



(11) *Número de Publicação:* PT 914331 E

(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)

C07K007/06 A C07K007/08 B
C07K007/54 B A61K038/04 B

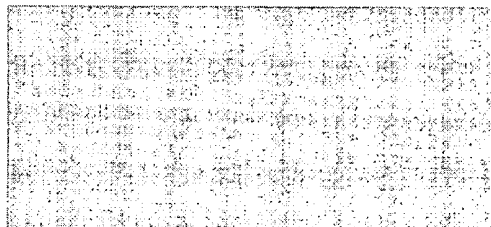
(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

<p>(22) <i>Data de depósito:</i> 1997.05.16</p>	<p>(73) <i>Titular(es):</i> NYXIS NEUROTHERAPIES, INC. 430 W. DEMING, 2ND FLOOR CHICAGO, ILLINOIS 60614 US</p>
<p>(30) <i>Prioridade:</i> 1996.05.17 US 649272</p>	<p>(72) <i>Inventor(es):</i> JOSEPH R. MOSKAL US HIROTAKA YAMAMOTO US PATRICIA A. COLLEY US</p>
<p>(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1999.05.12</p>	<p>(74) <i>Mandatário(s):</i> ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA RUA DAS FLORES 74 4/AND. 1294 LISBOA PT</p>
<p>(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 2000.11.02</p>	

(54) *Epígrafe:* PÉPTIDOS NEUROACTIVOS

(57) *Resumo:*

PÉPTIDOS NEUROACTIVOS





DESCRIÇÃO

"Péptidos neuroactivos"

Pedidos relacionados

Este pedido reivindica prioridade do pedido de patente dos EUA com o número de série 08/649,272 apresentado a 17 de MAIO de 1996, cujo fascículo é aqui incorporado na sua totalidade, para referência.

Antecedentes do invento

Campo do invento

O presente invento refere-se ao campo de composições de péptidos, proteínas ou aminoácidos neuroactivos.

Descrição da arte relacionada

É agora bem conhecido que o sistema nervoso central (SNC) dos mamíferos utiliza muitos péptidos neuroactivos para realizar uma sinalização especializada, no cérebro e espinal medula. Entre os péptidos neuroactivos mais bem conhecidos encontram-se a somatostatina, colecistoquinina, VIP, substância P, Encefalina, neuropeptido Y (NPY), neurotensina, TRH, CCK e dinorfina (veja-se genericamente The Biochemical Basis of Neuropharmacology, Cooper, Bloom e Roth, 5ª ed, Oxford University Press, New York, 1986). A elucidação cuidadosa das vias de sinalização complexas que operam no SNC requer a identificação e caracterização de péptidos neuroactivos específicos e das suas propriedades particulares, bem como a caracterização e localização de receptores específicos, neurologicamente significativos. A identificação de agonistas e antagonistas de receptores do SNC, quer parciais quer completos, que actuam de forma coordenada ou independente, é útil, na medida em que quanto mais se souber sobre os péptidos neuroactivos específicos, maior será a amplitude das manipulações que podem ser levadas a cabo nas proteínas receptores do SNC e no comportamento dos complexos receptores do SNC. De forma significativa, a identificação de agonistas e antagonistas únicos permite a caracterização e localização precisas de subconjuntos de receptores neuroactivos, através da sua ligação a estes agonistas ou antagonistas. Identificando os péptidos neuroactivos e utilizando-os para perturbar de forma específica o comportamento de complexos receptores conhecidos, obtém-se um conhecimento mais pormenorizado acerca do complexo receptor. Além disso, os péptidos neuroactivos novos oferecem meios alternativos para alterar o comportamento de complexos receptores do SNC conhecidos, ou



- para a identificação de complexos receptores anteriormente desconhecidos, ou de comportamentos desconhecidos de receptores conhecidos.

O receptor do N-metil-D-aspartato (NMDA), que tem sido implicado em desordens neurodegenerativas, morte de células cerebrais relacionadas com ataque, desordens convulsivas, aprendizagem e memória, foi clonado a partir de tecidos humanos (veja-se Hoffman, M., 1991, *Science*, **254**:801-2). Além de serem activados por ligação a NMDA, os receptores de NMDA são activados por glutamato (Glu) e aspartato (Asp), sendo também antagonizados de forma competitiva por D-2-amino-5-fosfonovalerato (D-AP5; D-APV), ou antagonizados de forma não competitiva por fenilciclidina (PCP) e MK-801. No entanto, de forma particularmente interessante, o receptor de NMDA é co-activado por glicina (Gly). (Kozikowski et al., 1990, *Journal of Medicinal Chemistry* **33**:1561-1571). A ligação de glicina a um local regulador alostérico no complexo receptor de NMDA aumenta, tanto a duração do tempo de abertura do canal, com, de forma mais drástica, a frequência de abertura do canal receptor de NMDA.

O receptor de NMDA é considerado central à potenciação de longo termo (LTP), que é o reforço persistente das conexões neuronais que se considera estarem subjacentes à aprendizagem e memória (veja-se Bliss e Collingridge, 1993, *Nature* **361**:31-39, para revisão). Pensa-se que os danos no SNC, que podem ocorrer por exemplo durante um ataque, provocam a sobreexcitação das células que têm o receptor de NMDA, através de um fluxo de glutamato e aspartato, conduzindo à morte de cerca de 80% destas células sobreexcitadas. A maioria das células que possuem receptores de NMDA encontra-se nas regiões do córtex e hipocampo do cérebro e após esta morte de células sobreexcitadas, os pacientes ficam incapazes de aprender novas coisas, mas conseguem ainda recordar acontecimentos da memória de longo termo. Os défices de memória humana associados ao abuso de PCP têm sido ligados à acção do PCP e são uma consequência esperada da inibição de fluxos de cálcio através do receptor de NMDA. WO 96/11698 (PCT/US95/13037) refere-se a péptidos diferentes dos aqui descritos, que podem ser utilizados para modular a actividade do receptor de NMDA. Também deve ter-se em conta que a EP 702 082 descreve a sequência SASYRYT como parte da região hiper-variável de um anticorpo IgG utilizado como um todo, mas não se verificou que o péptido SASYRYT tenha uma actividade independente do anticorpo.

Pensa-se que as drogas que podem bloquear, ou de algum outro modo alterar a operação do receptor de NMDA, podem proteger as células de morte



sobreexcitada, ou de problemas de memória associados ao receptor de NMDA. Outras drogas que interagem com o receptor de NMDA podem aumentar a capacidade das células para formar LTP e aumentar assim a aprendizagem e a memória.

Devido ao significado do receptor de NMDA, será bastante útil ter agonistas ou antagonistas de péptidos, específicos, que irão permitir o mapeamento preciso da distribuição tissular, caracterização de subconjuntos e manipulação fina de receptores de NMDA, e para a caracterização da acção de outros agonistas ou antagonistas no receptor de NMDA.

Sumário do invento

O presente invento proporciona certos péptidos neuroactivos específicos que se caracterizam pela capacidade de se ligarem ao receptor de NMDA, O presente invento proporciona composições específicas de polipéptidos ou de aminoácidos que se ligam ao receptor de NMDA no local co-agonista da glicina e realizam pelo menos a mesma actividade biológica a partir do receptor de NMDA, que a ligação de glicina. O presente invento proporciona composições de polipéptidos ou aminoácidos que são purificados a partir de tecidos, fluidos ou células naturais. O presente invento proporciona a síntese química de composições de polipéptidos ou aminoácidos do presente invento, utilizando métodos bioquímicos, ou técnicas de biologia molecular, convencionais. Uma vez que as composições de polipéptidos, ou aminoácidos, do presente invento são úteis para o isolamento e caracterização da actividade do receptor de NMDA e localização tissular, o presente invento proporciona composições de polipéptidos ou de aminoácidos estabilizadas, em que o esqueleto tem péptidos modificados incorporados, de modo que a estabilidade é aumentada, ou em que, por adição de modificações na estrutura da sequência, a conformação tridimensional do fragmento do péptido é estabilizada ou aumentada. O presente invento proporciona também composições de polipéptidos ou aminoácidos ciclizados.

Um outro beneficio das composições de polipéptidos ou aminoácidos do presente invento é o de o seu pequeno tamanho aumentar a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, sendo estes, portanto, adequados para administração e detecção *in vivo*. Assim, o presente invento engloba composições de polipéptidos ou aminoácidos de acordo com o presente invento ligados a marcadores radioactivos, marcadores MRI, marcadores de iões metálicos, marcadores enzimáticos, marcadores quimioluminescentes ou qualquer marcador deste tipo, que permita a detecção das composições de polipéptidos ou



aminoácidos. O presente invento inclui também formulações farmacêuticas das composições de polipéptidos ou aminoácidos do presente invento, em transportadores farmacêuticos adequados, de modo que podem ser administrados a um indivíduo vivo. Esta administração pode ser *i.p.*, *i.v.*, *i.m.* ou por qualquer outro meio adequado.

Nos casos em que as composições de polipéptidos ou aminoácidos do presente invento são utilizadas para a detecção do receptor de NMDA utilizando pesquisa *in vitro*, tal como seccionamento e coloração de tecidos, o marcador associado pode ser, além dos marcadores adequados acima descritos, proteínas, anticorpos, avidina, biotina e qualquer outro marcador deste tipo que permita a detecção da presença de composições de polipéptidos ou aminoácidos, em testes de pesquisa ou processos de coloração.

O presente invento proporciona também métodos para a detecção do receptor de NMDA, utilizando composições de polipéptidos ou aminoácidos do presente invento e um marcador adequado para a detecção do receptor ligado e de composições de polipéptidos ou aminoácidos. Estes métodos podem ser praticados *in vitro* ou *in vivo* dependendo das condições de detecção utilizadas. Alguns procedimentos que podem ser aplicados utilizando estes métodos incluem, e não se lhes limitam, MRI, varrimento CAT, raios-X, sonograma e outras metodologias de detecção não invasivas. Quando se planeia utilizar procedimentos invasivos, *i.e.*, biópsia ou seccionamento de tecidos, podem-se utilizar métodos de pesquisa imunológica *standard* para detectar a presença de receptor/polipéptido ligados, ou esta ligação pode ser especificamente visualizada através de coloração imunológica, ou outros meios de detecção deste tipo, utilizando a grande variedade de sistemas de marcador/detecção disponíveis. O presente invento proporciona assim, também um método para modificar a actividade biológica de um receptor de NMDA que compreende o contacto do referido receptor de NMDA com uma composição de polipéptidos ou aminoácidos do presente invento. Incluem-se especificamente, os péptidos com as sequências de aminoácidos enumeradas na tabela 1 adiante, que se prevê que sejam eficazes, a partir dos dados dos testes nos exemplos seguintes. O NT-18 e NT-16 também são incluídos na tabela 1, para comparação.

Tabela 1

Nome SEQ ID NO	Sequência de aminoácidos
NT-1:SEQ ID NO:1	Lys-Ala-Ser-Gln-Asp-Val-Ser-Thr-Thr-Val-Ala
NT-2:SEQ ID NO:2	Ser-Ala-Ser-Tyr-Arg-Tyr-Thr
NT-3:SEQ ID NO:3	Gln-Gln-His-Tyr-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr
NT-4:SEQ ID NO:4	Val-Tyr-Tyr-Ser-Gln-Gln-His-Tyr-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr
NT-5:SEQ ID NO:5	Glu-Asp-Leu-Ala-Val-Tyr-Tyr-Ser-Gln-Gln-His-Tyr-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr
NT-6:SEQ ID NO:6	Ser-Val-Gln-Ala-Glu-Leu-Asp-Leu-Ala-Val-Tyr-Tyr-Ser-Gln-Gln-His-Tyr-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr
NT-7:SEQ ID NO:7	Phe-Thr-Ile-Ser-Ser-Val-Gln-Ala-Glu-Leu-Asp-Leu-Ala-Val-Tyr-Tyr-Ser-Gln-Gln-His-Tyr-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr
NT-8:SEQ ID NO:8	Gln-Gln-His-Tyr-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr-Phe-Gly-Gly-Gly
NT-9:SEQ ID NO:9	Gln-Gln-His-Tyr-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr-Phe-Gly-Gly-Gly-Thr-Lys-Leu-Glu
NT-10:SEQ ID NO:10	Cys-Gln-Gln-His-Tyr-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr-Cys _____ S _ S _____
NT-11:SEQ ID NO:11	Ser-Gln-Gln-His-Tyr-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr-Ser
NT-12:SEQ ID.NO:12	Gln-Gln-His-Tyr-Ser
NT-13:SEQ ID.NO:13	Thr-Pro-Pro-Thr
NT-14:SEQ ID.NO:14	Thr-Pro-Pro
NT-15:SEQ ID.NO:15	Pro-Pro-Thr
NT-16:SEQ ID.NO:16	Pro-Pro
NT-17:SEQ ID.NO:17	Thr-Pro-Thr
NT-18:SEQ ID.NO:18	Thr

Descrição sumária dos desenhos

A Figura 1 mostra 3 gráficos que comparam resultados do teste da ligação de NMDA utilizando um teste com [³H]MK-801. A Figura 1A mostra a actividade da D-ciclo-serina, a Figura 1B mostra a actividade do anticorpo monoclonal B6B21 e a Figura 1C mostra a actividade do péptido NT-3. Os resultados são representados como a concentração do componente de teste vs. a percentagem de ligação de controlo de [³H]MK-801, na presença de ácido 7-cloroquinurénico, um agonista selectivo do local de glicina.

A Figura 2 mostra os resultados do teste do péptido NT-13 como um agonista parcial em testes farmacológicos da função específica de NMDA, medidos pelo teste de ligação de [³H]MK-801.

A Figura 3 mostra os resultados do péptido de teste NT-13, como agonista parcial num teste electrofisiológico da função específica de NMDA. A Figura 3A mostra os resultados de medições pela técnica de retalho controlado ("patch-clamp"). A Figura 3B-D demonstra que o péptido NT-13 tem características de um agonista parcial de glicina. A Figura 3B mostra que o NT-13 imita a glicina, mas não é tão eficaz. A Figura 3C mostra que o NT-13 inibe a corrente *standard* de NMDA+glicina. A Figura 3D mostra que a corrente de NMDA induzida pelo NT-13 é bloqueada pelo ácido 7-cloroquinurénico, que é um antagonista selectivo do local de glicina.

A Figura 4 mostra os resultados do teste do péptido NT-13 como um agonista parcial num teste da função comportamental específica de NMDA, comparado com o controlo de fluido cerebrospinal (CSF) e mAb B6B21. A Figura 4 mostra que o péptido NT-13 produziu alguma melhoria significativa no desempenho da tarefa do labirinto de água de Morris, medido por pequenas latências em nadar até à plataforma submersa (Figura 4A), comprimentos do caminho até à plataforma (Figura 4B) e uma distância média diminuída ao alvo, durante o teste sonda no dia 8 do treino (Figura 4C).

A figura 5 mostra os resultados da resposta de pestanejar em coelhos em envelhecimento, após o tratamento com o anticorpo monoclonal (mAb) B6B21. O gráfico inserido mostra os dados para a aquisição como respostas condicionadas máximas (RC) alcançadas.

A Figura 6A é um gráfico que mostra a permeabilidade relativa da barreira hematoencefálica, do péptido NT-13 marcado radioactivamente, em comparação com antipirina, sacarose e água, marcados radioactivamente. A figura 6B é um gráfico da % de contagens no cérebro em relação à água (valor de 100%).

A figura 7 é um gráfico da quantidade de NT-13 marcado radioactivamente, medido no cérebro 5 minutos após a administração transnasal. Os dados são representados como µg de NT-13 marcado radioactivamente no cérebro, contra mg de NT-13 marcado radioactivamente, fornecido transnasalmente.



A figura 8 é um gráfico da quantidade de NT-13 marcado radioactivamente, medido no cérebro 20 minutos após injeção *i.p.*. Os dados são representados como μg de NT-13 marcado radioactivamente no cérebro, contra mg de NT-13 marcado radioactivamente, fornecidos por injeção *i.p.*

Descrição pormenorizada do invento

Exemplo 1 Anticorpos monoclonais específicos para o receptor de NMDA

Os anticorpos monoclonais foram produzidos por imunização de ratinhos com tecido de sulco dentado, isolado de ratos recém-nascidos de 5 dias de idade, seguindo os protocolos *standard* (veja-se Moskal e Shaffner, 1986, *The Journal of Neuroscience* **6(7)**:2045-2053). Após a pesquisa de hibridomas para ligação ao tecido de sulco dentado por meios histoquímicos, isolaram-se os clones candidatos promissores. De entre os clones isolados encontrava-se o anticorpo monoclonal B6E11 que se verificou bloquear a produção de LTP em cortes de hipocampo de rato e suprimir o LTP estabelecido, em ambas a área CA1 do hipocampo e sulco dentado (veja-se Stanton, Sarvey e Moskal, 1987, *Proceedings of the National Academy of Science, U.S.A.*, **84**:1684-1688). Verificou-se que o anticorpo monoclonal B6E11 era eficaz para bloquear o LTP quando aplicado às dendrites apicais em sinapse com o "input" de potenciação, mas não quando aplicado a corpos celulares ou a dendrites basais do CA1. Pelo contrário, um segundo anticorpo monoclonal, o G6E3, que era do mesmo painel, da mesma classe de imunoglobulinas e ligado ao tecido alvo de um modo semelhante, não teve qualquer efeito no LTP.

Verificou-se que um outro anticorpo monoclonal, o B6B21 aumenta o LTP por modulação do tipo glicina, do receptor de NMDA (veja-se Haring, Stanton, Scheideler e Moskal, 1991, *Journal of Neurochemistry*, **57(1)**:323-332). Este anticorpo monoclonal único era capaz de elevar de forma significativa o LTP, quando aplicado a dendrites apicais de células piramidais de CA1 em cortes de hipocampo de rato, tal como detectado por um aumento na ligação de N-(1-(2-tienil)ciclo-hexil)-3,4-[^3H]-piperidina(^3H)-TCP). Este efeito foi eliminado pela saturação máxima dos receptores de NMDA com a adição combinada das concentrações máximas de glutamato, glicina e magnésio. Com relevância, o anticorpo monoclonal B6B21 inverteu a inibição da ligação de [^3H]-TCP pelo ácido 7-cloroquinurénico, mas não teve nenhum efeito na inibição da ligação de [^3H]-TCP por APV. A melhoria da ligação de [^3H]-TCP pelo anticorpo monoclonal B6B21 foi aumentada pelo glutamato, mas não pela glicina.



Verificou-se que a aprendizagem dependente do hipocampo era facilitada pela ligação de B6B21, ou pela adição de D-ciclo-serina, em que ambas se ligam especificamente ao receptor de NMDA em experiências *in vivo*, utilizando um teste de condicionamento do pestanejar em coelhos (veja-se Thompson, Moskal e Disterhoft, 1992, *Nature*, **359**:638-641). As infusões intraventriculares (para o ventrículo cerebral) de B6B21 aumentaram significativamente as taxas de aquisição no condicionamento do pestanejar vestigiário dependente do hipocampo, em coelhos, reduzindo para metade o número de ensaios necessários para alcançar um critério de 80% de respostas condicionadas. As injeções periféricas de D-ciclo-serina, um agonista parcial do local de glicina no receptor de NMDA que cruza a barreira hematoencefálica, também duplicou as taxas de aprendizagem dos coelhos.

O estudo do anticorpo monoclonal B6B21 permitiu-nos criar um painel de composições de polipéptidos ou aminoácidos (Tabela 1) que permitiu imitar a actividade do mAb B6B21 e assim, o efeito co-agonista de glicina.

Exemplo 2 Actividade farmacológica específica de NMDA - teste de [³H]MK-801

Os péptidos do presente invento são capazes de se ligar especificamente ao receptor de NMDA de mamífero no local co-agonista de glicina. De forma notável, os péptidos do presente invento não necessitaram da presença de um aminoácido de glicina (Gly, G). Devido ao papel significativo que o receptor de NMDA desempenha no cérebro de mamífero, os agonistas específicos são muito úteis para o mapeamento fino da distribuição tissular do receptor de NMDA e correlação com doenças, danos ou outros efeitos farmacológicos. Os agonistas específicos de péptidos pequenos são particularmente úteis, na medida em que podem ser ainda mais modificados para aumentar a biodisponibilidade e para o transporte através da barreira hematoencefálica.

As composições de polipéptidos ou aminoácidos do presente invento foram testadas quanto à capacidade de imitar o efeito co-agonista de glicina no receptor de NMDA, utilizando um teste de ligação ao [³H]MK-801, anteriormente validado. Este teste funcional tira vantagem do facto de a ligação *aumentada* de [³H]MK-801 pelos receptores de NMDA apenas poder ocorrer por abertura do canal de ligação do receptor. Isto porque o local de ligação de MK-801 está localizado dentro do ionóforo do complexo receptor de NMDA e está assim apenas acessível por abertura do canal do complexo receptor. Assim, a ligação aumentada de [³H]MK-801 está directamente correlacionada com uma abertura do canal aumentada, neste teste, desencadeada pela ligação das composições de



polipéptidos ou aminoácidos do presente invento ao local de ligação co-agonista de glicina.

A fim de melhor refinar o teste, adiciona-se ao teste um antagonista selectivo do local de ligação da glicina do complexo canal-receptor de NMDA. A acção normal do ácido 7-cloroquinurénico é ligar-se de forma selectiva ao local de glicina e inibir a abertura do canal receptor de NMDA, inibindo assim a ligação de [³H]MK-801 ao complexo receptor de NMDA. A adição do péptido NT-13 inverteu a inibição da ligação de [³H]MK-801 e correlaciona-se assim com a verificação de que as composições de polipéptidos ou aminoácidos do presente invento se ligam ao local de ligação de glicina.

Preparação de membranas. As membranas sinápticas em bruto utilizadas no teste foram preparadas utilizando tecido do hipocampo de rato (ratos macho Sprague-Dawly) e foram exaustivamente lavadas utilizando os procedimentos descritos anteriormente (Haring *et al.*, 1991, *J. Neurochem.* **57**:323-331). Em resumo, homogeneiza-se tecido que foi armazenado a -80°C em Tris 5 mM (pH 7,4) arrefecido em gelo, utilizando um Brinkman Polytron® e em seguida sedimentou-se por centrifugação a 48 000 g durante 20 minutos. O sobrenadante resultante é desprezado e as membranas são lavadas três vezes em tampão frio. As peletes são então ressuspensas em EDTA 5 mM, Tris 15 mM (pH 7,4) e incubadas durante uma hora a 37°C. As suspensões de membranas são então sedimentadas por centrifugação a 48 000 g durante 20 minutos e armazenadas a -80°C, até utilização no teste.

Teste de ligação ao receptor. Descongelam-se as peletes congeladas à temperatura ambiente e lavam-se três vezes por ressuspensão em Tris 5 mM (pH 7,4) e centrifugação. As peletes finais são suspensas a concentrações de 2 a 3 mg/ml em tampão Tris 5 mM (pH 7,4). As reacções de ligação são iniciadas pela adição de 200 µg de membranas preparadas de fresco às misturas reaccionais (cerca de 1 ml de volume final) contendo 1 nM de [³H]MK-801 a 25°C, na presença de uma gama de concentrações de péptidos e 60 µM de ácido 7-cloroquinurénico. A ligação não específica é determinada utilizando MK-801 não marcado 10 µM. As reacções de ligação são terminadas por filtração através de um aparelho de colheita de células de 24 poços, Brandel, em filtros de vidro GF/B Whatman que foram previamente embebidos em polietilenoimina 0,25% durante 30 minutos.

Análise/Interpretação de dados. Os péptidos que estimulam a ligação de [³H]MK-801 a concentrações iguais ou inferiores à dose eficaz de D-ciclo-serina (a 10⁻⁵) serão considerados positivos quanto à capacidade para se ligarem ao local de glicina, do complexo receptor de NMDA.

A Figura 1 mostra os dados de comparação dos dados de ligação utilizando D-ciclo-serina (Figura 1A), mAb B6B21 (Figura 1B) e o péptido NT-3 (Figura 1C). A Figura 1C mostra claramente que o péptido NT-3 se liga claramente ao local de glicina do receptor de NMDA de um modo semelhante ao mAb B6B21 e D-ciclo-serina. Os dados são registados como % da ligação de controlo, na presença de ácido 7-cloroquinurénico, em função da concentração do material testado.

A Figura 2 mostra a actividade de ligação do péptido NT-13, como acima. Os dados são apresentados como % da ligação de controlo na presença de ácido 7-cloroquinurénico em função da concentração do material testado.

Na Tabela 2 a seguir apresentam-se os resultados do teste utilizando os péptidos do presente invento, em que o NT-18 é apresentado para comparação

TABELA 2

Nome	10 ⁻⁹ M	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁵ M
NT-1*			97 ± 2	100 ± 2	73 ± 6
NT-2*		80 ± 9	109 ± 15	106 ± 4	77 ± 12
NT-3	112 ± 20	123 ± 0	121 ± 4	111 ± 11	90 ± 1
NT-4	106 ± 2	106 ± 6	116 ± 2	110 ± 1	109 ± 10
NT-5	109 ± 8	100 ± 9	114 ± 2	106 ± 2	112 ± 4
NT-6	95 ± 6	101 ± 9	101 ± 15	96 ± 1	91 ± 7
NT-7	96 ± 4	103 ± 4	97 ± 1	104 ± 0	100 ± 3
NT-8	105 ± 7	110 ± 5	108 ± 4	107 ± 6	115 ± 6
NT-9	104 ± 12	126 ± 7	125 ± 5	112 ± 10	120 ± 3
NT-10	100 ± 2	90 ± 8	114 ± 3	128 ± 4	116 ± 12
NT-11	96 ± 23	111 ± 4	118 ± 4	120 ± 11	127 ± 21
NT-12	95 ± 21	104 ± 10	95 ± 7	106 ± 9	106 ± 2
NT-13	97 ± 8	103 ± 8	110 ± 10	129 ± 10	117 ± 7
NT-14	89 ± 6	101 ± 1	96 ± 5	98 ± 8	95 ± 4
NT-15	99 ± 21	103 ± 2	100 ± 7	108 ± 12	93 ± 1
NT-16	83 ± 9	89 ± 8	97 ± 6	103 ± 3	117 ± 12
NT-17	122 ± 23	125 ± 17	128 ± 9	117 ± 14	119 ± 21
NT-18	88 ± 21	104 ± 33	101 ± 4	103 ± 6	123 ± 19

* Na presença de L-glutamato 10 µM



A tabela 2 mostra o efeito dos péptidos NT-1 a NT-18 na activação do receptor de NMDA, tal como medido pela ligação de [³H]MK-801 no teste de hipocampo de rato, referido como uma percentagem da ligação de controlo (\pm S.E.M.), a várias concentrações de péptido. Os dados referidos para os péptidos NT-15 a NT-18 e o erro experimental para cada ponto tornam pouco provável que qualquer destes péptidos tenha uma actividade biológica significativa. Deve sublinhar-se que as concentrações de péptido de 10^{-5} M, que se aproximam da gama milimolar (100 mM), como concentrações eficazes, são demasiado elevadas para serem consideradas indicadores de confiança de que o péptido é biologicamente activo. A esta concentração tão elevada é provável que os efeitos de ligação não específica sejam aumentados em relação à ligação específica, de modo que o equilíbrio de ligação do receptor/ligando é desviado. Assim, os péptidos que apresentam uma actividade de ligação óptima na gama de concentrações de 10^{-5} M não são considerados candidatos prováveis.

Por exemplo, o NT-14 e o NT-15 não têm efeito a qualquer das concentrações testadas, e o NT-16, NT-17 e NT-18 são mais eficazes a 10^{-5} M. Tendo em conta a concentração e o erro experimental, é razoável excluir estes péptidos, como não sendo biologicamente activos.

No entanto, deve notar-se que a D-ciclo-serina é um agonista parcial no local de glicina do receptor de NMDA e pode actuar como potenciador cognitivo (Thompson, Moskal e Disterhoft, 1992, *Nature*, **359**:638-641). A serina e a treonina partilham muitas características estruturais, de modo que poderá ser possível que a treonina tenha propriedades potenciadoras semelhantes às da serina. Assim, é possível prever que substituindo as porções treonina do NT-3 e do NT-13 por serina, resultem péptidos activos.

Exemplo 3 Teste de actividade electrofisiológica específica de NMDA

A medição electrofisiológica directa dos efeitos dos péptidos do presente invento na função do receptor de NMDA é um método de pesquisa poderoso, não ambíguo, e relativamente eficiente em termos de custo e tempo. Os péptidos do presente invento primeiro seleccionados como favoráveis através do teste de ligação de [³H]MK-801, são então submetidos a pesquisa electrofisiológica.

Métodos. Os registos electrofisiológicos são realizados por técnicas de voltagem controlada ("voltage-clamp") de dois eléctrodos, e preparações do sistema de expressão em oócitos, *standard* (veja-se Leonard e Kelso, 1990, *Neuron* **4**:53-60; Kelso *et al.*, 1992, *J. Physiology* **449**:705-718). Os oócitos são isolados e

injectados com ARNm para subunidades de receptor de NMDA de ratinho: co-injectam-se 70 nl de ARN z1 ($\xi 1$) com um volume igual de ARN e1 ($\epsilon 1$). Após incubação durante dois dias, fazem-se registos, ao mesmo tempo que se fixa o potencial de membrana em -80mV. A solução de registo *standard* contém NaCl 95 mM, KCl 2 mM, BaCl₂ 3,8 mM e HEPES 5 mM. O Mg²⁺ é omitido porque bloqueia as correntes de NMDA a alguns potenciais. O Ca²⁺ é omitido porque pode desencadear a corrente de cloreto dependente de Ca²⁺ endógeno no oócito. As respostas são evocadas por perfusão contínua de 3-5 ml de soluções contendo NMDA. A câmara de registo tem um volume de cerca de 400 ml. Nalgumas experiências adiciona-se ácido 7-cloroquinurénico à solução de perfusão, para demonstrar que as composições de péptidos ou aminoácidos testadas são capazes de competir com, e actuar no local de ligação de glicina.

Análise/Interpretação de dados. A figura 3A mostra que o péptido NT-13 tem um efeito dependente da dose nas correntes de NMDA. Concentrações crescentes originam correntes aumentadas.

A figura 3B mostra que o péptido NT-13 aumenta a corrente de NMDA, na ausência de glicina. Aqui, o NMDA 100 μ M com glicina 10 μ M desencadearam uma corrente elevada (cerca de 284 nA, com deflexão do traço para baixo). Na fase seguinte, o NMDA 100 μ M com péptido NT-13 100 μ M, originaram uma corrente significativa de cerca de 40% da resposta saturada de glicina+NMDA. Na mesma célula, o NMDA sozinho mostrou apenas uma resposta negligenciável (cerca de 7 nA).

A figura 3C mostra que a uma concentração elevada de glicina, o péptido NT-13 adicionado reduz a corrente de NMDA, havendo uma redução de cerca de 91% da resposta de controlo ao NMDA e glicina saturante. Estes dados suportam ainda mais a conclusão de que o péptido compete com o local de ligação de glicina.

A figura 3D mostra que na ausência de glicina, o efeito do péptido NT-13 foi bloqueado pela adição selectiva do ácido 7-cloroquinurénico antagonista.

Exemplo 4 Teste da actividade comportamental específica de NMDA - Labirinto de água de Morris

Labirinto de água de Morris. Existem dois tipos de aprendizagem associativa dependentes do hipocampo (HPC); uma dependente do tempo e uma dependente do espaço. O labirinto de água de Morris (Morris, 1984, *J. Neurosci.*



Meth. 11:47-60; Brandeis *et al.*, 1989, *Int. J. Neurosci* 48:29-69) é um paradigma bem estabelecido para medir a aprendizagem dependente do espaço e complementa assim outros testes comportamentais, como os estudos do pestanejar, que medem a aprendizagem temporal. Ambos os tipos de aprendizagem são afectados pelo envelhecimento e são dependentes da activação do receptor de NMDA (Morris, 1989, *J. Neurosci.* 9:3040-3057).

Método de abordagem. Utilizam-se ratos Sprague-Dawley machos, adultos, em todas as experiências. Utiliza-se um total de 8 a 10 animais por grupo. O número de animais por grupo foi seleccionado por análise da função de potência dos dados anteriores, obtidos em trabalhos semelhantes. Com base no resultado destes estudos anteriores, obtiveram-se estimativas realistas da variância do erro para pontos finais bioquímicos e comportamentais. Utilizando esta informação e estabelecendo o valor como $p < 0,05$, seleccionou-se o tamanho da amostra que iria proporcionar níveis aceitáveis de potência estatística. As estimativas basearam-se nas sugestões apresentadas em Keppel (*Design and Analysis*, Prentice Hall, NY, 1973). Em todos os casos, os estudos foram concebidos para maximizar a quantidade de informação derivada a partir de um número mínimo de animais.

Implanta-se nos ratos uma cânula guia de aço inoxidável, em ambos os ventrículos laterais, esquerdo e direito, do cérebro. O teste comportamental começa após os ratos terem descansado durante duas semanas. Quinze minutos antes de cada sessão de treino diária na tarefa do labirinto de água, a seguir descrita, fornece-se aos ratos uma infusão de péptido nas concentrações adequadas, ou de veículo de controlo de fluido cerebrospinal artificial (aCSF). As soluções são fornecidas como infusão a um caudal de cerca de 1,0 ml/min para os ventrículos (*i.c.v.*), utilizando uma cânula de injeção de calibre 30, ligada por tubagens de PE-10 a uma seringa Hamilton de 10 ml, montada numa bomba de infusão de precisão da CMA Instruments. Introduce-se por infusão um total de cerca de 3,0 ml em cada ventrículo. Para promover a difusão, a cânula de injeção é deixada no local durante um período de dois minutos após a infusão. Utilizam-se processos de injeção aguda, de modo a manter um intervalo de teste de tratamento específico. Inclui-se um grupo de controlo não injectado, para determinar os efeitos do próprio procedimento de injeção no desempenho.

Tarefa do labirinto de água. Quinze minutos após a injeção *i.c.v.*, os ratos são testados no desempenho da tarefa do labirinto de água de Morris (MWM). Esta tarefa é amplamente utilizada para determinar as propriedades comportamentais e substratos neurobiológicos da memória espacial, em ratos.



Tornou-se popular, uma vez que é um comportamento rapidamente adquirido e não é motivado por privação de comida. Vários estudos demonstraram que o desempenho desta tarefa depende do circuito colinérgico do hipocampo e do septo-hipocampo intactos. O desempenho da tarefa é impedido por ruptura (i) cirúrgica ou (ii) farmacológica do HPC, ou da sua inervação colinérgica e por (iii) envelhecimento. É aceite que esta tarefa proporciona um teste comportamental sensível e útil para a integridade funcional da via do septo-hipocampo e do HPC (Opello *et al.*, 1993, *Physiol. Behav.* **54(6)**:1227-1233).

A tarefa MWM *standard* requer que os ratos aprendam a nadar até uma plataforma submersa, numa piscina circular que contém água opaca. Existem quatro pontos igualmente espaçados em torno dos limites da piscina, que são designados como posições de partida e dividem a piscina em quatro quadrantes iguais. A plataforma de escape submersa está localizada num dos quatro quadrantes, ao longo do treino. Cada teste de treino consiste em colocar o rato na água numa das quatro posições de partida. Deixa-se o rato procurar a plataforma submersa durante 60 segundos e é-lhe permitido permanecer na plataforma durante 30 segundos. Os ratos são testados em dois testes por dia, durante 15 dias consecutivos. As diferentes posições de partida em torno da piscina são apresentadas numa sequência ao acaso. A latência para nadar até à plataforma submersa serve como uma medida de aquisição. Estes parâmetros de teste proporcionam uma tarefa que é sensível, tanto a melhorias, como a pioras da memória espacial, induzidas pelo tratamento. Um segundo componente do teste envolve a introdução de testes sonda após os testes 2, 14, 26 e 38. Durante os teste sonda, a plataforma de escape é removida e o comportamento do rato é gravado em vídeo durante 30 segundos. As medidas seguintes são derivadas a partir de um sistema de vídeo automatizado: (i) percentagem de tempo a nadar no quadrante correcto, (ii) distância média do alvo durante o teste sonda e (iii) velocidade de natação. A utilização deste procedimento de teste sonda sequencial permite determinar componentes diferentes da aprendizagem espacial; memória de procedimento, uma forma de memória não relacionada com as funções do hipocampo e memória declarativa, um processo dependente do HPC. É importante avaliar estas duas formas de cognição, uma vez que apenas a memória declarativa fica comprometida com o envelhecimento, doença de Alzheimer e no modelo AF64A (Opello *et al.*, 1993, *Physiol. Behav.* **54(6)**:1227-1233).

Análise histológica. No final dos estudos comportamentais, os ratos são sacrificados e preparados para avaliação histológica. A análise é feita para determinar se a injeção repetida de péptidos produz quaisquer sinais de danos



excitotóxicos no HPC. Os blocos de HPC serão fixados numa solução tampão de fosfato 0,1 M contendo 10% de formalina e 30% de sacarose. As secções coronais são cortadas e coradas com violeta de cresilo, a coloração das camadas de células piramidais em CA3 e CA1 é medida com um sistema de análise de imagem.

Análise/interpretação de dados. Os efeitos do tratamento global são determinados utilizando uma análise de variância de uma, ou de duas vias (ANOVA), dependendo da ocorrência de factores múltiplos ou medições repetidas, de acordo com um modelo de ANOVA misto. As comparações aos pares adequadas são realizadas utilizando o teste da diferença menos significativa de Fisher (LSD). A significância estatística aceitável é de $p < 0,05$ e todos os testes *post-hoc* são de duas caudas.

Resultados A Figura 4 mostra os resultados do teste do péptido NT-13 como um agonista parcial no teste da função comportamental específica de NMDA, comparado com fluido cerebrospinal de controlo (CSF) e mAb B6B21. Os resultados mostram que o péptido NT-13 produziu alguma melhoria cognitiva na tarefa do labirinto de água de Morris, tal como medida pelas menores latências em nadar até à plataforma submersa (Figura 4A), menores comprimentos de caminho até à plataforma (Figura 4B) e menor distância média ao alvo, durante o teste sonda no dia 8 do treino (Figura 4C). Os dados na figura 4A são apresentados como latência ao escape em segundos, para cada tratamento testado. Aqui, os ratos tratados com péptido NT-13 mostraram um tempo de latência de escape marcadamente melhor (cerca de 10,75 segundos), comparado com os animais tratados com CSF de controlo (cerca de 19 segundos) e animais tratados com mAb B6B21 (cerca de 16,25 segundos). Os dados da figura 4B são apresentados como comprimento do caminho em centímetros, para cada tratamento testado, em que os ratos tratados com o péptido NT-13 apresentaram um comprimento de caminho até ao alvo menor (cerca de 300 cm); comparado com os animais tratados com CSF de controlo (cerca de 420 cm) e tratados com mAb B6B21 (cerca de 330 cm). Os dados da figura 4C são apresentados como a distância ao alvo em centímetros para cada tratamento testado, em que a distância média ao alvo, uma vez removida durante o teste sonda, é utilizada como uma medida para a retenção. Aqui, os ratos tratados com péptido NT-13 ficaram muito próximo do local do alvo removido, a uma distância média de cerca de 31 cm, enquanto que os animais tratados com CSF de controlo e mAb B6B21 se desviaram cerca de 36,25 cm e 35 cm, respectivamente.



Estes dados demonstram que o tratamento com o péptido do presente invento pode induzir efeitos comportamentais *in vivo*, em mamíferos, especificamente uma melhoria cognitiva, como demonstrado pelo desempenho melhorado da tarefa do labirinto de água de Morris.

Exemplo 5 Teste de actividade comportamental específica de NMDA - pestanejar vestigiário

Condicionamento do pestanejar vestigiário - O condicionamento do pestanejar ou da membrana nictitante tem sido adaptado como um "modelo do sistema comportamental" para utilização na análise de substratos neurais de aprendizagem por vários laboratórios (Disterhoft *et al.*, 1977, *Brain Res.* **137**:127-143; Thompson, 1976, *American Psychologist* **31**(3):209-227). De entre as vantagens deste sistema incluem-se a simplicidade relativa do paradigma comportamental, os excelentes procedimentos de controlo disponíveis, o facto de se estar a analisar a aprendizagem associativa, a facilidade de aplicação de estímulo condicionado e não condicionado e controlo, a facilidade de medições comportamentais e neurofisiológicas precisas e a extensão de dados comportamentais disponíveis para esta preparação (Gormezano, 1966, in *Classical Conditioning*, J.B. Sidowski ed., McGraw Hill, Nova Iorque, pp. 385-420; Gormezano *et al.*, 1987, *Classical Conditioning*, Hillsdale, Nova Jersey). O sistema tem sido correlacionado com várias patologias, incluindo desordens de memória relacionadas com o envelhecimento (Solomon *et al.*, 1988, *Neurobiol. Aging* **9**:535-546), deficiência de cálcio e envelhecimento (Disterhoft *et al.*, 1994, *Annals NY Acad. Sci.* **747**:382-406), amnésia (Gabrieli *et al.*, 1995, *Behav. Neurosci.* **109**:819-827) e pacientes de Korsakoff amnésicos e alcoólicos recuperados (McGlinchey-Berroth *et al.*, 1995, *Alcoholism: Clin. and Exp. Resch.* **19**:1127-1132)

Método de abordagem Implantaram-se cirurgicamente em coelhos albinos adultos, fêmea, *Oryctolagus cuniculus*, cânulas guia ventriculares laterais, em ambos os lados, e ajustou-se com parafusos de restrição. A cirurgia foi realizada pelo menos uma semana após a chegada e as dosagens para anestesia foram calculadas de acordo com o peso (60 mg/kg de cetamina-HCL, 10 mg/kg de xilazina).

Aproximadamente 10 dias após a cirurgia os indivíduos receberam uma sessão única de uma hora, de habituação ao ambiente de treino. O treino começou após dois dias de repouso. Os coelhos foram restringidos utilizando sacos de acomodação ajustados com cordéis de puxar na frente e na traseira e foram treinados em câmaras de som atenuado separadas. Os coelhos foram colocados

numa câmara de *plexiglass* almofadada, semelhante ao descrito por Gomezano *et al.* (1966, in *Classical Conditioning*, J.B. Sidowdiki ed., McGraw Hill, New York, pág. 385-420) com uma barra ligada, para restrição da cabeça. As pálpebras foram mantidas abertas com molas de roupa e mediu-se e extensão da membrana nictitante com um "infrared relective sensor" Thompson *et al.*, 1994, *J. Neurosci. Meth.* 54:109-117).

Antes de cada sessão de treino pares de coelhos receberam infusões bilaterais de 5 µl, quer de B6B21 suspenso em fluido cerebrospinal artificial (aCSF; NaCl 124 mM, NaHCO₃ 26 mM, KCl 3 mM, CaCl₂ 2,4 mM, MgSO₄ 1,3 mM, NaH₂O₄ 1,24 mM, D-glucose 10 mM; pH 7,4) ou de apenas aCSF a um caudal de 1 µl/min/ventrículo. Utilizaram-se três concentrações de B6B21; 0,3 µg/µl, 1,0 µg/µl ou 3,0 µg/µl. A pessoa que realizou a experiência desconhecia o conteúdo da solução administrada. Os coelhos com cânulas foram treinados aos pares, contrabalançados entre os quatro grupos de tratamento, com um máximo de seis animais em cada grupo.

O condicionamento da membrana nictitante vestigiário começou imediatamente após a infusão. O treino foi efectuado durante 15 dias com 80 ensaios/dia (CS: 6 kHz, 90 dB, 100 ms, 5 ms de tempo de subida/descida; UCS: tono 3,5 psi, 150 ms). O intervalo vestigiário era de 500 ms para tornar a tarefa dependente do hipocampo (Moyer *et al.*, 1990, *Behav. Neurosci.* 104(2):243-252. Os testes foram apresentados com um intervalo inter-testes variável de 30-60 s e controlado por um sistema de computador compatível com um PC IBM (Akase *et al.*, 1994, *J. Neurosci. Method* 54:119-130; Thompson *et al.*, 1994, *J. Neurosci. Meth* 54:109-117).

Análise/interpretação de dados Os efeitos globais do tratamento são determinados utilizando análise de variância de uma, ou de duas vias (ANOVA), dependendo da ocorrência de factores múltiplos ou medições repetidas, de acordo com um modelo misto de ANOVA. Efectuam-se as comparações aos pares adequadas, utilizando um teste da diferença menos significativa de Fisher (LSD). A significância estatística aceitável é de $p < 0,05$ e todos os testes *post-hoc* são de duas caudas.

Resultados De modo a comparar as medições comportamentais com base nas dosagens de anticorpo B6B21 recebido, os coelhos foram agrupados de acordo com a quantidade total de B6B21 recebida em cada dia; um controlo de CSF,

1,5 µg, 3,0-5,0 µg e 10,0-15,0 µg. O grupo de droga de B6B21 de 1,5 µg não foi incluído na análise estatística, porque consistia em apenas um indivíduo.

Os resultados finais mostraram que a administração de B6B21 aumentou a aquisição da resposta de pestanejar condicionada vestigiária em coelhos em envelhecimento, de um modo dependente da dose (Figura 5). Utilizando um protocolo de condicionamento vestigiário idêntico, Thompson *et al.* (1995, *Neurobiol. Aging* 747:382-406) referiram que 40% de coelhos com 36+ meses de idade (n =50) atingiram um critério de 80% de RC em 25 dias de treino. Os restantes 60% dos coelhos não apresentaram desempenhos a um nível >30% e foram designados por "gravemente incapacitados". Os controlos de aCSF (n=2) no presente estudo tiveram desempenhos semelhantes aos animais de Thompson "gravemente incapacitados", tal como o animal que recebeu 1,5 µg de B6B21 (dose baixa; n=1, dados não apresentados). Nenhum dos coelhos do presente estudo, que receberam 10,0-15,0 µg de B6B21 (dose elevada; n=3) atingiu 80% da RC em 15 dias. No entanto, os coelhos que receberam 3,0-5,0 µg de B6B21 (dose intermédia; n=4) começaram a apresentar uma maior aquisição ao dia 5, em comparação com todos os outros grupos, e apresentaram uma maior aquisição que os controlos, tal como medido pela RC máxima alcançada (teste t de Student: $t(4)=3,34$, $p<0,05$, veja-se gráfico inserido na figura 5).

A percentagem média de RC durante a semana final de treino foi obtida para cada grupo, para medir a aprendizagem. Um ANOVA de uma via entre o controlo e os grupos experimentais indicou diferenças significativas entre as médias dos grupos ($F(3,12)=3,9$, $p<0,05$ $p=0,037$). Uma comparação do teste T *post-hoc* PLST de Fisher entre o controlo e os grupos de 3,0-5,0 µg mostrou uma aprendizagem aumentada ($P(T\leq t)$ de uma cauda=0,03, $p<0,05$), enquanto que o grupo da dose mais elevada não apresentou uma diferença significativa na aquisição, no mesmo teste t *post-hoc* ($P(T\leq t)$ de uma cauda=0,09).

Apesar de o número total de animais utilizados para análises estatísticas ser pequeno, estes resultados demonstram claramente que o mAb B6B21 aumenta significativamente a aquisição do condicionamento do pestanejar vestigiário em coelhos em envelhecimento, de um modo dependente da dose. Estes resultados mostram que há um sucesso razoavelmente esperado, no desenvolvimento de imitações de péptidos de B5B21 biologicamente activos. A linha celular de hibridoma que produz o anticorpo monoclonal B6B21 foi depositada nos termos do

Tratado de Budapeste na American Type Culture Collection (ATCC, Bethesda, MD, USA) com o número de concessão _____ em _____.

Exemplo 6 *Administração in vivo*

Permeabilidade da barreira hematoencefálica - Realizaram-se experiências para determinar a permeabilidade da barreira hematoencefálica aos péptidos do presente invento. O teste envolveu medições 15 segundos após a injeção interna na carótida *in vivo*, do péptido do invento, seguido por detecção no cérebro de rato e registado como uma percentagem dos compostos marcados radioativamente, administrados. Injectou-se na carótida comum de rato uma mistura de substância de teste marcada e uma substância de referência *standard*, com decapitação 15 segundos mais tarde. A razão entre [^{14}C] e [^3H] no tecido do cérebro, em relação à razão entre ^{14}C e ^3H na mistura original administrada, determinou a quantidade de substância de teste perdida para tecido cerebral numa única passagem através da microcirculação do cérebro. Uma vez que os dados obtidos são uma razão, a medição é uma determinação precisa, independente da quantidade de amostra de teste recuperada. As misturas de teste combinaram ^{14}C -antipirina ou ^{14}C -sacarose marcada com péptido ^3H -NT-13 ou ^3H -água, como controlo. A ^{14}C -antipiridina e a ^{14}C -sacarose são controlos difundíveis e não difundíveis, respectivamente (Figura 6A). Os dados foram normalizados utilizando ^3H -água como substância de referência padrão (100%, Figura 6B). Os dados adicionais na Figura 6B registados para nicotina, isopropanol, heroína e codeína são retirados de Bradbury *et al.*, 1975, *Amer. J. Physiol.* 299:1110.

Administração transnasal - A administração dos péptidos do presente invento pode ocorrer pela via nasal em composições de aerossóis ou gotas. As experiências foram realizadas para demonstrar a eficácia da transferência para o cérebro após aplicação transnasal dos péptidos do presente invento. Anestesiaram-se ratos macho, Sprague Dawley com cloridrato de cetamina. As soluções de péptido eram uma mistura de 0,05-0,1 mg de ^3H -NT-13 e uma gama de concentrações de NT-13 frio (não marcado) solubilizado em tampão de Ringer (pH de cerca de 7,8). As soluções de dosagem foram administradas com uma pipeta automática numa única narina em doses de 20 μl . A segunda dose foi fornecida 2 minutos após a primeira e o animal foi decapitado 3 minutos mais tarde. Os cérebros foram removidos e esquartejados para solubilização. Uma vez solubilizados, prepararam-se amostras para contagem de cintilação líquida. Os dados são apresentados na figura 7, que é um gráfico de μg de NT13 marcado medido no cérebro, contra mg de NT-13 marcado, administrado transnasalmente.

Injecção I.P. de péptidos - Realizaram-se experiências para determinar a quantidade de péptido fornecido ao cérebro após injecção *i.p.* de péptidos marcados do invento. Injectaram-se ratos macho, Sprague Dawley com ^3H -NT-13 dissolvido em água. Os animais foram então sacrificados 20 minutos após injecção e os cérebros foram solubilizados para contagem de cintilação líquida. A Figura 8 é um gráfico que mostra os resultados de μg de ^3H -NT-13 medidos no cérebro, contra mg de ^3H -NT-13 injectado *i.p.*.

Tal como estas experiências demonstram, a administração *in vivo* dos péptidos do presente invento pode ser realizada eficazmente, através de diversas vias.

Exemplo 7 Abordagem hipotética

Teste de actividade comportamental específica de NMDA - Pestanejar vestigiário em ratos

Método de abordagem Utiliza-se o híbrido F1 de ratos Fisher 344xBrown Norway devido a uma patologia relacionada com a idade, mínima (Bronson, 1990 in *Genetic Effects on Aging II*, Harrison, D.E. ed., Telford Press, Caldwell, New Jersey) e incapacidades no condicionamento do pestanejar, relacionados com a idade (Weiss e Thompson, 1992, *Neurobiol. Aging* 13:319-323). Utilizaram-se nas experiências ratos macho, virgens, de nove meses de idade.

Os ratos foram anestesiados com uma injecção intraperitoneal de pentobarbital de sódio (65 mg/kg de peso corporal). O topo da cabeça é rapado e limpo com álcool e betadine. Utilizam-se um dispositivo estereotáxico com um adaptador de anestesia por gás e barras atraumáticas para as orelhas (para proteger os tambores dos ouvidos). Após o animal estar cuidadosamente seguro, faz-se uma incisão na linha média, no escalpe. A pele do perióstio é retraída e o crânio é limpo e seco. Faz-se um furo através do crânio de aproximadamente 0,8 mm por trás do bregma e 1,3 mm à direita e à esquerda da linha média (coordenadas do nível da cabeça). A dura é então perfurada e introduz-se uma cânula de calibre 25 em cada buraco até uma profundidade de 4,0 mm abaixo da superfície cortical (Tonkiss e Rawlins, 1991, *Exp. Brain Res.* 85:349-358). Estas cânulas guia são então cimentadas no crânio com acrílico dental. Cimenta-se um conector de fio no crânio, anterior em relação à cânula. O conector contém um fio de terra, dois fios (aço inoxidável revestido com teflon™) que são implantados sub-dermicamente na pálpebra superior, para medir a actividade de EMG e dois fios que são implantados para fornecer um choque periorbital. Os animais têm uma semana de recuperação antes da habituação.



Quinze minutos antes de cada sessão de treino diária, a seguir descrita, os ratos recebem uma infusão de péptido nas concentrações adequadas ou de veículo de controlo de fluido cerebrospinal artificial (aCSF). As soluções são fornecidas por infusão a um caudal de cerca de 1,0 ml/min nos ventrículos (*i.c.v.*), utilizando uma cânula de injeção de calibre 30 ligada por tubagem PE-10 a uma seringa Hamilton de 10 ml, montada numa bomba de infusão de precisão da CMA Instruments. Fornece-se uma infusão de um total de cerca de 3,0 ml em cada ventrículo. Para promover a difusão, a cânula de injeção é deixada no local durante um período de dois minutos após a infusão. Utilizam-se processos de injeção aguda para manter um intervalo de teste de tratamento específico. Inclui-se um grupo de controlo não injectado para determinar os efeitos do próprio processo de injeção no desempenho.

Os ratos são colocados numa pequena gaiola numa câmara com atenuação de som que tem um altifalante e uma ventoinha de ventilação. Utiliza-se um cabo a ligar o equipamento experimental e o conector de fios implantado na cabeça. O estímulo de condicionamento é controlado por *software*, utilizando um computador compatível com PC e módulos electrónicos da Coulbourn Instruments (Akase et., 1994, *J. Neurosci. Meth.* **54**:119-130). A actividade de EMG é amplificada, filtrada e rectificada em termos de onda total com uma constante de tempo de 45 ms (Skelton, 1988, *Behav. Neurosci.* **102**:586-590). O sinal é enviado para um computador para recolha de dados e análise (Thompson et al., 1994, *J. Neurosci. Meth.* **54**:109-117).

O condicionamento do pestanejar é realizado utilizando processos modificados, como referido por Weiss e Thompson (1992, *Neurobiol. Aging* **13**:319-323). Os ratos são habituados ao aparelho de condicionamento durante uma sessão de 45 minutos antes das sessões de treino. Os animais são treinados diariamente em pares, durante 15 dias, quer com o paradigma 500 vestigiário, quer com o paradigma do controlo não emparelhado, para pseudocondicionamento. Os ratos são condicionados no pestanejar vestigiário, utilizando um estímulo de condicionamento de tono (CS, 100ms, 1KHz, 85dB, 5ms de tempo de subida/descida) e um estímulo não condicionado de choque periorbital (US, 150mms, 2mA AC). O período vestigiário livre de estímulo é de 500 ms para tornar a tarefa dependente do hipocampo (Moyer et al., 1990, *Behav. Neurosci.* **104**(2):243-252). Os ratos condicionados receberam 80 ensaios com tonos e choques emparelhados num intervalo ao acaso (ITI) de 30-60 segundos. Os ratos de controlo receberam 160 ensaios, quer apenas com um tono, ou apenas um



choque, a um ITI ao acaso de 15-30 segundos. Após as sessões de condicionamento cada rato é submetido a cinco dias de treino de extinção, que consiste de 80 sessões de ensaio de apenas um tono com um ITI de 30-60 segundos.

Análise histológica No final dos estudos comportamentais, os ratos foram sacrificados e preparados para análise histológica. A análise é realizada para determinar se as injeções repetidas de péptido produzem quaisquer sinais de dano excitotóxico no HPC. Os blocos de HPC serão fixados numa solução de tampão fosfato 0,1M contendo 10% de formalina e 30% de sacarose. Cortam-se secções coronais e coram-se com violeta de cresilo. A coloração das camadas de células piramidais em CA3 e CA1 é medida com um sistema de análise de imagem.

Análise/Interpretação de dados Os dados são analisados com ANOVA (análise de variância de uma ou duas vias) de grupo (condicionado vs. controlo) x dose (ACSF e 3 doses). As medições repetidas serão também analisadas com ANOVA. O ANOVA para a aquisição irá incluir 15 níveis no ANOVA. O ANOVA para extinção irá incluir 5 níveis. Esta concepção factorial origina 8 grupos de animais, utilizando-se cerca de 10 animais por grupo, para uma análise estatística de confiança.

Exemplo 8 Estudos futuros de autorradiografia

Os péptidos do presente invento permitem o estudo elaborado da distribuição no tecido cerebral, do péptido biologicamente activo.

Método de estudo Adaptando os métodos autorradiográficos de Beckenstein *et al.* (1990) aos péptidos do presente invento, poderemos examinar a especificidade de ligação regional ao longo da região do hipocampo do cérebro, bem como outros tecidos. Nos estudos iniciais, as condições de ligação optimizadas serão desenvolvidas em termos de pré-incubações e lavagens, métodos de secagem, equilibrio da duração, saturação e farmacologia do local de ligação a 23°C. Os ratos "ingénuos" serão sacrificados, os cérebros rapidamente removidos, embebidos em OCT e congelados em 2-metilbutano a -20°C, antes de seccionamento. Cortar-se-ão secções coronais de 10 µm num criostato e estas serão montadas, descongeladas, em lamelas revestidas com poli-D-lisina. O seccionamento em série permitirá determinar os gradientes de ligação ao longo de toda a extensão septo-temporal e dorso-ventral do hipocampo. No caso de se encontrarem gradientes na ligação dentro (e não através) de sub-campos específicos do hipocampo ou populações de células, teremos o cuidado especial de



realizar análises *Scatchard* apenas em áreas isentas destes gradientes. As secções adjacentes serão utilizadas para avaliação histológica com coloração de Nissel e para a determinação da ligação não específica. As secções individuais serão pré-incubadas em vários volumes repetidos de tampão HEPES 20 mM (pH 7,4) para reduzir as concentrações de ligandos endógenos ou exógenos. Os tecidos serão incubados com uma concentração otimizada de [³H]-péptido do presente invento, em tampão HEPES 20 mM durante vários períodos de tempo, para determinar a ligação de equilíbrio para estudos de saturação. Para experiências de saturação, as secções cerebrais serão incubadas com concentrações variadas de [³H]-péptido do presente invento em tampão HEPES 20 mM. A ligação não específica será determinada com a adição de um excesso de péptido frio.

Análise/Interpretação As secções de tecido serão apostas a [³H]-ultrofilm (Amersham) e co-expostas com padrões de trítio embebidos em metacrilato, como necessário para a exposição linear ao filme. Utilizar-se-á um analisador Phosphorimage da BioRad para estes estudos. Serão realizadas análises densitométricas quantitativas numa estação de trabalho MacIntosh IIfx, com um aparelho de varrimento de escala cinzenta de 8-bit e *software* de análise de imagem, do domínio público (Image™ v. 1.29), desenvolvido no NIMH.

Deve entender-se que a descrição e os exemplos são ilustrativos e não pretendem limitar o invento.



LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

(1) INFORMAÇÃO GERAL

(i) REQUERENTE:

- (A) NOME: Neurotherapeutics, L.P.
- (B) RUA: 2502 North Clark Street
- (C) CIDADE: Chicago
- (D) ESTADO: Illinois
- (E) PAÍS: EUA
- (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 60614

(ii) TÍTULO DO INVENTO: Péptidos neuroactivos

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 17

(iv) MORADA PARA CORRESPONDÊNCIA

- (A) DESTINATÁRIO: Dr. Volker VOSSIUS
- (B) RUA: Holbeinstraße 5
- (C) CIDADE: München
- (E) PAÍS: Alemanha
- (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 81679

(v) FORMA LEGÍVEL EM COMPUTADOR:

- (A) TIPO DE MEIO: Disquete
- (B) COMPUTADOR: PC compatível com IBM
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: ficheiro de texto Ms-Word

(vi) DADOS DO PRESENTE PEDIDO:

- (A) NÚMERO DO PEDIDO: PCT/US97/08667
- (B) DATA DE APRESENTAÇÃO: 16 de Maio de 1997 (16.05.97)

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 1

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 11 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOME/CHAVE: peptide

(B) LOCALIZAÇÃO: 1

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /nota="NT-1"

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO.1:

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Thr Val Ala
1 5 10

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 2

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA

(A) COMPRIMENTO: 7 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOME/CHAVE: peptide

(B) LOCALIZAÇÃO: 1

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /nota="NT-2"

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO.2:

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
1 5


(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 3

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA

(A) COMPRIMENTO: 9 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADEIA: simples



(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 9

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA

- (A) COMPRIMENTO: 17 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOME/CHAVE: peptide
- (B) LOCALIZAÇÃO: 1
- (D) OUTRA INFORMAÇÃO: /nota="NT-9"

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO.9:

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
1 5 10 15

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 10

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA

- (A) COMPRIMENTO: 11 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOME/CHAVE: peptide
- (B) LOCALIZAÇÃO: 1
- (D) OUTRA INFORMAÇÃO: /nota="NT-10"

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOME/CHAVE: disulfide-bond
- (B) LOCALIZAÇÃO: 1..11



(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO.10:

Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Pro Thr Cys
1 5 10

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 11

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA

(A) COMPRIMENTO: 11 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOME/CHAVE: peptide

(B) LOCALIZAÇÃO: 1

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /nota="NT-11"

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO.11:

Ser Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Pro Thr Ser
1 5 10

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 12

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA

(A) COMPRIMENTO: 5 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOME/CHAVE: peptide

(B) LOCALIZAÇÃO: 1

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /nota="NT-12"



(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO.12:

Gln Gln His Tyr Ser
1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 13

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA

(A) COMPRIMENTO: 4 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOME/CHAVE: peptide

(B) LOCALIZAÇÃO: 1

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /nota="NT-13"

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO.13:

Thr Pro Pro Thr
1

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 14

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA

(A) COMPRIMENTO: 3 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOME/CHAVE: peptide

(B) LOCALIZAÇÃO: 1



(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /nota="NT-14"

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO.14:

Thr Pro Pro

1

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 15

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA

(A) COMPRIMENTO: 3 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOME/CHAVE: peptide

(B) LOCALIZAÇÃO: 1

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /nota="NT-15"

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO.15:

Pro Pro Thr

1

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 17

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA

(A) COMPRIMENTO: 3 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOME/CHAVE: peptide

86 019
EP 0 914 331/PT

33

(B) LOCALIZAÇÃO: 1

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /nota="NT-17"

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO.17:

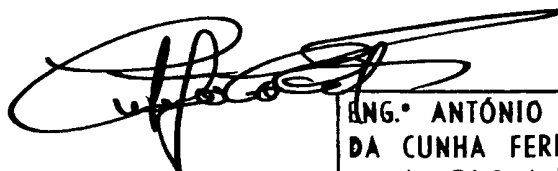
Thr Pro Thr

1

Lisboa, -1. FEV. 2001

Por NYXYS NeuroTherapies, Inc.

- O AGENTE OFICIAL -



ENG.º ANTÓNIO JOÃO
DA CUNHA FERREIRA
Ag. Of. Pr. Ind.
Rua das Flores, 74 - 4.º
1290 LISBOA



REIVINDICAÇÕES

1. Polipéptido isolado com uma sequência de aminoácidos seleccionada do grupo constituído por:

Gln-Gln-His-Tyr-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr (SEQ ID NO:3); Val-Tyr-Tyr-Ser-Gln-Gln-His-Tyr-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr (SEQ ID NO:4); Glu-Asp-Leu-Ala-Val-Tyr-Tyr-Ser-Gln-Gln-His-Tyr-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr (SEQ ID NO:5); Gln-Gln-His-Tyr-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr-Phe-Gly-Gly-Gly-Thr-Lys-Leu-Glu (SEQ ID NO:9);

Cys-Gln-Gln-His-Tyr-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr-Cys (SEQ ID NO:10)

| _____ S _ S _____ |

Ser-Gln-Gln-His-Tyr-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr-Ser (SEQ ID NO:11); Gln-Gln-His-Tyr-Ser (SEQ ID NO:12) e Thr-Pro-Pro-Thr (SEQ ID NO:13)

2. Composição farmacêutica compreendendo uma quantidade de polipéptido isolado, de acordo com a reivindicação 1, eficaz para ligação ao receptor de NMDA.

3. Método para detectar a presença de um receptor de NMDA em tecidos *in vitro*, que compreende o contacto do tecido a testar com um polipéptido marcado de acordo com a reivindicação 1, e a detecção da ligação específica do referido polipéptido marcado ao tecido.

4. Método para modificar a actividade biológica de um receptor de NMDA *in vitro*, que compreende o contacto do referido receptor de NMDA com um polipéptido de acordo com a reivindicação 1, ou uma composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 2.

5. Composição farmacêutica que compreende uma quantidade de um polipéptido eficaz para ligação ao receptor de NMDA, numa concentração de pelo menos 10^{-5} M ao limite de solubilidade do polipéptido, em que o referido polipéptido é seleccionado do grupo constituído por:

Lys-Ala-Ser-Gln-Asp-Val-Ser-Thr-Thr-Val-Ala (SEQ ID NO:1); Ser-Ala-Ser-Tyr-Arg-Tyr-Thr (SEQ ID NO:2); Gln-Gln-His-Tyr-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr ((SEQ ID NO:3); Val-Tyr-Tyr-Ser-Gln-Gln-His-Tyr-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr (SEQ ID NO:4); Glu-Asp-Leu-Ala-Val-Tyr-Tyr-Ser-Gln-Gln-His-Tyr-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr (SEQ ID NO:5); Ser-Val-Gln-Ala-Glu-Leu-Asp-Leu-Ala-Val-Tyr-Tyr-Ser-Gln-Gln-His-Tyr-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr (SEQ ID NO:6); Phe-Thr-Ile-Ser-Ser-Val-Gln-Ala-Glu-Leu-Asp-Leu-Ala-Val-Tyr-Tyr-Ser-Gln-Gln-His-Tyr-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr (SEQ ID NO:7); Gln-Gln-His-Tyr-Ser-Thr-

Pro-Pro-Thr-Phe-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO:8); Gln-Gln-His-Tyr-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr-Phe-Gly-Gly-Gly-Thr-Lys-Leu-Glu (SEQ ID NO:9);
Cys-Gln-Gln-His-Tyr-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr-Cys (SEQ ID NO:10);
| _____ S _ S _____ |
Ser-Gln-Gln-His-Tyr-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr-Ser (SEQ ID NO:11); Gln-Gln-His-Tyr-Ser (SEQ ID NO:12); Thr-Pro-Pro-Thr (SEQ ID NO:13); Thr-Pro-Pro (SEQ ID NO:14); Pro-Pro-Thr (SEQ ID NO:15); e Thr-Pro-Thr (SEQ ID NO:17)

6. Polipéptido de acordo com a reivindicação 1, em que o referido polipéptido é ciclizado, criando uma ligação adequada entre os aminoácidos do terminal carboxi e do terminal amino, do referido polipéptido.

7. Polipéptido de acordo com a reivindicação 1, que é marcado para utilização como um diagnóstico.

8. Utilização do polipéptido de acordo com a reivindicação 1 para o fabrico de um medicamento para modificar a actividade biológica de um receptor de NMDA.

9. Utilização de uma composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 2, para o fabrico de um medicamento para modificar a actividade biológica de um receptor de NMDA.

Lisboa, -1. FEV. 2001

Por NYXYS NeuroTherapies, Inc.

- O AGENTE OFICIAL -



ENGR ANTONIO JOÃO
DA CUNHA FERREIRA
Ag. Oj. Pr. Ind.
Rua das Flores, 74 - 4.º
1200 LISBOA

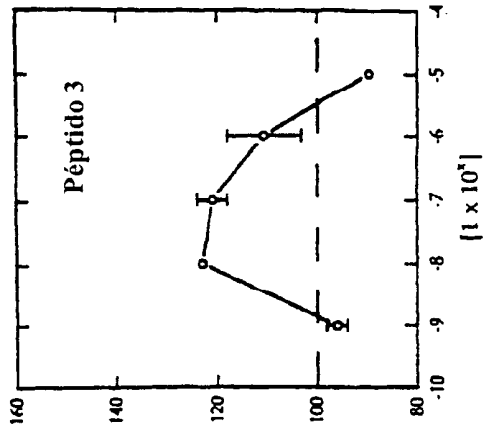


Figura 1C

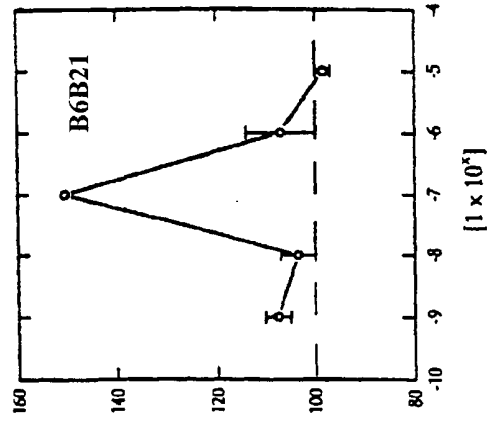


Figura 1B

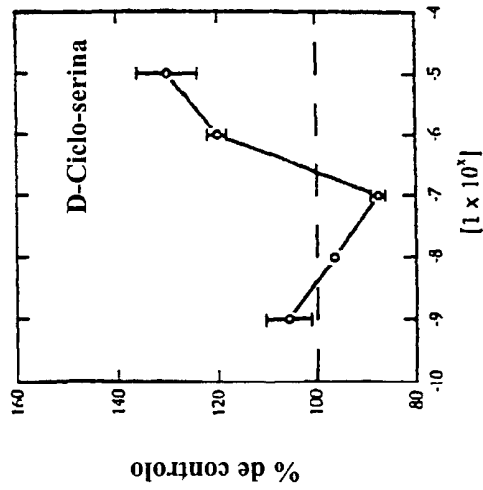


Figura 1A

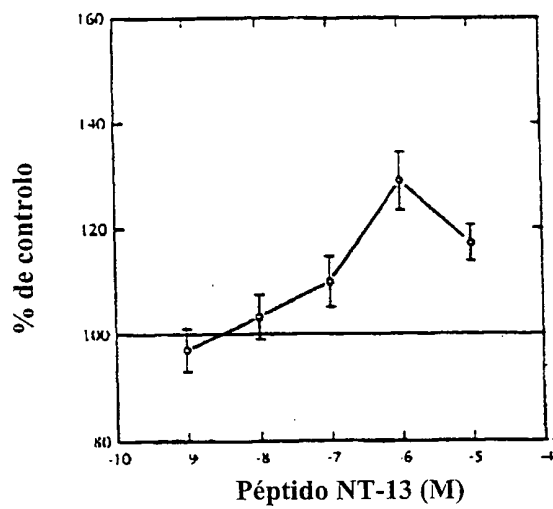


Figura 2

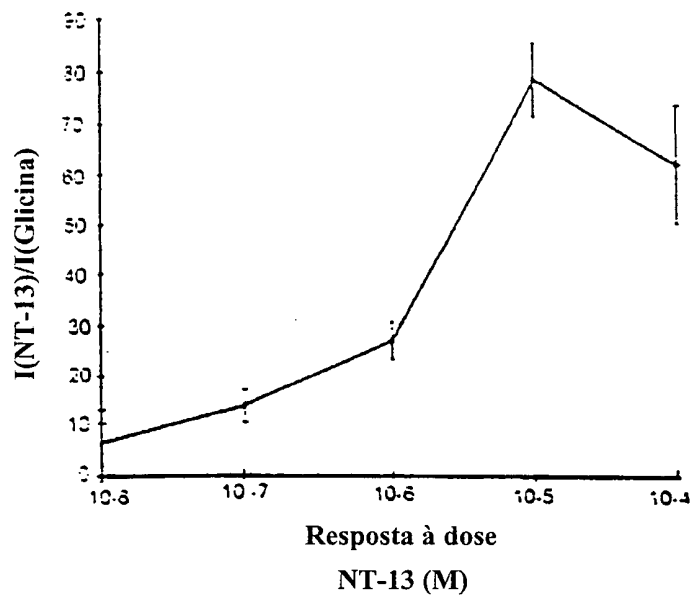


Figura 3A

Figura 3B

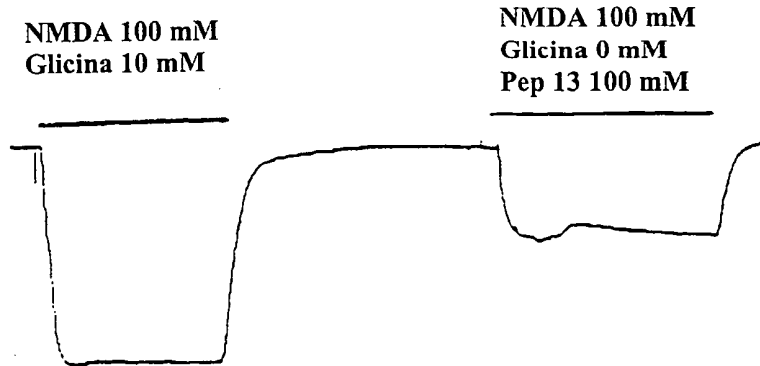


Figura 3C

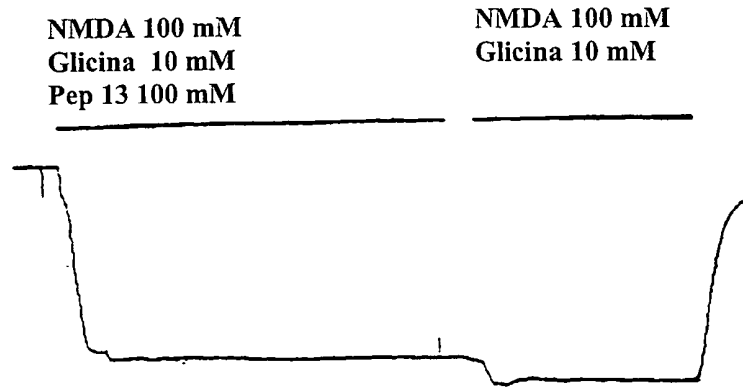
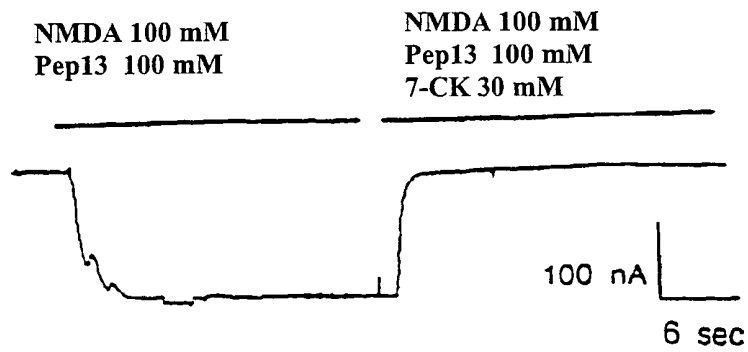


Figura 3D



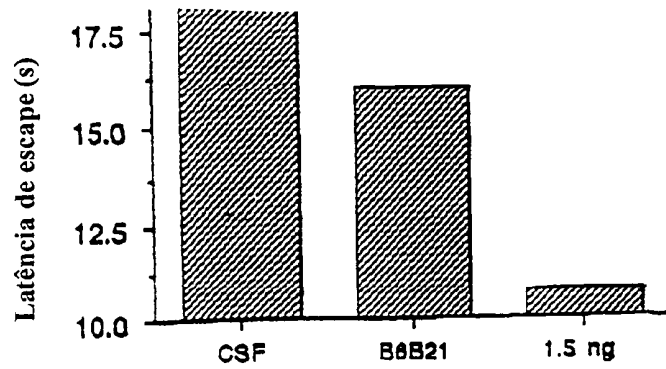


Figura 4A

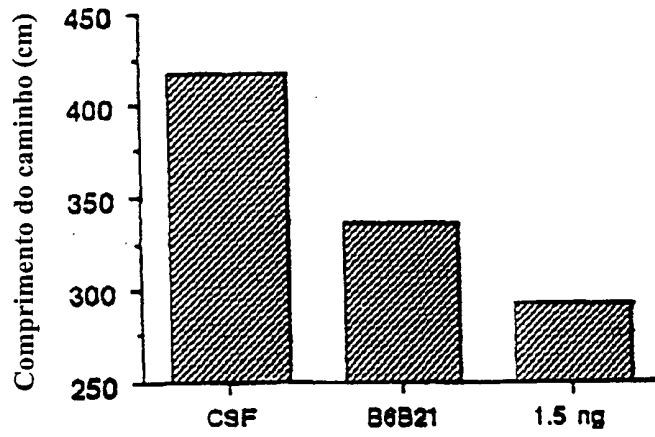


Figura 4B

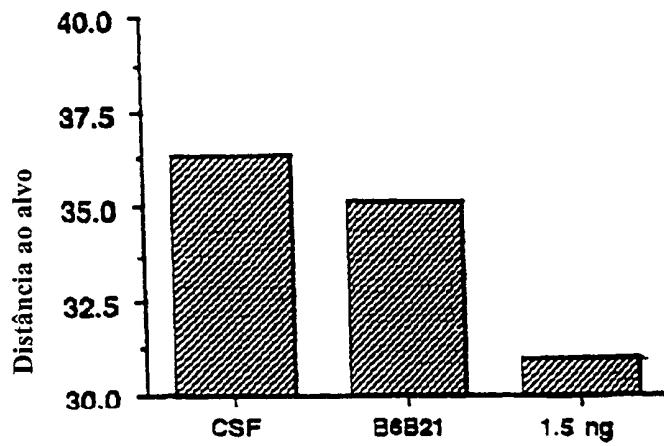


Figura 4C

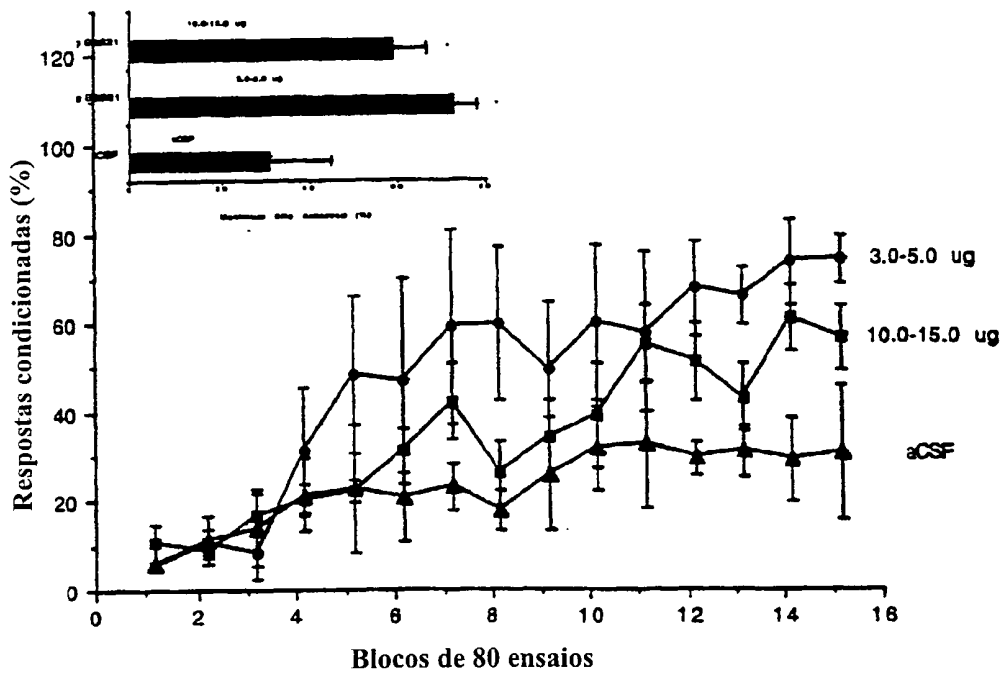
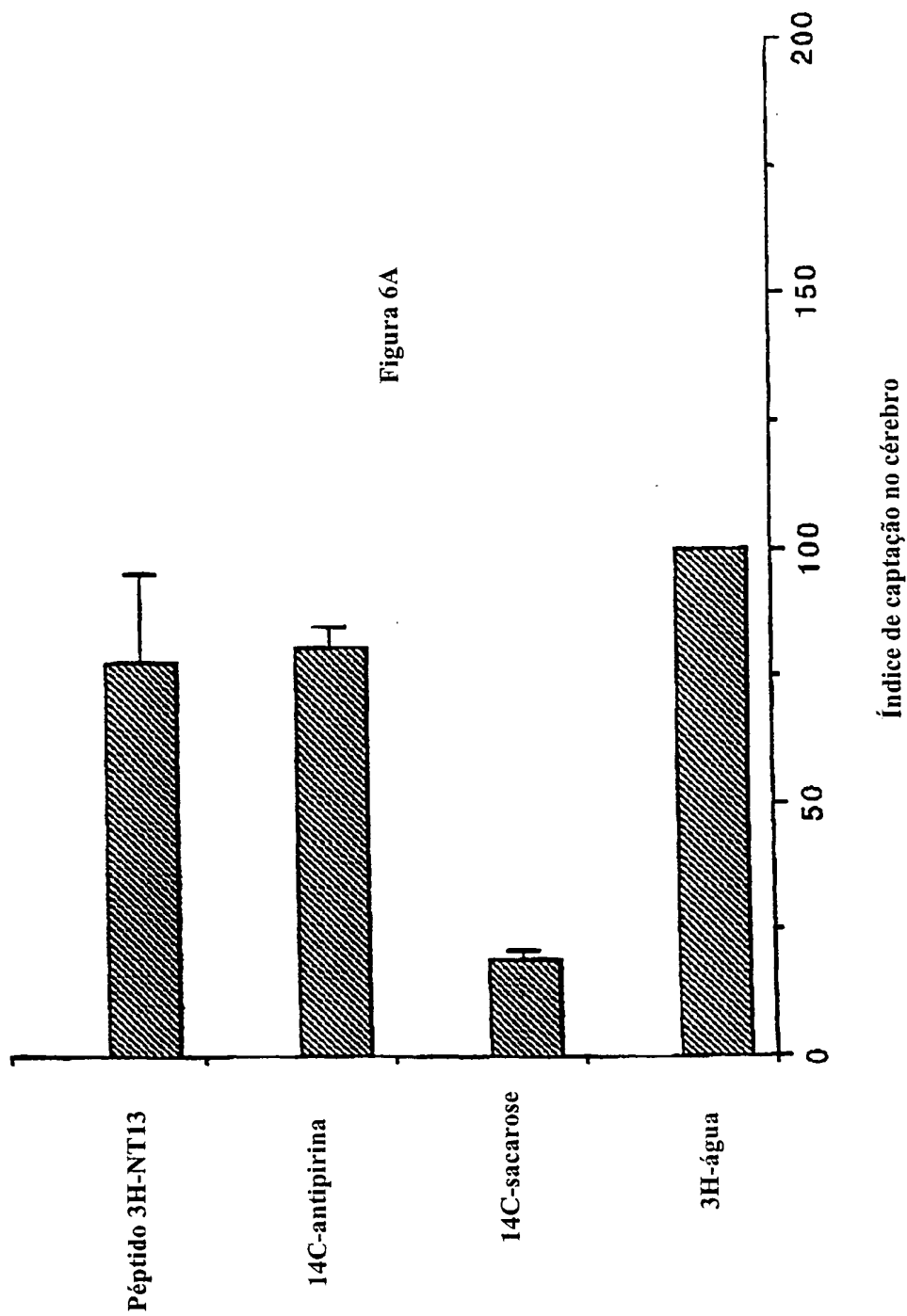


Figura 5

Figura 6A



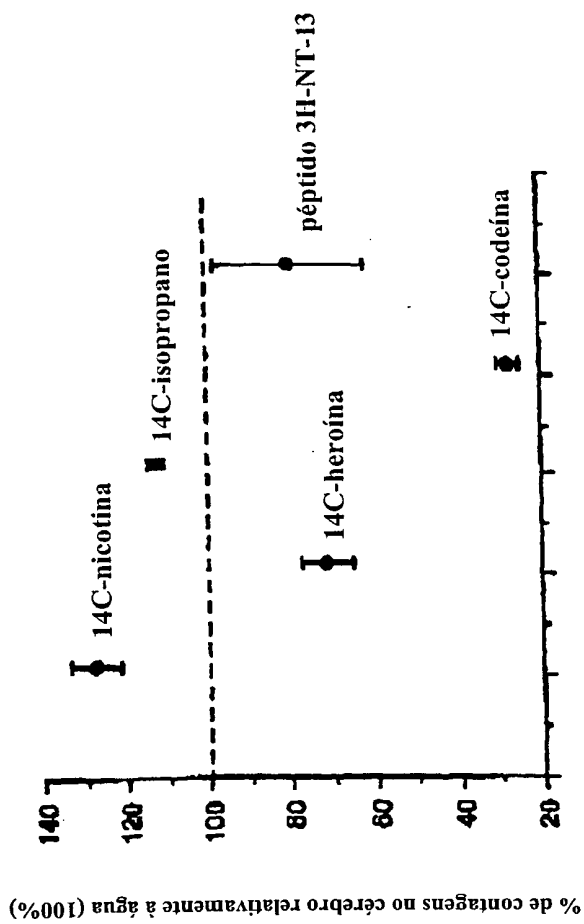


Figura 6B

NT13 Medido no Cérebro 5 min. após a Aplicação Transnasal

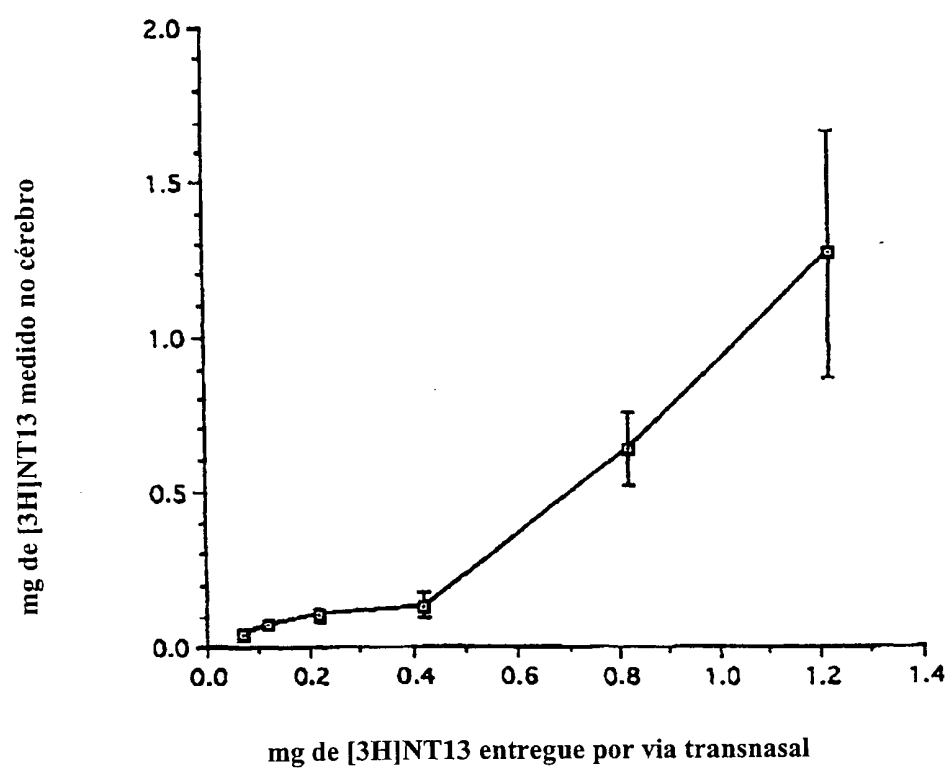


Figura 7

NT13 Medido no Cérebro 20 min. após a Injecção IP

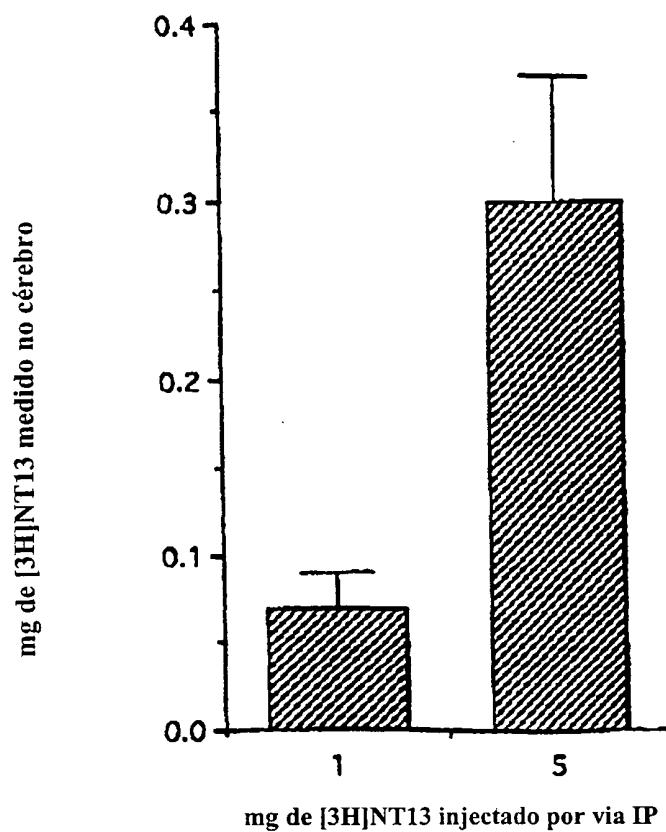


Figura 8