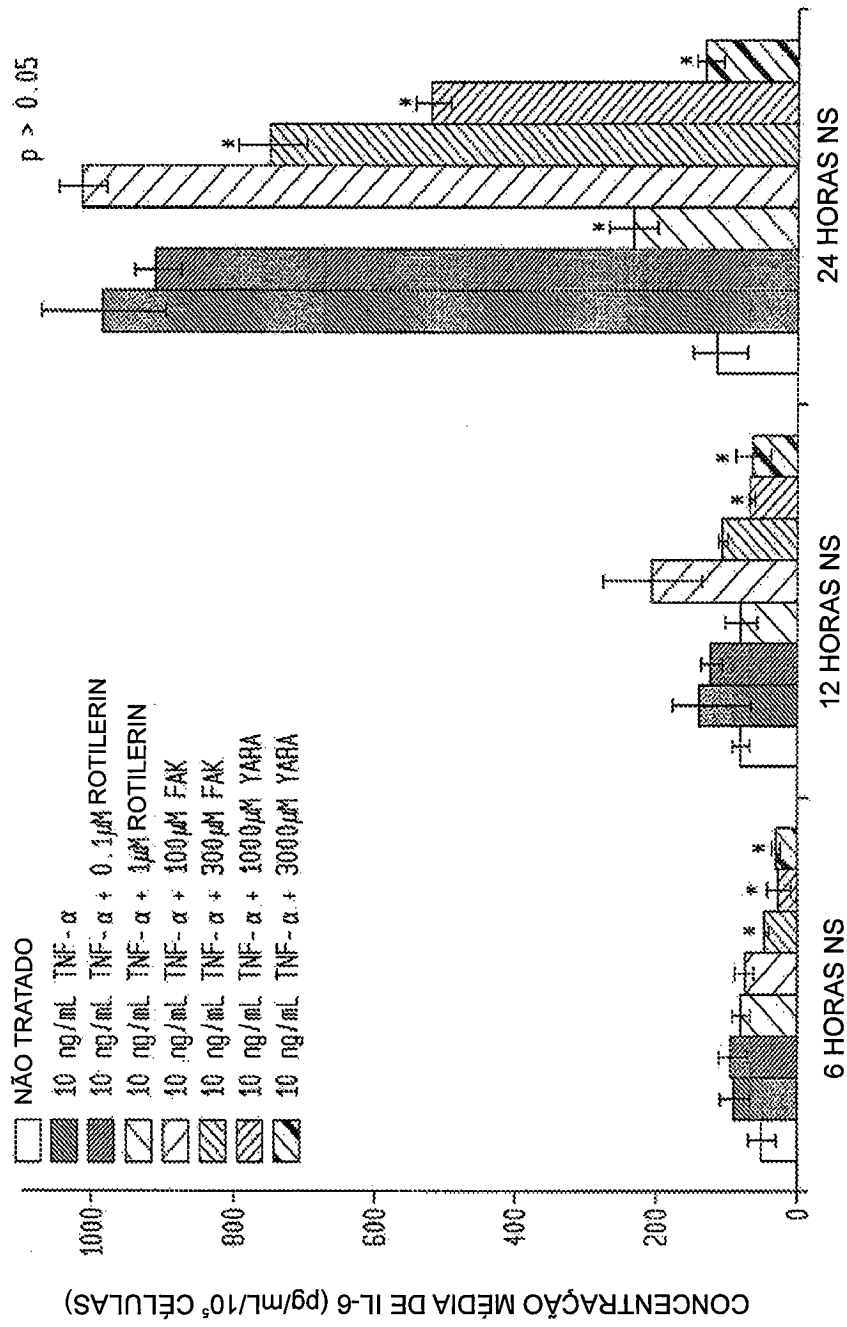


FIG. 10
EFEITO DE 24 HORAS MK2i SOBRE A PRODUÇÃO DE IL-1

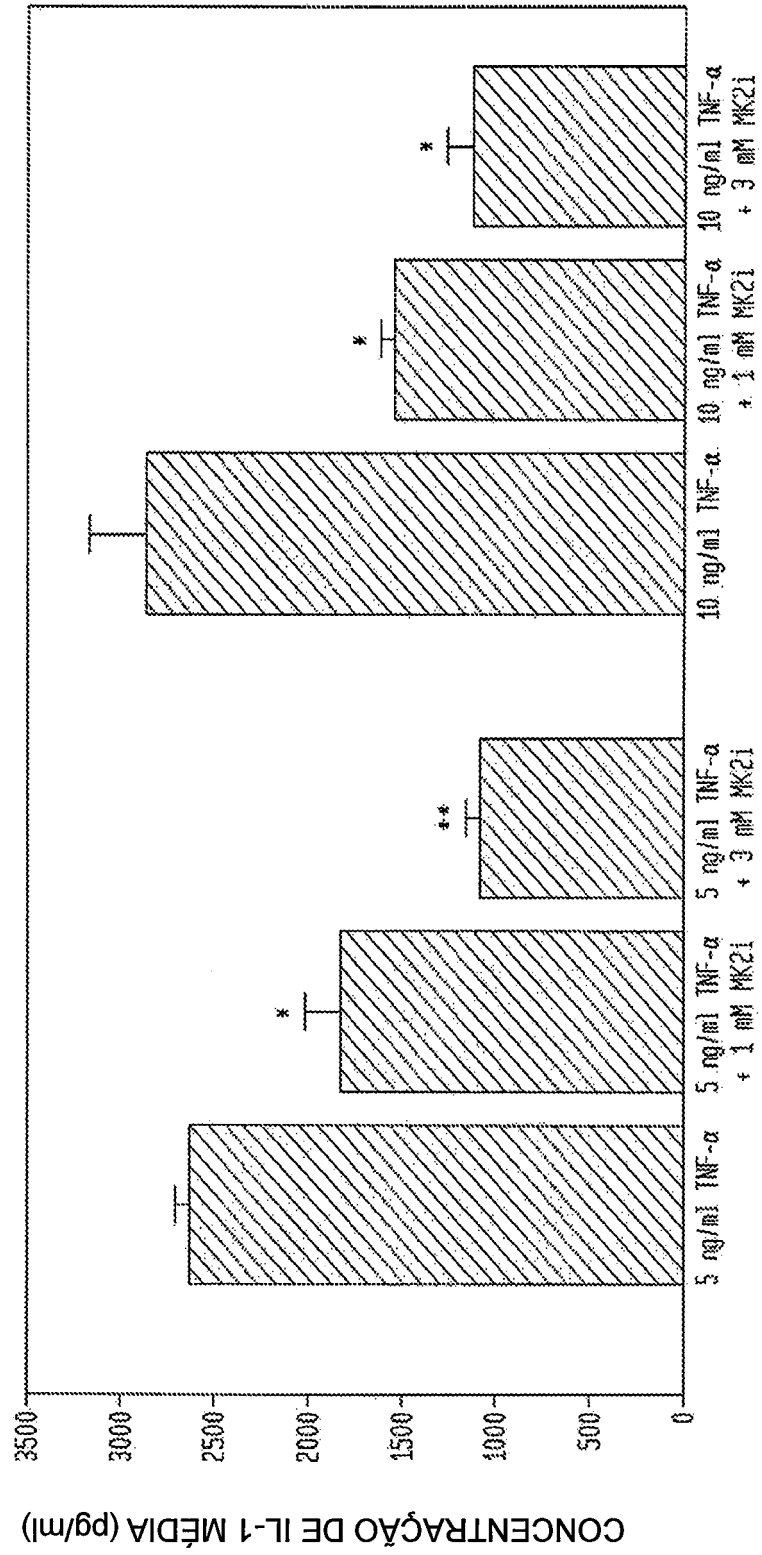
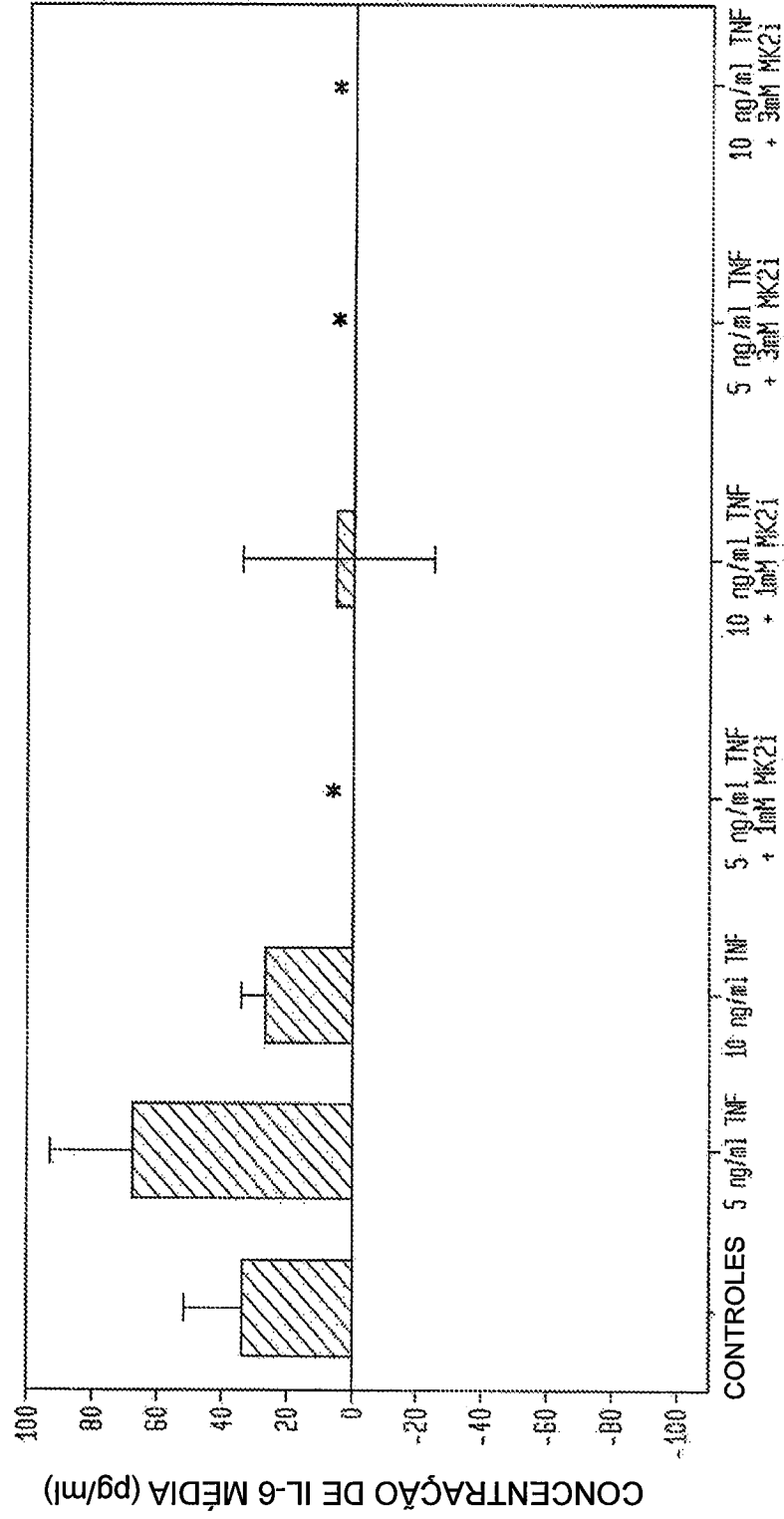


FIG. 11

EFEITO DE INIBIÇÃO DE MAPKAP CINASE-2 [MK2] SOBRE A PRODUÇÃO DE IL-6



24 HORAS TRATAMENTOS

RESUMO

Patente de Invenção: **"COMPOSIÇÃO DE INIBIÇÃO DE QUINASE NO TRATAMENTO DE UM DISTÚRBIO INFLAMATÓRIO".**

5 A presente invenção refere-se a composições de inibição de quinase contendo uma quantidade terapêutica de um peptídeo inibidor terapêutico que inibe pelo menos uma enzima quinase, métodos para tratar um distúrbio inflamatório cuja patofisiologia compreende expressão de citocina inflamatória, e métodos para tratar um distúrbio inflamatório cuja patofisiologia compreende expressão de citocina inflamatória utilizando as composi-
10 ções de inibição de quinase.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

Código de Controle

Campo 1



C3D17CD0DEF50B0F

Campo 2



2DCF11DC2A4509C

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: P176240-List-Seq.txt
- Data de Geração do Código: 04-10-2011
- Hora de Geração do Código: 13:20:29
- Código de Controle:
 - Campo 1: C3D17CD0DEF50B0F
 - Campo 2: 2DCF11DC2A4509C